



UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de investigación:

DETERMINACIÓN DE COEFICIENTES DE DIFUSIÓN EN SUSTANCIAS PURAS
MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Presentado por Lorraine Guastar Valencia como requisito
para optar al grado del programa de Maestría en Ciencias - Química

Dirigido por:

Julien Wist Dr. Sc.

Co-dirigido por:

Crhistian Pantoja MSc.

Santiago de Cali

2022

Dedicatoria

*A mis padres Marella Valencia y Abdul-Benalit
Guastar por su apoyo incondicional, por su
confianza y tenacidad.*

Mi principal motivación.

Agradecimientos

Al universo por permitirme ser y estar, aquí y ahora. A mis padres Marella Valencia y Abdul-Benalit Guastar, por darme el aliento de seguir cada día y por sembrar en mí sus enseñanzas, valores y principios. A Jorge Luis Bolaños por su motivación, comprensión y apoyo incondicional, infinitas gracias. A mis amigos y compañeros, Wargner y Jhon, por tantos gratos momentos durante este proceso. A Crhistian Pantoja por ser amigo, compañero y por orientar el desarrollo del presente trabajo. Al Doctor Julien Wist por permitirme hacer parte del grupo de investigación DARMN. A la Universidad del Valle, al departamento de química y al programa de posgrados, por permitirme la oportunidad de formarme profesionalmente en el área de las ciencias químicas.

A todos gracias por estar conmigo en este largo camino.

Resumen

La siguiente propuesta de investigación, plantea el uso de una metodología general que evalúa los diferentes factores que influyen en la medición y en los resultados de coeficientes de difusión obtenidos mediante resonancia magnética nuclear. Se realiza una evaluación de diferentes metodologías para la calibración de gradientes de campo magnético, también, se estudian los efectos ocasionados por la radiación amortiguada y se realiza la atenuación de estos mismos mediante un conjunto de estrategias experimentales, adicionalmente, se propone la implementación de la secuencia de pulsos ^{13}C -RMN para evidenciar nula contribución de dicho efecto. Finalmente se realiza un análisis del efecto de convección y se busca una compensación efectiva usando diferentes herramientas y realizando comparación de estas con la secuencia de pulsos ya establecida DBPPLED. Para comprobar la efectividad se presenta el análisis y comparación de cada uno de los factores tratados en las diferentes secuencias de pulsos comparando los resultados con los datos reportados en la literatura obteniendo resultados completamente satisfactorios.

Palabras clave: RMN 1H 1D, gradientes de campo magnéticos, coeficiente de difusión, autodifusión, radiación amortiguada, convección.

Contenido

	Páginas
1. Introducción	8
1.1 Calibración de gradientes, el primer paso para obtener resultados fiables.	11
1.2 Convección y cómo afecta a los coeficientes de difusión medidos.	11
1.3 Radiación amortiguada y sus efectos en los experimentos de difusión por RMN	12
2. Objetivos	16
2.1 Objetivo General	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3. Metodología	17
3.1 Secuencia de pulsos “Spin Echo”	17
3.1.1 Gradientes de Campo Magnético en RMN	17
3.2 Experimentos de Difusión por RMN	19
3.2.1 Secuencia de pulsos BPPLIED (Bipolar pulse pair sequence with eddy current delay)	19
3.2.2 Secuencia de pulsos Oneshot	20
3.2.3 Secuencia de pulsos DBPLIED (Double-stimulated-echo experiment with bipolar gradient pulses).	21
3.2.4 Secuencia de pulsos ^{13}C - DEPTSE (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT) with Spin Echo)	23

	Páginas
4. Sección Experimental	24
4.1 Sistema concéntrico: 3.0 mm/5.0 mm y variaciones	24
4.2 Calibración de gradientes.	25
4.3 Radiación amortiguada	26
4.4 Convección	26
5. Resultados y discusión	28
5.1 Metodología para la calibración del gradiente de campo magnético aplicado	28
5.2 Evaluación de los efectos causados por la radiación amortiguada en los experimentos de difusión	32
5.3 Estudio de estrategias para la atenuación de la convección.	37
6. Conclusiones	42
7. Bibliografía	45

Lista de figuras

	Páginas
Figura 1. Secuencia de pulsos pulsed field gradient (PFG) spin echo y representación de desfase/refocalización	19
Figura 2. Secuencia de pulsos BPPLIED (bipolar pulse pair sequence with eddy current delay)	21
Figura 3. Secuencia de pulsos Oneshot.	22
Figura 4. Secuencia de pulsos DBPPLIED (Double-stimulated-echo experiment).	23
Figura 5. Secuencia de pulsos ^{13}C -DEPTSE (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT) with Spin Echo).	24
Figura 6. Sistema tubos concéntricos.	26
Figura 7. Calibración de intensidad de gradiente magnético aplicado mediante el experimento Z-profile	31
Figura 8. Efecto de reducción del ángulo de excitación para el pulso inicial.	34
Figura 9. Reducción de diámetro en el tubo de RMN y su impacto sobre el RD.	35
Figura 10. Comparación del efecto de RD en tubos de 3.0 mm con diferente ángulo de pulso inicial y secuencia de pulsos ^{13}C .	36
Figura 11. Efecto de convección sobre el sistema de ciclohexano.	39
Figura 12. Efecto de la rotación o “spinning” para diferentes diámetros.	42

Lista de tablas

	Páginas
Tabla 1. Valores de gradiente de campo obtenidos de las metodologías de calibración	30
Tabla 2. Comparación de coeficientes de difusión resultantes al ser procesador con las diferentes calibraciones	33
Tabla 3. Comparación de coeficientes de difusión resultantes mediante diferentes configuraciones, procesamiento de datos por altura o intensidad de señal	37
Tabla 4. Comparación de coeficientes de difusión resultantes mediante diferentes configuraciones, procesamiento de datos por área de señal	38

Notación

RMN	Resonancia magnética nuclear
PFG-NMR	Resonancia Magnética Nuclear con Pulsos de Gradientes de Campo, por sus siglas en inglés
DOSY	Espectroscopia de difusión ordenada, por sus siglas en inglés
I_0	Intensidad de referencia ($g=0$)
τ	Tiempo total del Eco
D	Coefficiente de difusión
γ	Constante giromagnética
δ	Duración de gradiente
Δ	Tiempo de difusión
T_{rd}	Tiempo de radiación amortiguada
$M_0, M_x, M_y, \text{ y } M_z$	Componentes netos de la magnetización
T_1	Tiempo de relajación espín-red
T_2	Tiempo de relajación espín-espín
Ω	Desplazamiento o corrimiento químico
^1H	Experimento de protón
^{13}C	Experimento de carbono 13
SE	Secuencia de pulsos “Spin Echo”
Oneshot	Secuencia de pulsos “Oneshot”
BPPLIED	Secuencia de pulsos “Bipolar pulse pair sequence with eddy current delay”
DBPPLIED	Secuencia de pulsos “Double-stimulated-echo experiment with bipolar gradient pulses”
DEPTSE	Secuencia de pulsos “Distortionless Enhancement by

	Polarization Transfer (DEPT) with Spin Echo”
T_e	Periodo de tiempo durante el cual las corrientes <i>eddy</i> se desvanecen
Gp	Gradiente de purga
RF	Radio Frecuencia
FID	Decaimiento por inducción libre
$\Delta\nu$	Diferencia de frecuencia
Gz	Gradiente de campo - eje z
L	Longitud
D1	Plazo de relajación
NS	Número de “Scans”
DS	Número de “Dummie scans”
LB	Apodización
S/N	Relación señal-ruido

1. Introducción

La difusión es un mecanismo fundamental en un amplio rango de procesos químicos y biológicos. Estos incluyen el ensamblaje de estructuras supramoleculares, cinéticas de reacción, control de propiedades dinámicas de ciertos materiales y regulación de procesos biológicos esenciales.^[1]

Existen dos tipos de definiciones para el concepto de difusión: difusión mutua o difusión traslacional (también conocida como autodifusión). La difusión mutua describe el proceso en el que las especies se desplazan de zonas de mayor concentración a otras de menor concentración impulsadas por sus diferencias en potenciales químicos, lo que comúnmente se conoce como la primera y la segunda ley Fick^[2-3]. Por otro lado, autodifusión o difusión traslacional es el mecanismo básico por el cual las moléculas se distribuyen en el espacio como consecuencia del movimiento térmico aleatorio conocido como movimiento browniano de una especie^[4]. Es importante resaltar que a pesar de tener las mismas unidades (m^2/s), ambos fenómenos son procesos físicos completamente diferentes.

El término autodifusión describe el movimiento aleatorio de las moléculas de un componente en ausencia de cualquier otra sustancia y está influenciado por las propiedades de la molécula y sus interacciones con el ambiente, brindando información sobre el entorno circundante.^[5] En consecuencia, estudiar el movimiento de traslación de las moléculas y los sistemas moleculares en su entorno nativo tiene un gran valor científico. La disponibilidad de coeficientes de autodifusión confiables ayuda a la construcción y validación de modelos moleculares predictivos para sustancias puras.^[5] A su vez, la simulación molecular ofrece una ruta prometedora para predecir las propiedades de transporte y comprender el vínculo entre la estructura molecular y el comportamiento macroscópico.^[6] Sin embargo, la determinación experimental directa de la autodifusión demanda un gran esfuerzo experimental que además depende de condiciones como la temperatura y la presión. Desafortunadamente, los estudios experimentales y los datos disponibles en la literatura han sido pocos y sólo cubren una cantidad de sustancias limitadas, restringiendo el estudio de modelos predictivos para una amplia gama de compuestos motivando así al desarrollo de una metodología generalizada para predecir los coeficientes de autodifusión.

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) ofrece un método práctico para la determinación de los coeficientes de autodifusión con el uso de gradientes de campo magnético (Pulsed field gradient (PFG)); la información sobre el movimiento traslacional puede ser codificada espacialmente mediante la aplicación de gradientes de campo magnético por un corto periodo de tiempo logrando un etiquetado espacial de las frecuencias de resonancia o frecuencias de Larmor de los núcleos presentes. Este principio constituye la base de las técnicas de obtención de imágenes por RMN^[2,7]. Esta teoría se fundamenta en el experimento “spin echo” propuesto por Hahn, Carr y Purcell^[7,9] en el que se establece que al aplicar dos gradientes de campo magnético consecutivos, el primer gradiente provoca un desfase de los espines, mientras que el segundo gradiente tiene la intención de refocalizar los espines a su fase inicial. No obstante, debido al movimiento molecular aleatorio, la fase inicial no es restablecida completamente lo que produce una atenuación de la señal observada^[10,11]

Las mediciones para experimentos PFG-RMN se realizan normalmente en espectrómetros de campo alto, donde las señales adquiridas muestran una buena resolución siendo esto el requisito principal para la estimación precisa de los coeficientes de autodifusión. Por el contrario, aunque existen algunos estudios que utilizan las mediciones realizadas en espectrómetro de campo bajo, estos experimentos resultan con señales que se vuelven muy anchas e incluso para algunos casos, se superponen de manera significativa lo cual impide distinguir las diferentes señales de una especie y adicionalmente, dificulta la integración directa de modo que la baja resolución impide una estimación precisa de las intensidades máximas de señal, las cuales son necesarias para un correcto procesamiento de datos y finalmente una determinación precisa de los coeficientes de autodifusión.^[11]

La determinación de los coeficientes de difusión permiten la extracción de información química, como la masa molecular de una especie desconocida, su agregación o su asociación con otras especies.^[12,13] En la espectroscopia de RMN, existe una herramienta analítica llamada DOSY^[14] (Diffusion-ordered spectroscopy), esta herramienta permite la separación de las señales de RMN acorde a su coeficiente de autodifusión, que generalmente se rige no solo por el radio hidrodinámico sino también por las interacciones entre los componentes de la mezcla.^[13] Adicionalmente, los datos proporcionan información acerca de los tamaños moleculares, formas e interacciones, sin embargo esta interpretación requiere información y protocolos adicionales.

Así, dichos datos normalmente solo se interpretan cualitativamente, ya que la interpretación cuantitativa de dichos espectros en términos del tamaño de las especies da una idea de los pesos moleculares y la asociación, incluida la formación de dímeros, trímeros y oligómeros superiores.^[15]

El experimento DOSY se obtiene mediante experimentos que utilizan gradientes de campo PFG RMN con diferentes intensidades y utilizando una secuencia de pulso derivada de la secuencia Spin echo con gradientes o eco estimulado dando como resultado señales que experimentan una atenuación en la intensidad de la señal que puede ser descrita mediante la ecuación de Stejskal-Tanner^[16] (Ec 1). Esta herramienta produce espectros 'pseudo'-2D con un eje que representa el desplazamiento químico y el segundo eje el coeficiente de difusión, dispersando así las resonancias de acuerdo con las propiedades de difusión de las moléculas originales.^[17]

$$\frac{I_g}{I_0} = \text{Exp} - \left(\frac{2\tau}{T_2}\right) \text{Exp} \left\{ - D \gamma^2 g^2 \delta^2 \Delta \right\} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde I es la intensidad observada, I_0 es la intensidad de referencia (intensidad de señal no atenuada ($g=0$)), T_2 es la constante de relajación transversal, 2τ es el tiempo total del eco, D coeficiente de difusión, γ el radio giromagnético, g la intensidad de gradiente, δ la longitud de gradiente, y Δ el tiempo de difusión. La constante de difusión puede extraerse utilizando un ajuste exponencial de las intensidades I en función de la magnitud del gradiente.

Los experimentos de difusión son vulnerables a una serie de artefactos experimentales que pueden afectar el resultado final. Algunos de estos artefactos son ocasionados por la presencia de corrientes parásitas, inducidas como consecuencia de la aplicación de campos magnéticos variables con el tiempo. Estas corrientes circulares crean campos magnéticos que se oponen al efecto del campo magnético aplicado. Adicionalmente, se encuentran artefactos que surgen de los gradientes de fondo^[18], estos son muy comunes en los experimentos PFG ya que es inevitable las diferencias de susceptibilidad magnética y falta de homogeneidad de campo magnético en la muestra, el efecto puede conducir el incremento de la señal de eco a medida que aumenta con la intensidad del gradiente^[18] reduciendo la fiabilidad de la medición, sin embargo, los avances en el diseño de espectrómetros y secuencias de pulsos han reducido en gran medida los efectos de ambos.

1.1 Calibración de gradientes, el primer paso para obtener resultados fiables.

Otros artefactos pueden ser ocasionados por la falta de uniformidad en los gradientes de campo magnético aplicados y el desconocimiento de la magnitud del mismo. Estos errores son sistemáticos y pueden eliminarse mediante una calibración adecuada y precisa de los gradientes de campo magnético empleados. Existen dos metodologías para realizar una calibración de gradiente, la primera consiste en usar un compuesto estándar del cual se conozca su coeficiente de difusión. Sin embargo, otro método en el cual, la calibración del gradiente se basa en la medición de un perfil de imagen unidimensional,^[19] en este método se introduce un objeto de dimensión conocida en espacio o longitud dicho objeto se coloca en el tubo de RMN de manera que quede en el centro de la bobina de radiofrecuencia. Seguidamente, se colecta un experimento *z-profile* donde se observa un perfil del objeto en la zona de observación. El ancho en frecuencia del perfil permite calcular el valor del gradiente aplicado en base a las dimensiones espaciales del objeto. Cada set de bobinas de gradiente tendrá su propia intensidad máxima de gradiente característica a un valor de corriente definido. Por lo tanto, la calibración de la intensidad del gradiente es fundamental para adquirir coeficientes de difusión fiables.^[19]

1.2 Convección y cómo afectan a los coeficientes de difusión medidos

Uno de los principales factores que pueden afectar la estimación de los coeficientes de difusión en RMN son los gradientes de temperatura. En los experimentos de difusión en RMN se busca medir el movimiento aleatorio de las moléculas en la muestra, por lo tanto cualquier movimiento adicional, ocasionado por la presencia de convección, conducirá a una sobreestimación del coeficiente de difusión medido.

Al realizar un experimento de difusión en muestras líquidas, es importante tener un calentamiento homogéneo de la muestra y un control preciso de la temperatura del sistema. No obstante, cuando una muestra líquida está más caliente en su base que en la parte superior se producen gradientes de temperatura ocasionando que el líquido más caliente y menos denso tienda a desplazarse a la parte superior^[19, 20] resultando en un efecto que se conoce como convección de Rayleigh-Bénard^[21].

Se ha demostrado que la convección presente en una muestra líquida de RMN depende de los parámetros experimentales específicos de la muestra, como viscosidad, conductividad térmica, el coeficiente de expansión térmica, y también la forma y el tamaño de la muestra. El impacto sobre los coeficientes de difusión medidos pueden variar desde severos hasta sutiles. La convección puede introducir una modulación adicional a la atenuación de la señal de difusión mostrando severas anomalías en la señal tanto en amplitud como en fase lo que conduce a la pérdida de señal. En casos severos, la distorsión de la señal adquirida con gradientes de mayor intensidad pueden llegar a ser incluso negativas. Por otro lado, la convección leve puede ser indistinguible de los datos no afectados, y un ajuste a la función exponencial esperada parecerá dar un buen resultado. No obstante, este coeficiente de difusión medido será mayor de lo esperado debido al componente adicional de convección.^[19, 20]

Aunque los efectos causados por la convección no se pueden eliminar por completo, si pueden ser mitigados notablemente, aunque a temperaturas altas, ningún método sería suficiente por sí solo. Así pues, existen diferentes métodos para atenuar los efectos de convección entre ellos están: la disminución del diámetro interno del tubo de muestra,^[22] rotación de la muestra^[23] (lo cual añade una fuerza centrífuga al efecto de la gravedad), el cambio del material del tubo de vidrio a zafiro^[24] y también haciendo uso de secuencias de pulsos diseñadas para compensar los efectos de la convección^[25, 26]. Estas últimas están diseñadas para reenfocar los efectos a lo largo de una dirección de gradiente de campo, dividiendo la secuencia de difusión en dos mitades simétricas que generan efectos de flujo iguales y opuestos para compensar el efecto de convección.^[24]

1.3 Radiación amortiguada y sus efectos en los experimentos de difusión por RMN

La radiación amortiguada es un fenómeno ampliamente conocido en resonancia magnética nuclear (RMN). Este proceso describe una ruta alternativa al mecanismo de relajación en el que el sistema de espín se recupera del estado excitado y retorna al equilibrio térmico.^[27] La precesión de una magnetización intensa en el plano después de un pulso de radiofrecuencia induce un campo electromagnético que puede generar una corriente oscilatoria en la bobina

receptora haciendo que la magnetización retorne más rápidamente a su posición de equilibrio a lo largo del eje z, incluso, antes de que puedan tener efecto el mecanismo de relajación T_2 . La velocidad a la cual la magnetización retorna al equilibrio, viene dada por una constante de tiempo característica conocida como tiempo de radiación amortiguada T_{rd} , que es mucho más corto que el tiempo de relajación T_2 y puede causar un incremento en el ancho de línea de las señales en el espectro de RMN. En instrumentos de alto campo, se presentan varios problemas en muestras con alta concentración de protones por la presencia de la radiación amortiguada.^[18,28,29]

Los efectos ocasionados por la radiación amortiguada en los experimentos de RMN se pueden traducir en una amplia variedad de artefactos o anomalías severas entorno a la fase y forma de la señal.^[27, 28] La radiación amortiguada RD afecta la descripción de la magnetización macroscópica incorporando un término adicional no lineal a las ecuaciones de Bloch^[27,29]. Por lo tanto, las relaciones analíticas entre el coeficiente de difusión y la atenuación de la señal medida en los experimentos de difusión carecen de validez.^[27-29] A continuación las ecuaciones de Bloch que incluyen el término de (RD) son presentadas (Ec 2, Ec 3)

$$dM_x/dt = -i\omega M_{xy} - M_{xy}/T_2 - (M_{xy}M_z)/(M_0T_{RD}) \quad \text{Ec 2}$$

$$dM_z/dt = -(M_z - M_0)/T_1 + M_{xy}^2/(M_0T_{RD}) \quad \text{Ec 3}$$

La importancia de la componente M_z de la magnetización queda clara si se consideran las ecuaciones de Bloch modificadas donde se encuentran los componentes netos de la magnetización M_x , M_y , y M_z ; la magnetización en equilibrio, el tiempo de relajación espín-red (T_1), el tiempo de relajación espín-espín (T_2) y el desplazamiento o corrimiento químico (ω , Ω), sin embargo también se encuentra el término T_{RD} que está presente en el producto M_0T_{RD} y es una constante independiente de la propiedad de la muestra medida. Esto implica que la intensidad de la señal no es proporcional a la concentración de la muestra.^[30] La velocidad a la que la magnetización de la muestra retorna al equilibrio viene dada por una constante de tiempo característica conocida como tiempo de amortiguamiento de la radiación (T_{RD}). La radiación amortiguada complica en gran medida el desempeño de las mediciones de difusión que

involucran fuertes resonancias de RMN y pueden causar efectos similares a los causados por los gradientes de fondo.^[18,29]

En consecuencia, se ha observado que existe una competencia entre la intensidad de señal debido a la radiación amortiguada y una mayor atenuación de la señal debido a la difusión a medida que aumenta la intensidad del gradiente; así pues, a medida que la intensidad del gradiente continúa aumentando, la disminución de la señal debido a la radiación amortiguada finalmente se vuelve insignificante y domina la atenuación difusiva. Esto explica el extraño aumento y luego la disminución de la señal a intensidades bajas de gradientes.^[28,29]

En general, para obtener medidas precisas de difusión se deben considerar aquellos artefactos que pueden afectar la atenuación de la señal adquirida, por ejemplo, fenómenos como radiación amortiguada (RD) pueden estar presentes en los casos en que se tenga como objeto de estudio sustancias altamente concentradas. Los efectos causados por radiación amortiguada pueden reducirse eligiendo parámetros experimentales adecuados. En particular, el uso de secuencias de pulsos de eco estimulado modificadas, con un ángulo de nutación reducido para el primer pulso.^[28] Sin embargo, si la sensibilidad es un problema, el uso de pulsos de ángulo de nutación pequeño puede resultar en una reducción inaceptable de la relación señal-ruido (S/N). Incluso en experimentos más complejos, se puede observar una variedad de efectos, incluidas anomalías graves en la forma de la línea y errores de fase de la señal.^[29]

En el presente trabajo se presenta una metodología para la estimación de los coeficientes de autodifusión a partir de señales obtenidas de los experimentos PFG RMN con alta precisión en campos magnéticos altos. En este enfoque, se realiza una combinación de diferentes procedimientos que permiten la estimación de coeficientes para las sustancias puras para abordar y reducir las diferentes distorsiones o efectos que afectan finalmente los resultados. Inicialmente, se abordó la calibración de los gradientes de campo magnético empleando las dos metodologías presentadas anteriormente.

Teniendo en cuenta que el motivo principal consiste en medir coeficientes de difusión en un amplio rango de temperaturas, se debe tener en cuenta los efectos causados por la convección y los gradientes de temperatura y por ello se hace uso de la herramienta “rotación” o “*spinning*” para contrarrestar los efectos causados por la convección. Complementariamente, se propone

reducir el diámetro del tubo de RMN para mitigar los efectos de convección y RD que al tratarse de sustancias puras se espera que este fenómeno esté presente, es por ello que para este último caso se realizó adicionalmente la reducción del ángulo de rotación para el pulso de excitación. Por otra parte, se realizó el estudio y comparación de tres secuencias de pulsos, la secuencia de pulsos más comúnmente usada BPPLED, la secuencia ONESHOT para reducir los extensos ciclos de fase y la secuencia DBPPLED para compensar los efectos de la convección. Finalmente se usó una secuencia de pulsos basada en la detección en ^{13}C por su baja abundancia en el caso de tener muestras altamente concentradas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

- Desarrollar una metodología para la determinación exacta del coeficiente de difusión en sustancias puras mediante resonancia magnética nuclear (RMN).

2.2 Objetivos específicos

- Selección de parámetros idóneos en términos de secuencias de pulsos y condiciones experimentales para la estimación precisa de los coeficientes de difusión en sustancias puras por (RMN).
- Analizar el impacto de las principales fuentes de error tales como calibración de gradiente, convección y radiación amortiguada en los experimentos de difusión por RMN.
- Implementación del experimento de difusión en ^{13}C para reducir el impacto de los efectos de radiación amortiguada mediante la detección en el núcleo de carbono en sustancias puras.

3. Metodología

3.1 Secuencia de pulsos SE (Spin Echo)

En un experimento Spin Echo la magnetización es refocalizada garantizando que la frecuencia angular (corrimiento químico) antes y después del pulso de refocalización sean equivalentes para el sistema de espín. Si los espines cambian su posición a durante el tiempo de refocalización a diferentes regiones donde el valor del campo magnético es diferente, la refocalización será incompleta ocasionando en una pérdida de señal, como se describe en la figura 1. El proceso mediante el cual los espines cambian de posición durante el experimento eco de espín es conocido como movimiento de traslación o movimiento browniano.^[10]

3.1.1 Gradientes de campo magnético

Generalmente, durante los experimentos de RMN el campo magnético se mantiene constante y homogéneo en lo posible a lo largo de la muestra para garantizar la obtención de espectros en alta resolución. En consecuencia la resonancia del núcleo de interés posee un único valor a lo largo de la muestra. No obstante, con la aplicación de un gradiente de campo magnético a lo largo del eje z la frecuencia de resonancia adopta una dependencia espacial a en la dirección del gradiente aplicado descrita por la ecuación 4.^[19]

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad \text{Ec. 4}$$

Al aplicar un gradiente de campo magnético se introduce una contribución adicional sobre la fase de los espines ocasionando el etiquetado de los mismos con una fase linealmente dependiente a su posición espacial como se muestra en la ecuación 5.

$$\omega_0 = \gamma(B_0 + Gz) \quad \text{Ec. 5}$$

Al aplicar un segundo gradiente de signo contrario (o equivalente en el caso de un pulso de 180° previo), los espines deben precesar con una fase igual en magnitud pero opuesta garantizando la refocalización de los mismos. Sin embargo, la refocalización será completa si el campo

magnético local experimentado por el espín es idéntico durante la aplicación de ambos gradientes, esto puede cumplirse en el caso que el espín permanezca en la misma posición durante todo el experimento. Por el contrario si las moléculas tienden a moverse o difundirse lejos de su posición inicial entonces el campo local experimentado durante el segundo gradiente no coincidiría con el primero y una refocalización parcial del núcleo de interés conduciría a una disminución de señal obtenida. El proceso descrito anteriormente es la base para la mayoría de experimentos de difusión en RMN.^[31, 19]

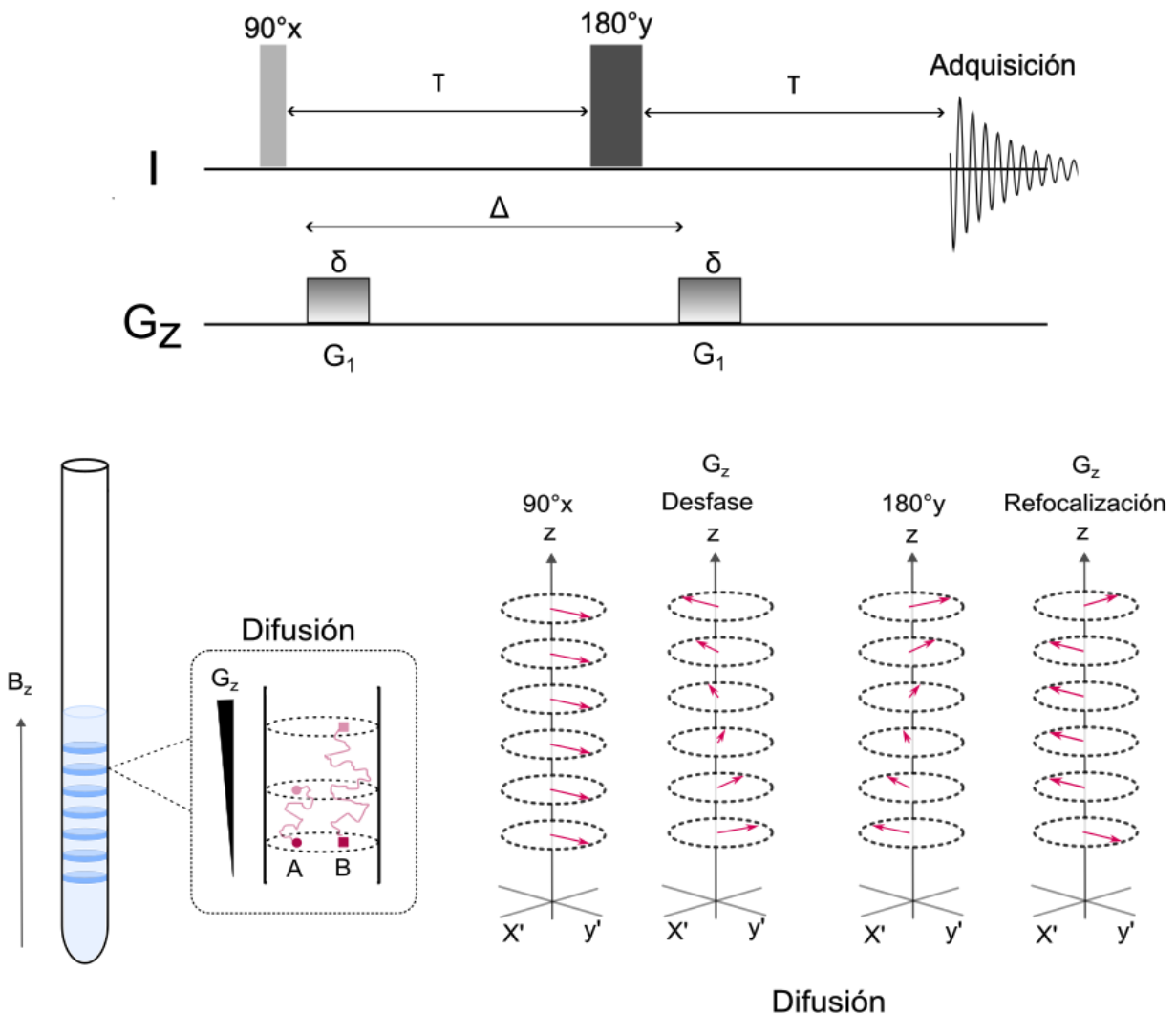


Figura 1. Secuencia de pulsos pulsed field gradient (PFG) spin echo y representación de de desfase/refocalización. En la secuencia de pulsos Spin Echo,^[8-9] el tiempo de difusión está dado por Δ y la duración del gradiente aplicado por δ . La aplicación de un gradiente de campo

magnético (G1) ocasiona la destrucción de la magnetización transversal. Seguidamente, la aplicación de un segundo gradiente con igual magnitud pero polaridad opuesta refocaliza la magnetización. Sin embargo, teniendo en cuenta el efecto de la difusión, sucede una refocalización parcial lo que conduciría a una disminución de señal obtenida.

3.2 Experimentos de Difusión por RMN

3.2.1 Secuencia de pulsos BPPLIED (bipolar pulse pair sequence with eddy current delay)

La secuencia BPPLIED^[32] ha sido una de las secuencias más ampliamente utilizadas. La característica clave de la secuencia BPPLIED es el uso de pares de gradientes bipolares. Las corrientes “eddy” o parásitas inducidas por los gradientes se logran disminuir reemplazando el gradiente (de duración δ) por dos gradientes iguales pero de signo opuesto (de duración $\delta/2$ cada uno) que se encuentran separados por un pulso de 180° que permite que los gradientes bipolares actúen desfasando y refocalizando la magnetización, con dicha combinación se obtiene autocompensación de las corrientes eddy ya que cuando se emplea un período adicional (entre los dos últimos pulsos de 90°) T_e la magnetización se almacena longitudinalmente antes de la detección mientras las corrientes parásitas se desvanecen. La ecuación que describe la atenuación de la señal en esta secuencia de pulsos es:

$$\frac{I_g}{I_0} = \text{Exp} \left\{ - D \gamma^2 g^2 \delta^2 \left[\Delta + \frac{2\delta}{3} + \frac{3\tau}{4} \right] \right\} \quad \text{Ec. 6}$$

Tal como se observa en la Figura 2., este experimento tiene dos gradientes de purga (Gp) para desfasar la magnetización transversal residual en los períodos T y T_e . En este caso, también se debe tener en cuenta la posibilidad de refocalización accidental de magnetización no deseada que pueden interferir con las intensidades de señal obtenidas.



La secuencia de pulsos Oneshot^[33], se estableció para permitir que las mediciones de difusión se realicen en modo de un único paso (evitando tiempo de experimentos extensos), caso contrario al de las secuencias de pulsos que existen para realizar mediciones de difusión, estas requieren más de uno o dos pasos, y comprometen la resolución en el dominio espectral y/o de difusión.

$$\frac{I_g}{I_0} = \text{Exp} \left\{ -D\gamma^2 g^2 \delta^2 \left[\Delta + \frac{\delta(\alpha^2 - 2)}{6} + \frac{\tau(\alpha^2 - 1)}{2} \right] \right\} \quad \text{Ec. 7}$$

La secuencia oneshot como ya se mencionó suprime la contribución de magnetización no deseada mediante gradientes de campo, sin comprometer otros aspectos del rendimiento de esta

misma. Los pares de gradientes de campo bipolares asimétricos se utilizan junto con gradientes de equilibrio extra minimizando los efectos de corrientes parásitas y la perturbación de la frecuencia “lock”.

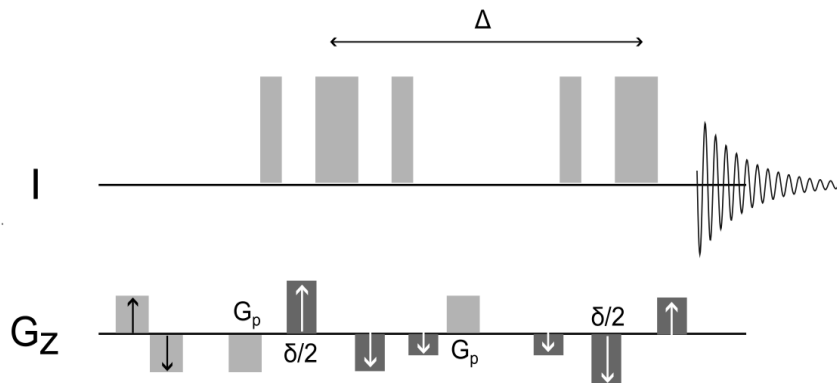


Figura 3. Secuencia de pulsos Oneshot.

Los resultados muestran que la secuencia puede obtener espectros limpios con buenas formas de línea, de buena calidad y alta resolución de manera rápida donde hay suficiente concentración de muestra para dar una buena relación (S/N) señal-ruido. Si las consideraciones de señal-ruido exigen más de un solo paso por experimento, aunque también se puede emplear más de un paso, para el cual se presenta un ciclo básico de ocho pasos lo que hace que la secuencia sea una buena opción de propósito general.

3.2.3 Secuencia de pulsos DBPPLED (Double-stimulated-echo experiment with bipolar gradient pulses).

Como ya se mencionó, la convección se debe principalmente a un gradiente de temperatura a lo largo del eje z, coincidiendo con el eje donde se aplica el campo magnético principal (B_0). En el volumen activo de la muestra, la convección transporta las mismas cantidades de líquido en direcciones opuestas y por tanto se supone que la velocidad de convección es constante durante el plazo de difusión en el experimento.

Teniendo en cuenta lo anterior, el principio del presente experimento es la aplicación de la misma secuencia dos veces pero invirtiendo los gradientes^[25,26], la fase inducida en la primera parte ocasionada por el efecto de convección es igual pero este tiene sentido contrario a la producida en la segunda parte y por tanto se toma el cambio de fase total de la secuencia como nulo, teniendo así una secuencia que elude los efectos del flujo convectivo.

Las secuencias DBPPLED describen una expresión de atenuación de la siguiente manera:

$$\frac{I_g}{I_0} = \text{Exp} \left\{ - D \gamma^2 g^2 \delta^2 \left[\Delta + \frac{4\delta}{3} + \frac{3\tau}{2} \right] \right\} \quad \text{Ec. 8}$$

Esta secuencia de pulsos minimiza el decaimiento de la magnetización debido a los efectos causados por las corrientes de convección asociadas con los gradientes de temperatura en la muestra. Esta secuencia puede funcionar correctamente siempre que la corriente de convección tenga un perfil de flujo laminar constante durante el intervalo de difusión de la secuencia de pulsos.

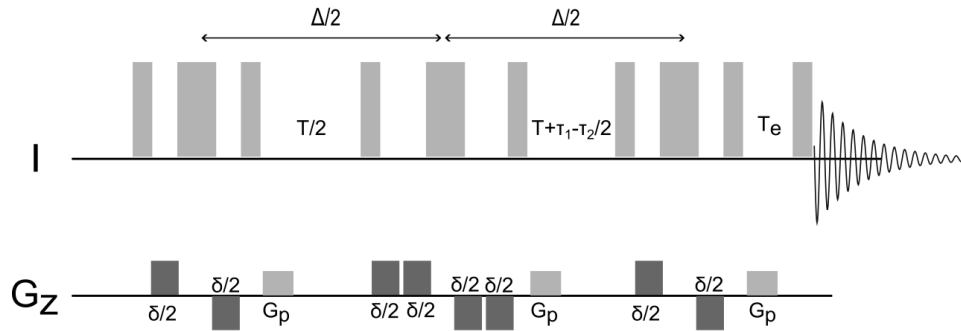


Figura 4. Secuencia de pulsos DPPLD (Double-stimulated-echo experiment with bipolar gradient pulses)).

3.2.4 Secuencia de pulsos ^{13}C - DEPTSE (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT) with Spin Echo)

La mayoría de las secuencias de pulsos ^{13}C -DOSY^[34] realizan codificación espacial en difusión con ^1H , utilizando un eco estimulado seguido de la transferencia de polarización a ^{13}C en el que se pierde la mitad de la señal. Esta pérdida de señal se puede evitar realizando la codificación con ^{13}C en un experimento de eco de espín mejorando la sensibilidad de un factor de dos para las moléculas pequeñas.^[34]

La secuencia DEPTSE describe una expresión de atenuación sencilla, relacionando directamente la ecuación de la secuencia espín eco en la siguiente manera:

$$\frac{I_g}{I_0} = \exp \left\{ - D \gamma^2 g^2 \delta^2 \Delta \right\} \quad \text{Ec. 9}$$

De la combinación de DEPT con SE (la secuencia de pulsos DEPTSE) se obtiene que la relación giromagnética cuatro veces menor del ^{13}C requiere por ejemplo el uso de cuatro veces el área del gradiente requerida para los experimentos de ^1H con el mismo tiempo de difusión, pero con el uso de un eco de espín permite acomodar gradientes mucho más largos. Por otro lado, la transferencia de polarización permite aumentar la señal utilizando la magnetización de ^1H , y también permite aumentar la tasa de repetición de los experimentos, como se muestra en la secuencia a continuación:

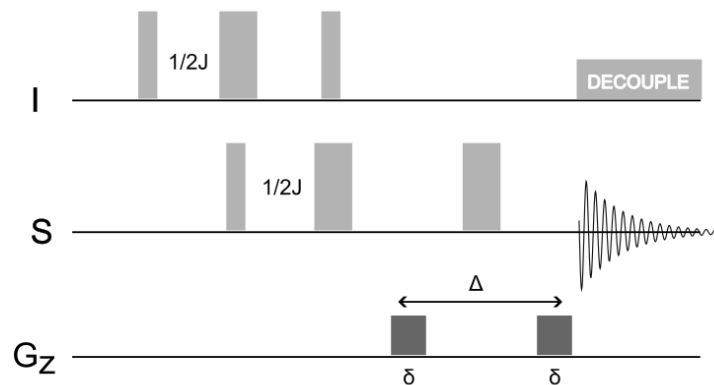


Figura 5. Secuencia de pulsos ^{13}C - DEPTSE(Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT) with Spin Echo)

4. Sección experimental

Los experimentos medidos en este trabajo fueron realizados en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker Avance II 400 MHz con sonda doble canal (BBO) y bobinas generadoras de gradientes de campo magnético a lo largo del eje z. Un dispositivo BCU (Bruker, Rheinstetten) mantuvo el control de la temperatura de la muestra (Variaciones menores a 0.1K). La señal “Lock” fue realizada sobre la especie deuterada y en tanto el tuning and matching fue realizado de forma automática. Para la inhomogeneidad magnética se realizó la ejecución automática y manual del “shimming” para la optimización de la homogeneidad del campo B_0 . Los tiempos de adquisición de los espectros variaron entre 25 minutos y 1 hora por experimento, esto fue dependiente al número de puntos, el plazo de relajación (D1; los valores para D1 en sustancias puras fue entre 15 y 25 segundos), el número de “scans” (NS) y “dummie scans” (DS) fueron configurados de acuerdo al requerimiento de cada secuencia de pulsos para evitar artefactos o imperfecciones no deseadas imperfecciones.

4.1 Sistema concéntrico: 3.0 mm/5.0 mm y variaciones

Los experimentos se llevaron a cabo en sistemas de tubos concéntricos (Figura 6) conformados por tubos de RMN de 5.0 mm, 3.0 mm y 1.7 mm de diámetro, el uso de dicho ensamble concéntrico, fue con el objetivo de lograr el estudio de sustancias puras con la eficiencia del componente deuterado sin que este entrara en contacto con la muestra. La determinación de coeficientes de difusión se efectuó mediante diferentes secuencias de pulsos y para tal fin se usaron principalmente sustancias puras como ciclohexano y agua desionizada.

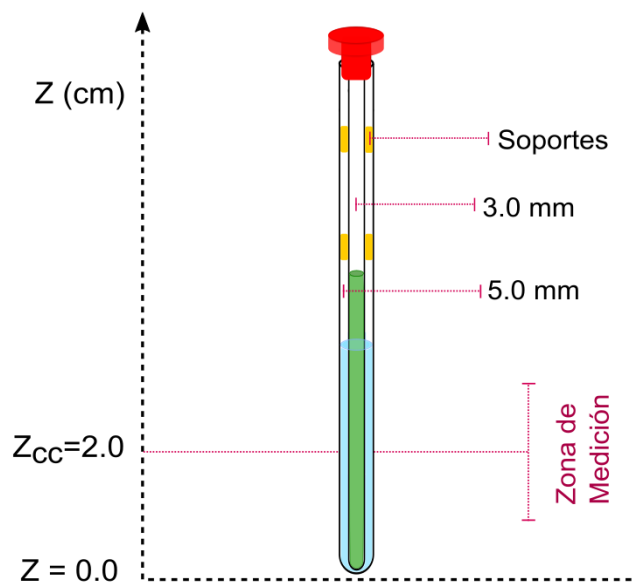


Figura 6. Sistema tubos concéntricos. El sistema concéntrico consta de dos tubos de RMN unidos mediante dos soportes; el tubo externo corresponde a un tubo de 5.0 mm y el tubo interno a uno de menor diámetro (3.0 mm ó 1.7 mm); dicho ensamble está de la siguiente manera: en el tubo de menor diámetro se encuentra la sustancia pura a estudiar ubicada estratégicamente ya que se disminuye el volumen de muestra en la región activa de medición, evitando principalmente artefactos y/o efectos provocados por la radiación amortiguada, y la convección, por otro lado en el tubo externo se encuentra el solvente deuterado el cual es primordial para realizar procesos que garantizan la homogeneidad del campo, y entre los solventes deuterados usados para este trabajo se encuentran DMSO, D₂O y CDCl₃.

4.2 Calibración de gradientes.

En el presente trabajo se realizó calibración de gradientes con dos metodologías conocidas. En primer lugar, la forma más común de calibrar un gradiente es usando una "muestra estándar" de coeficiente de difusión conocido, para este caso se emplearon solventes como los son D₂O 99.9% ($D = 1.902 \text{ m}^2/\text{s}$) y H₂O desionizada ($D = 2.299 \text{ m}^2/\text{s}$) a una temperatura de 298K y, la magnitud de gradiente g se determinó con cada una de las secuencias de pulsos aquí empleadas con el fin de obtener dicha intensidad de gradiente.

En segundo lugar, la intensidad del gradiente se calibró mediante el experimento z-profile^[35] en el cual es de esperarse observar el perfil de la bobina. El experimento para la calibración se realizó en un tubo Shigemi CMS de 5.0 mm y se usó una pequeña cantidad de D₂O 99.9%, dicho volumen fue sujetado y reducido por un pistón dentro del tubo ocupando una longitud de 0.55cm aproximadamente, una vez verificado se procedió a ubicar en el centro de la bobina de RF.

4.3 Radiación amortiguada

Con el objetivo de lograr reducir los efectos de la radiación amortiguada, el presente trabajo abordó dos formas en las cuales se busca una atenuación de dicho efecto. Para este fin, se empleó una muestra de H₂O desionizada a 298K con regulación de temperatura. En el primer caso, se usó la metodología de reducción de ángulo, en la que se realizó el experimento con un pulso inicial de 90° y posteriormente este pulso fue modificado reduciéndolo a 15° para luego comparar los anchos de línea de cada uno de los experimentos realizados.

Igualmente, se efectuó el análisis con la reducción del diámetro del tubo de RMN, asegurando una disminución en el volumen ocupado por la muestra de H₂O desionizada. Con motivos de garantizar que no habrían efectos por gradientes de temperatura se trabajó a temperatura ambiente del equipo omitiendo el uso de la regulación y alcanzando los 294K de temperatura, los experimentos se llevaron a cabo en tubos de RMN de 5.0 mm, 3.0 mm y 1.7mm sin modificación del pulso inicial de 90°. Finalmente, se implementó una alternativa al experimento de difusión ¹H-RMN por el experimento ¹³C- DEPTSE^[34] para el mismo sistema, en este caso es empleado un núcleo de detección con baja abundancia isotópica lo que garantiza la nula contribución de la RD sobre los experimentos realizados.

4.4 Convección

Los efectos causados por el fenómeno de convección sobre los coeficientes de difusión en el presente trabajo se llevaron a cabo realizando la obtención de coeficientes de difusión para una muestra de ciclohexano puro con dependencia de la temperatura con un rango de trabajo de

temperaturas que se encontraba entre 288K - 328K; los experimentos utilizados fueron las secuencias de pulsos PFG-NMR específicamente, BPPLIED y Oneshot. Todos los experimentos de este apartado se efectuaron en sistemas concéntricos en tubos de RMN de 5.0 mm y 3.0 mm que implica una reducción del diámetro del tubo de RMN.

Todos los experimentos en el rango de temperaturas entre 288K - 328K se realizaron a continuación de manera conjunta haciendo uso de la herramienta “spinning” o rotación de la muestra, la velocidad de trabajo fue 20Hz para todos los experimentos ejecutados.

Por último, se obtuvieron resultados a partir de la realización de experimentos a partir de una secuencia de pulsos específica como lo es la secuencia que posee el bloque de compensación DBPPLIED, para ello no se realizaron modificaciones para el ángulo del primer pulso, ni se utilizó la herramienta “spinning”.

De manera general, en cada serie de experimentos se establecieron los parámetros cruciales para los experimentos de difusión, entre ellos se encuentran el tiempo de difusión (big delta Δ), el tiempo de recuperación, el cual se mantuvo por encima de 10s debido a que al hacer uso de sustancias puras, se debe dejar o garantizar que haya tiempo suficiente para que todos los núcleos puedan relajarse por completo antes de que se tome la siguiente FID (Decaimiento por Inducción Libre), de lo contrario, provocará en las señales una atenuación variable y una integración imprecisa, por otro lado la rampa de intensidad de gradientes se utilizó del 5% al 80% y está de manera progresiva describe la caída exponencial de la intensidad de la señal.

5. RESULTADOS

5.1 Metodología para la calibración del gradiente de campo magnético aplicado

La credibilidad de una medición de difusión está estrechamente relacionada con la precisión con la cual se determina la magnitud del campo magnético aplicado. En principio la magnitud del gradiente puede ser calculado a partir de las dimensiones y geometría del set de bobinas encargadas de generar el mismo.^[31]

En el presente estudio el cálculo de la magnitud del gradiente se realizó empleando dos métodos ampliamente conocidos. El primer método consiste en estimar la intensidad del gradiente a partir de la medición de especies con coeficiente de difusión conocido, por ejemplo D_2O 99.9% ($D = 1.902 \text{ m}^2/\text{s}$) y H_2O desionizada ($D = 2.299 \text{ m}^2/\text{s}$). La magnitud del gradiente fue determinada para cada una de las secuencias de pulsos enumeradas en la *Tabla 1*. Por otra parte, el segundo método consiste en medir el perfil espacial (*Figura 7a*) para una muestra de D_2O 99.9% contenida en un tubo Shigemi CMS (*Figura 7b y 7d*) empleando el experimento z-profile (*Figura 7c*)^[35]. Este último método puede llegar a sufrir de algunos problemas asociados por discontinuidades en la susceptibilidad magnética en los límites del tubo y el pistón sin embargo, cabe aclarar que el tubo utilizado tiene compatibilidad con el D_2O utilizado para dicha calibración.

El experimentos z-profile, está basado en una secuencia spin echo (figura 7c) que incluye un gradiente durante el periodo de codificación y durante el periodo de adquisición. Debido a que el campo magnético varía a lo largo de la muestra y la frecuencia de RMN es proporcional a la intensidad del campo magnético, el espectro de RMN que resulta representa una imagen 1D unidimensional de la muestra. Por lo tanto, el ancho de banda es proporcional a la intensidad del gradiente aplicado (Gz) y a la dimensión de la muestra contenida (L) en su interior (Figura 7, panel D). De manera que la magnitud del gradiente aplicado puede ser conocida a partir de la Ec 10.

$$\Delta\nu = \frac{\gamma G_z L}{2\pi} \quad \text{Ec. 10}$$

Tabla 1. Valores de gradiente de campo obtenidos de las metodologías de calibración

Calibración con solvente de referencia				
Secuencia de pulso	D ₂ O (gauss/cm)	STD	H ₂ O (gauss/cm)	STD
BPPLIED	53.50	0.036	53.63	0.039
DSTE	48.30	0.037	48.54	0.043
ONESHOT	56.11	0.039	56.39	0.042
Calibración con Z-profile				
Secuencia de pulso	Solvente	(gauss/cm)	STD	
Z-profile	D ₂ O	54.17	0.49	

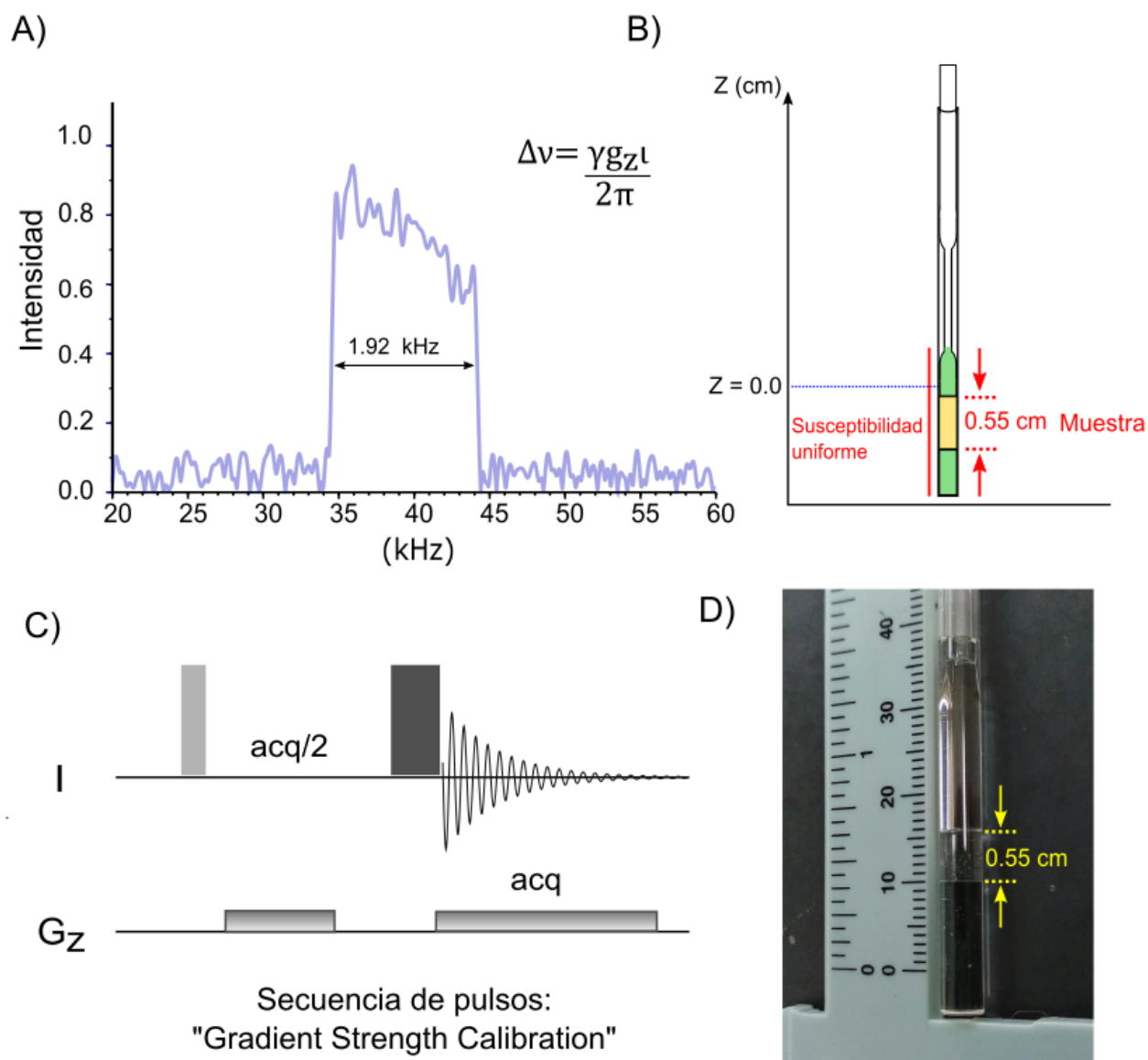


Figura 7. Calibración de la intensidad del gradiente de campo magnético aplicado mediante el experimento z-profile. En el panel a se muestra el perfil espacial de la bobina obtenido a partir del experimento z-profile. El ancho a media altura del perfil espacial permite estimar su valor correspondiente en frecuencia ($\Delta\nu = 1.92$ kHz). En el panel b, se muestra una descripción esquemática del tubo shigemi CMS y la configuración empleada en el presente experimento. El solvente usado (D_2O 99.9%) fue restringido por un pistón dejando así una cantidad de volumen reducida de muestra correspondiente a 0.55 cm de altura. En el panel c se muestra la secuencia de pulsos del experimento z-profile. Finalmente en el panel d se presenta el montaje empleando.

Los resultados obtenidos mediante la metodología de calibración con un compuesto de coeficiente de difusión conocido muestra que la magnitud del gradiente depende principalmente del tipo de secuencia de pulsos empleado. Por otro lado, el segundo método de calibración (Figura 7, panel A), muestra que los valores de coeficientes de difusión presentan un porcentaje de error dentro de un rango del 9 - 11% aproximadamente, lo que podría sugerir un error en naturaleza sistemático y cómo se logra observar en la tabla 2 donde los coeficientes de difusión obtenidos con dicha calibración tendrán un porcentaje de error inferior a 5% respecto a los valores tomados de la literatura cuyos resultados fueron obtenidos mediante la técnica de RMN haciendo uso de un equipo Minispec que trabaja con un campo bajo de 20 MHz^[36]

Cabe señalar que ninguno de los dos métodos mencionados logra explicar adecuadamente el problema instrumental en el que las bobinas generan gradientes que no son constantes sobre el volumen activo de la muestra.^[15] La mayoría de las bobinas de gradientes tienen una zona justamente en el centro donde se obtiene el gradiente más uniforme, pero la naturaleza exacta de cómo varía el gradiente a lo largo del eje z depende principalmente del diseño de esta misma.^[15]

Por lo anterior, al hacer uso de la técnica PFG-RMN se halló una fuente de error que como se mencionó anteriormente está asociado a la variación espacial del gradiente de campo aplicado, ya que, la falta de uniformidad causa desviaciones sobre el coeficiente de difusión medido y también errores en el ajuste por mínimos cuadrados por lo que tendrá una contribución sistemática significativa.^[37] Para el caso particular del presente trabajo se obtuvieron valores diferentes de gradientes con ambas metodologías, sin embargo el método de un estándar de coeficiente de difusión conocido está sujeto a una calibración que toma en consideración los parámetros introducidos en las secuencias de pulsos usadas como se presenta en la tabla 1. Por otro lado, el método de calibración usando z-profile abordaría esta falta de uniformidad de gradiente de campo resultando en una calibración ajustada a imperfecciones instrumentales dejando un error aunque mayor al otro método, es de tipo sistemático ya que en general, los resultados se encuentran alrededor del 11% de error. Así, los efectos causados por la falta de uniformidad de gradientes pueden compensarse de manera parcial cuando los datos de atenuación experimentales son ajustados a la función corregida que relaciona la medida del gradiente y la intensidad de la señal.^[37] Por ejemplo, al conocer los diferentes parámetros utilizados y la ecuación de Stejskal-Tanner de la secuencia de pulso utilizada, es posible hallar la

dependencia de la fuerza del gradiente y utilizar esta información para obtener una forma corregida de la ecuación, por tanto, el factor de corrección debe ser incluido en los ajustes realizados para estimar finalmente el coeficiente de difusión más fiable.^[15]

Tabla 2. Comparación de coeficientes de difusión resultantes al ser procesados con las diferentes calibraciones

C₆H₁₂ T: 298 K		Calibración con Z-profile			Calibración - solvente de referencia D₂O	
Tubo (mm)	Diffusion coefficient 10 ⁻⁹ m ² /s	% Error relativo	STD	Diffusion coefficient 10 ⁻⁹ m ² /s	% Relative error	STD
3.0	1.569	10.18	0.033	1.438	0.9832	0.032

H₂O T: 298 K		Calibración con Z-profile			Calibración - solvente de referencia D₂O	
Tubo (mm)	Coeficiente Difusión 10 ⁻⁹ m ² /s	% Error relativo	STD	Coeficiente Difusión 10 ⁻⁹ m ² /s	% Error relativo	STD
3.0	2.538	10.40	0.045	2.324	1.087	0.039

5.2 Evaluación de los efectos causados por la radiación amortiguada en los experimentos de difusión.

Comúnmente los efectos de radiación amortiguada en los experimentos de PFG NMR suelen mostrar un decaimiento no exponencial en función del gradiente de campo aplicado. Esto puede ser visualizado con mayor facilidad al observar desviaciones en la forma linealizada de la ecuación de Stejskal-Tanner.^[18, 28] Sin embargo, en algunos casos este efecto no se aprecia de esta forma y una análisis más detallado es necesario. En el presente estudio se realizó el seguimiento

de los anchos de línea o “*linewidth*” de la señal en función de la intensidad del gradiente aplicado^[28]. Adicionalmente, se evaluó el efecto del RD bajo diferentes configuraciones reportadas en las figuras 8-10. Los anchos de línea utilizados para la representación de las figuras 8-10 fueron proporcionados o extraídos directamente del software Topspin.

Los efectos ocasionados por la radiación amortiguada fueron evaluados realizando en un primer paso una reducción en el ángulo de excitación del primer pulso en la secuencia. La reducción del ángulo de rotación del primer pulso garantiza una disminución del efecto causado por el RD pues solo una parte de la magnetización es transferida al plano *xy* donde el efecto de RD tiene lugar Connell et. al (2004). En la figura 8, se observó un mayor ensanchamiento del ancho de línea al momento de emplear un ángulo de 90° en comparación al ángulo de 15°, es decir, que se genera una atenuación de los efectos ocasionados por RD al reducir el ángulo.

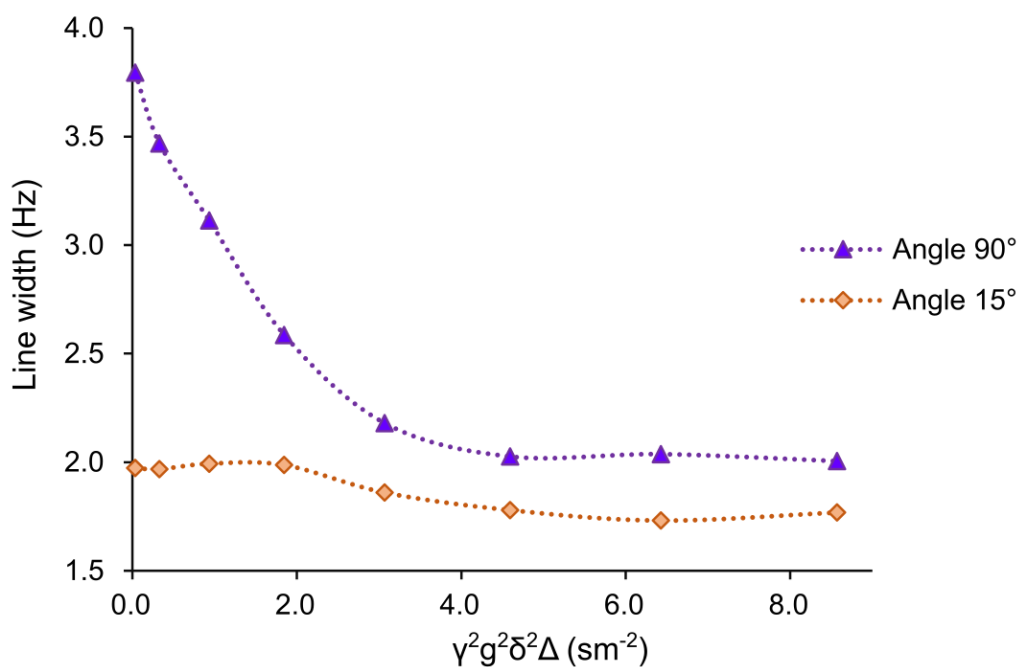


Figura 8. Efecto en la reducción del ángulo de excitación para el pulso inicial. Comparación de los resultados obtenidos empleando un pulso inicial de 90° y un pulso de 15° en la secuencia Oneshot. La temperatura elegida fue 298K para una muestra de H₂O en tubo de 3.0 mm de diámetro.

Adicionalmente, se analizó la variación de la cantidad de muestra efectuando una reducción en el diámetro del tubo de RMN como se muestra en la figura 9. Para realizar la comparación entre los

diferentes sistemas, los experimentos fueron obtenidos a temperatura ambiente (aproximadamente 294 K) para minimizar posibles contribuciones asociadas a la convección. Los resultados obtenidos muestran, una clara relación entre la reducción del diámetro de tubo y un mayor grado de atenuación del efecto ocasionado por el (RD) (figura 9). A medida que se reduce el diámetro de tubo el efecto del ancho de línea se ve considerablemente reducido aún cuando se realizan los experimentos con un ángulo inicial de 90° pues los efectos de RD ocasionan una fuerte interacción entre la magnetización del solvente y la corriente inducida por la bobina de radiofrecuencia.^[28] Adicionalmente, el efecto de RD puede causar errores de fase cercanos a los bordes de los picos en el espectro NMR aun con una baja intensidad de gradiente lo que conduce a que el coeficiente de autodifusión estimado esté ligeramente sesgado.^[11]

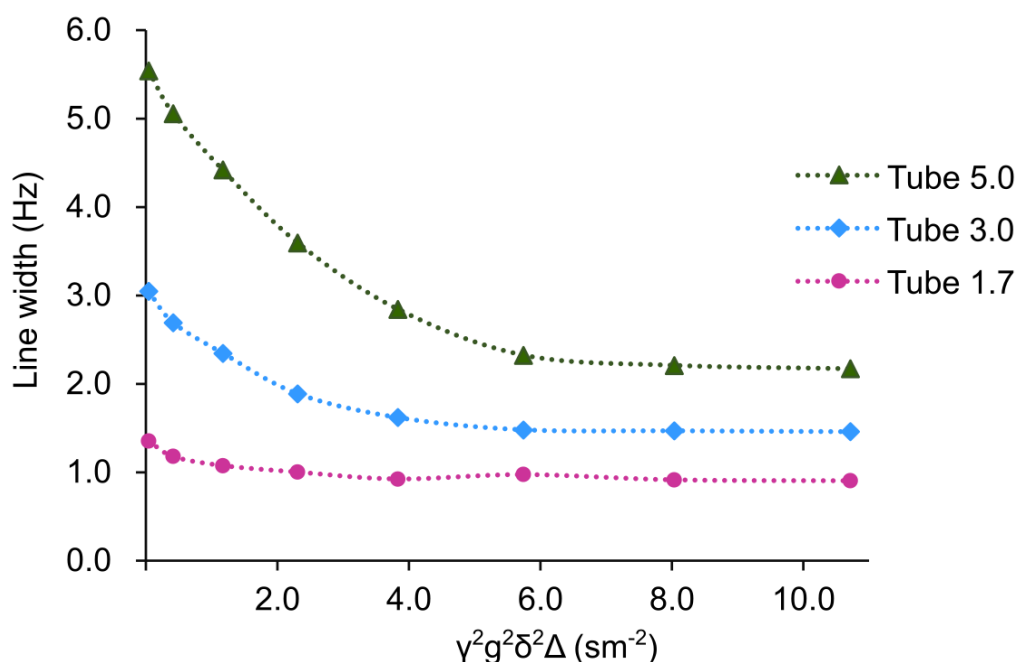


Figura 9. Reducción del diámetro en el tubo RMN y su impacto sobre el RD. Comparación de los resultados experimentales utilizando diferentes diámetros de tubos (5.0, 3.0, 1.7 mm), con un pulso inicial de 90° en la secuencia Oneshot, a temperatura ambiente del equipo (294 K sin sistema de regulación), para una muestra de H₂O.

Finalmente, para observar el impacto causado por la radiación amortiguada, se realizaron experimentos de RMN con una muestra de ciclohexano, a una temperatura de 298 K. Se emplearon las secuencias Oneshot y ¹³C-NMR DEPTSE (Distortionless Enhancement by

Polarization Transfer (DEPT)) en tubos de 3.0 mm diámetro como se muestra en la figura 10. Con el fin de comparar el efecto causado por el RD, se realizó la reducción de ángulo para los experimentos realizados con la secuencia de pulsos Oneshot y la secuencia DEPTSE. El resultado obtenido muestra una disminución del efecto de (RD) con la reducción del ángulo de excitación en la secuencia ONESHOT. Por otra parte, se logra observar que la secuencia ^{13}C -DEPTSE presenta poca o nula presencia del efecto de RD debido a la baja abundancia de ^{13}C y como se representa en la figura 10, no se observa un cambio apreciable en su ancho de línea o “*linewidth*” en sus espectros a lo largo de un mismo experimento. Los resultados sugieren que esta secuencia puede ser una alternativa fiable para el estudio de sustancias orgánicas puras de interés o incluso mezclas que lo requieran.

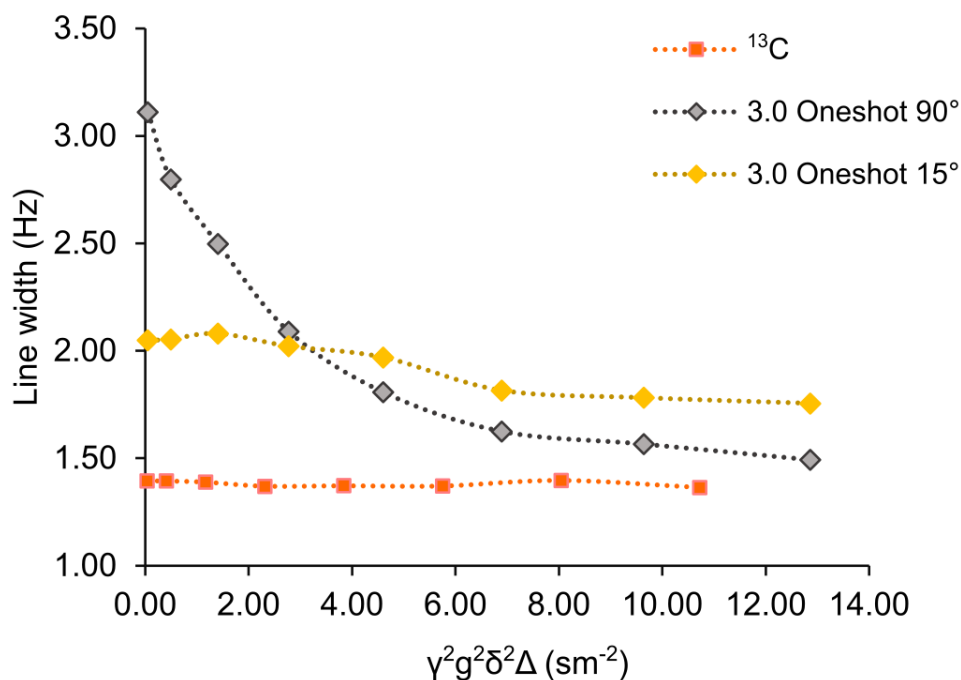


Figura 10. Comparación del efecto de RD en tubos de 3.0 mm con diferente ángulo de pulso inicial y secuencia de pulsos ^{13}C . Comparación de los resultados de los experimentos utilizando un pulso inicial de 90° y un pulso de 15° en la secuencia Oneshot para una muestra de ciclohexano en tubo de 3.0 mm de diámetro a 298K. Adicionalmente, se compara la secuencia DEPTSE con detección en el núcleo de carbono para mitigar los efectos de la radiación amortiguada.

El estudio de los efectos de RD bajo las diferentes condiciones indican un ancho de línea mayor para intensidades de gradiente bajas. Sin embargo, una reducción en el ancho de línea es observado a medida que aumenta la atenuación de la señal, lo que implica una mejoría en las alturas de los picos con gradientes de mayor intensidad, conduciendo a un coeficiente de difusión reducido^[10], para constatar como el resultado final del coeficiente de difusión es afectado se presenta en la tabla 3, una comparación entre los experimentos con diferente ángulo (90° / 15°) y diferentes diámetros de tubo de RMN, Los resultados obtenidos mediante la secuencia DEPTSE, muestra una marcada diferencia principalmente para el caso del experimento a 90° en tubo de RMN de 3.0 mm respecto a las demás variaciones o configuraciones.

Tabla 3. Comparación de coeficientes de difusión resultantes mediante diferentes configuraciones, procesamiento de datos por altura o intensidad de señal.

Calibración de gradiente con Z-profile, Temperatura= 298 K							¹³ C		
Tubo	Coeficiente Difusión*	Error relativo	STD	Coeficiente Difusión+	Error relativo	STD	Coeficiente Difusión	Error relativo	STD
(mm)	10 ⁻⁹ m ² /s	%	10 ⁻⁹ m ² /s	10 ⁻⁹ m ² /s	%	10 ⁻⁹ m ² /s	10 ⁻⁹ m ² /s	%	10 ⁻⁹ m ² /s
1.7	1.506	5.758	0.032	1.523	6.952	0.033	-	-	-
3.0	1.532	7.584	0.032	1.356	- 4.775	0.034	1.558	9.410	0.033

* 15°

+ 90°

Adicionalmente, vale la pena resaltar que en el presente trabajo se llevó a cabo el procesamiento de los datos mediante la integración del área de la señal correspondiente, siendo esta menos susceptible a los efectos de RD lo que causaría que la integración y la precisión del dato se tornan menos confiables. Así, los efectos ocasionados por el ensanchamiento de las señales se traducen en una reducción en la altura de la misma, por lo tanto su proporcionalidad con la cantidad de protones presentes es subestimada, pues la altura la cantidad de protones y el número de protones está representado por el área del pico y no por la altura. Para comparar la diferencia que existe entre los diferentes procesamientos, se presentan las tablas 3 y 4: En el caso de la

medición por la altura de la señal se tienen los valores reportados en la tabla 3. Esta forma de procesamiento permite observar un efecto más evidente ocasionado por el RD sobre los resultados. En tanto para el procesamiento que implica la integración por área, se presentan los resultados en la tabla 4 en la cual en todos los datos presentados se mantienen en el mismo orden de magnitud y con un porcentaje de error relativo cercano entre ellos.

Tabla 4. Comparación de coeficientes de difusión resultantes mediante diferentes configuraciones, procesamiento de datos por área de señal.

Calibración de gradiente con Z-profile, Temperatura= 298 K							¹³ C		
Tubo	Coeficiente Difusión*	Error relativo	STD	Coeficiente Difusión +	Error relativo	STD	Coeficiente Difusión	Error relativo	STD
(mm)	10 ⁻⁹ m ² /s	%	10 ⁻⁹ m ² /s	10 ⁻⁹ m ² /s	%	10 ⁻⁹ m ² /s	10 ⁻⁹ m ² /s	%	10 ⁻⁹ m ² /s
1.7	1.562	9.691	0.037	1.567	10.04	0.034	-	-	-
3.0	1.578	10.81	0.035	1.573	10.46	0.035	1.560	9.551	0.033

* 15°

+ 90°

5.3 Estudio de estrategias para la atenuación de la convección.

Existe una dependencia del coeficiente de difusión con la temperatura, este efecto se logra observar en la figura 11 para las diferentes representaciones o mediciones realizadas dentro de los límites de temperaturas estudiados (288 K-328 K). En el panel A y C de la figura 11 el efecto de la convección se logra apreciar a las temperaturas más altas sin tener en cuenta la rotación de la muestra, evidenciando el impacto causado por la convección siendo aún más apreciable a temperaturas altas por su tendencia creciente, por otro lado, en los paneles B y D, se muestra la diferencia representada en porcentaje de error relativo respecto al valor esperado o tomado como valor de literatura según Holz et al. (2000).

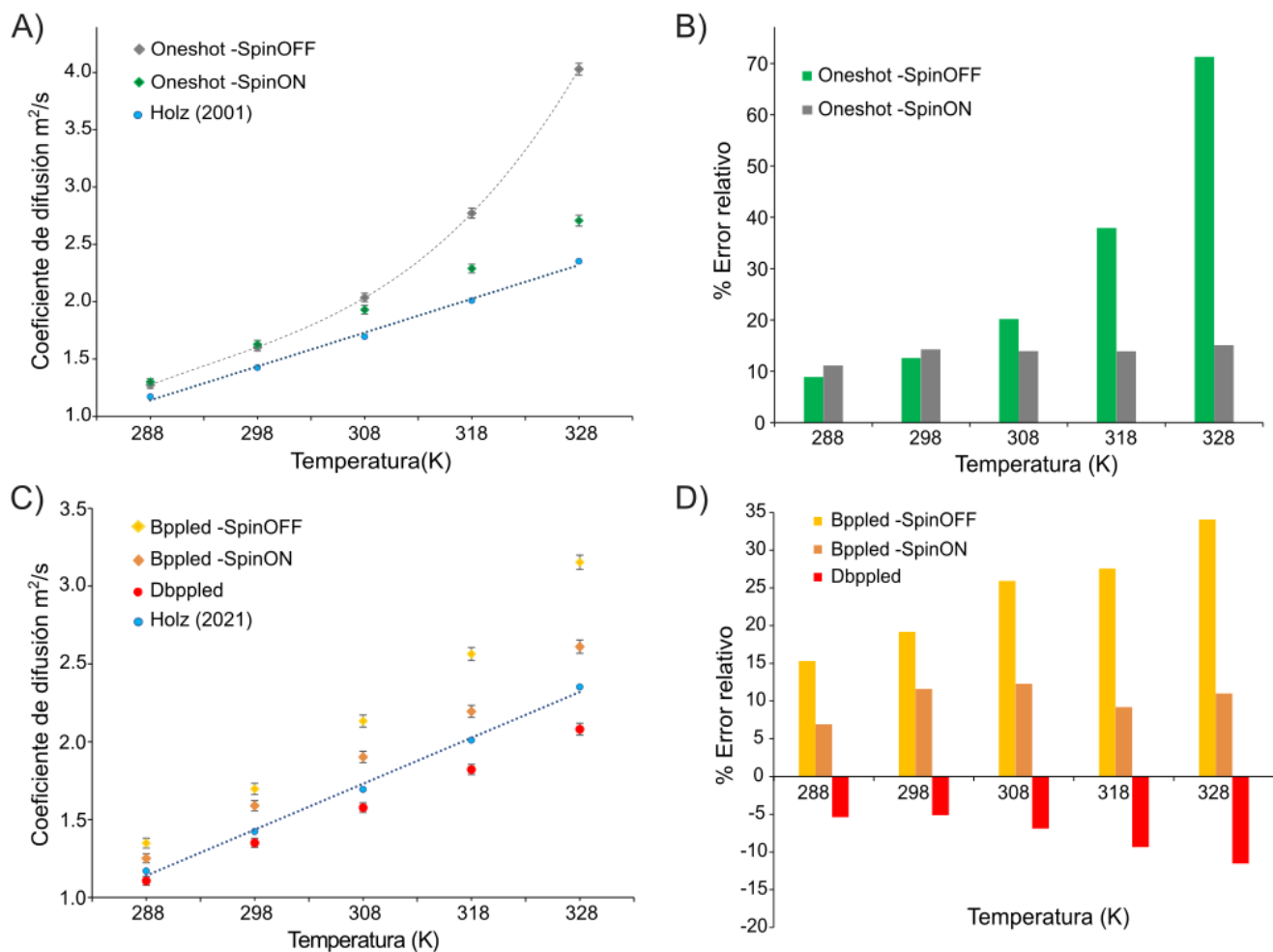


Figura 11. Efecto de convección sobre el sistema de ciclohexano. En el panel a) se presentan los coeficientes de difusión obtenidos en un rango de temperatura 288-328 K con las secuencias de pulsos Oneshot (con rotación y sin rotación). En el panel b) se muestra el porcentaje de error relativo respecto al valor tomado como referencia de Holz (2000). En el panel c) se reporta los coeficientes de difusión obtenidos con las secuencias BPPLIED (con rotación y sin rotación) junto con la secuencia Double stimulated echo for convection compensation. En el panel d) el porcentaje de error relativo respecto al valor tomado como referencia de Holz (2000) es reportado. Dichos experimentos se realizaron en un sistema coaxial con una muestra de ciclohexano en su interior y D_2O en el tubo externo.

Para lograr la atenuación del flujo convectivo se optó en primer lugar por la rotación de la muestra. La efectividad de la rotación se atribuye al efecto Coriolis^[37], el cual genera una fuerza centrífuga que cambia la dirección de la convección contrarrestando el efecto convectivo sobre

los valores de coeficientes de difusión obtenidos^[23]. Con este procedimiento se logra una disminución de los valores de coeficientes de difusión y por tanto de sus porcentajes de error relativos como se muestra en la figura 11 donde se representa la diferencia entre los experimentos realizados sin rotación (por su tendencia creciente) y los experimentos realizados con rotación (por su tendencia continua y lineal), para estas mediciones los experimentos se repitieron bajo las mismas condiciones en primera instancia sin rotación y en segunda instancia, realizando de manera adicional la rotación de la muestra que para este y todos los casos la velocidad de rotación de la muestra fue de 20 Hz. En la figura 11 en el panel A y C, se muestra como los valores obtenidos experimentalmente pueden verse afectados por una sobreestimación del coeficiente de difusión especialmente cuando se trabaja a altas temperaturas. Tal como se mencionó anteriormente se observa cómo dicho efecto se logra contrarrestar mediante la rotación de la muestra para la secuencia de pulsos Oneshot y BPPLIED. La comparación respecto a los valores dados por Holz et al (2001) confirman que utilizando la rotación de la muestra se obtienen coeficientes de difusión rangos de error relativos menores a los reportados en los paneles B y D.

En segundo lugar, se usó la secuencia de pulsos DBPPLED que es específica para la atenuación de los efectos por convección, los resultados obtenidos con el experimento se presentan en la figura 11, panel C. Una diferencia negativa respecto a los valores de coeficientes de difusión reportados por Holz et al (2000) es observada en este caso. Aunque es claro que casi todas las mediciones de difusión realizadas con secuencias de pulsos que no logran compensar el efecto de convección son vulnerables a errores; desafortunadamente, las secuencias con compensación de convección no son las más efectivas, el mayor número de pulsos de gradiente requerido conduce a mayores errores sistemáticos como se observa en los resultados experimentales, también, aumenta las perturbaciones de campo, y en muchas ocasiones, se prefiere usar una muestra con menor volumen que usar una secuencia con compensación por convección pues será más efectivo. Las secuencias compensadas usan ecos estimulados que sacrifican más de la mitad de la señal disponible y requieren ciclos de fase extensos para obtener mejores resultados.^[13, 24] Es preciso señalar que el efecto de la pérdida de señal que se produce adicionalmente por cualquier movimiento en la muestra a velocidad constante se puede compensar colocando un segundo par de gradientes iguales, sin embargo, una limitación del uso de esta secuencia de pulsos es que sólo

compensa los efectos de convección con un perfil de flujo constante laminar, o sea, no compensa los efectos de convección con perfil de flujo turbulento.^[23]

Adicionalmente, estudios previos realizados por Hayamizua y Price (2004) indican que el uso de un tubo de menor diámetro disminuye los efectos por convección^[38] y para verificarlo se preparó un muestra de ciclohexano a diferentes diámetros. Adicionalmente, el efecto que tiene la rotación sobre los resultados en la búsqueda de lograr atenuar la convección, también de manera suplementaria se evaluó la dependencia de la rotación con la variación del tiempo o plazo de difusión (Δ) para los diferentes casos como se representa en la figura 12. Como resultado y realizando una comparación de los coeficientes de difusión obtenidos en los tubos de RMN de diferentes diámetros 5.0 mm y 3.0 mm en los cuales se encontraba contenida la muestra, resulta en una evidente dependencia de la rotación con respecto a los valores del tiempo de difusión (Δ (ms)), el valor de tiempo de difusión tiene un error asociado mayor en los valores de los extremos para ambos casos y aunque la rotación logra minimizar o atenuar los efectos de convección, en el tubo de menor diámetro 3.0 mm se observa un mayor efecto resultante de la rotación respecto a un tubo de 5.0 mm de diámetro, dejando claro que existe una dependencia en algunos rangos para valores de big delta o Δ especialmente cuando son usados tubos de RMN de 5.0 mm de diámetro.^[23,31]

La rotación de la muestra produce una estimación más confiable del coeficiente de difusión cuando existe una contribución por convección.^[23, 39] Sin embargo, la velocidad de rotación y los periodos de difusión deben estar sincronizados de manera que el tubo de RMN coordine un número entero de N ciclos completos entre los gradientes de desfase y refocalización, esto para evitar cualquier desplazamiento neto de las moléculas a lo largo de la dirección del gradiente aplicado debido al cambio de posición de la partícula a través de la rotación; pues en caso contrario habría pérdida de la señal y, por lo tanto, daría como resultado un coeficiente de difusión aparente o erróneo.^[23]

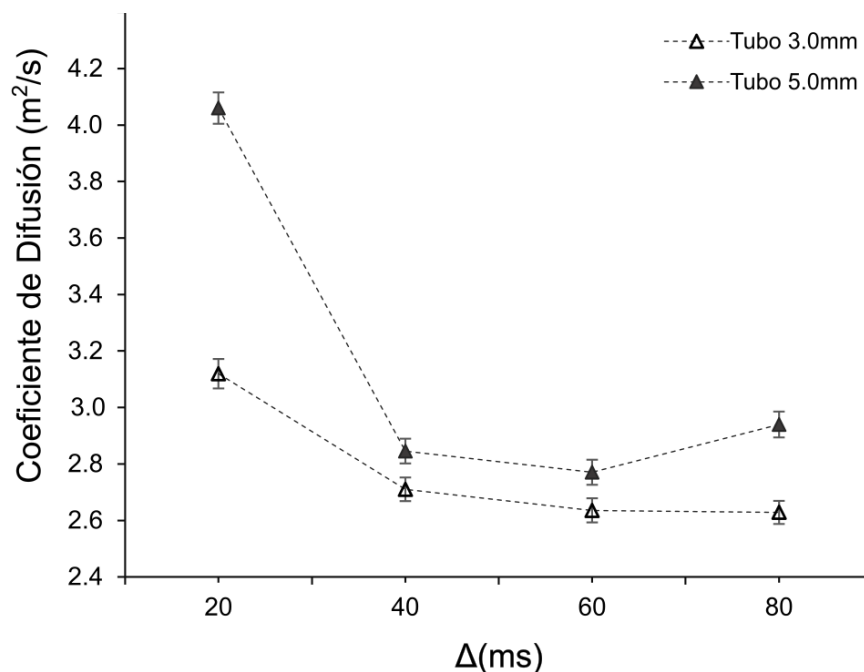


Figura 12. Efecto de la rotación o “spinning” para diferentes diámetros. Los coeficientes de difusión obtenidos para diferentes valores de Δ (ms) bajo rotación en tubos de 3.0 mm y 5.0 mm de diámetro son presentados. Una solución de Ciclohexano/cloroformo es empleada como sistema de referencia. La temperatura fue ajustada a 308K para facilitar la visualización de los efectos ocasionados por la convección.

Procesamiento. Los espectros obtenidos fueron procesados inicialmente usando el software Topspin (Bruker, Rheinstetten), donde se obtienen los datos que conforman la FID (caída libre de la inducción). Una vez adquiridas las señales, se realiza la transformada de Fourier para obtener el espectro en el espacio de frecuencia. Además, una función exponencial fue empleada para apodizar la señal con valor de $LB=3.0$; la corrección de línea base fue realizada haciendo uso de rutinas automáticas incluidas en el software Topspin 3.6.4 (Bruker, Rheinstetten). Finalmente el análisis de datos e integración fue realizado usando rutinas desarrolladas en el software SCILAB 5.5.2.

6. Conclusiones

Una metodología destinada a la determinación de los coeficientes de autodifusión en sustancias puras o en alta concentración por RMN es presentada.

La calibración de los gradientes de campo empleando el experimento z-profile permite obtener resultados con margen de error inferiores al 11%. En el caso de la calibración empleando una sustancia de coeficiente de difusión conocido nuestros resultados revelan una clara dependencia del valor de gradiente de campo aplicado con el tipo de secuencia de pulsos elegidas. Esta metodología presenta porcentajes de error menores en comparación con el método previamente mencionado, estos porcentajes de error están en promedio alrededor del 5%.

Los efectos causados por la radiación amortiguada son atenuados a través de la reducción del ángulo de excitación para la secuencia de pulsos elegida. Empleando esta estrategia solo una parte de la magnetización es transferida al plano xy donde el efecto de radiación amortiguada tiene lugar. Adicionalmente, la reducción del diámetro del tubo de RMN logra reducir la cantidad de protones disponibles en la región activa atenuando adicionalmente los efectos asociados con la radiación amortiguada.

Para garantizar una contribución mínima de radiación amortiguada en los experimentos de difusión se opta por evaluar un núcleo de poca abundancia, lo cual garantiza una baja concentración de núcleos activos y por tanto una menor transferencia de magnetización al plano xy en comparación al ^1H -RMN. En el presente trabajo se propone la implementación del experimento de difusión basado en el núcleo de ^{13}C el cual presenta una contribución despreciable del RD en comparación con las secuencias basadas en la detección de ^1H .

Al estudiar los coeficientes de difusión en un amplio rango de temperaturas se encuentran los efectos ocasionados por la convección, la cual se logra atenuar con la reducción del diámetro del tubo de RMN. Adicionalmente, la rotación de la muestra o “spinning” logra contrarrestar el flujo convectivo de manera efectiva convirtiéndose en una herramienta simple para lidiar con los

efectos de la convección. Finalmente, la secuencia de pulsos que contiene el bloque de compensación, presenta errores de tipo sistemático y solo compensa la convección cuando existen perfiles de flujo laminar. La presencia de perfiles de flujos turbulentos ocasionan una pérdida de señal que se correlaciona con coeficientes de difusión mucho menores de los esperados.

La forma adecuada para estudiar los sistemas de sustancias puras o altamente concentradas en un amplio rango de temperaturas consiste en una serie de pasos que en conjunto brindan coeficientes de difusión confiables. En primer lugar la correcta calibración de gradientes de campo es un factor esencial, para ello se brinda dos metodologías ampliamente usadas y confiables en la cual la calibración con un estándar brinda valores cercanos a la literatura y por tanto porcentajes de error menores que la calibración basada en la secuencia de pulsos de interés. En segundo lugar, para evitar los efectos de radiación amortiguada asociado a la alta concentración se sugiere la reducción del ángulo de nutación para el primer pulso. Adicionalmente, emplear un diámetro de tubo reducido (1.7 mm) donde la radiación amortiguada es atenuada y la convección es despreciable. Para lograr trabajar en un amplio rango de temperatura es necesario el uso de rotación o “spinning” de la muestra para mitigar los efectos de convección en los experimentos. Finalmente, se da una alternativa para el estudio de sustancias puras orgánicas donde la obtención de coeficientes de difusión puede ser a través del uso de esquemas de adquisición en ^{13}C que por su baja abundancia isotópica tendría una contribución casi nula para de radiación amortiguada.

7. Bibliografía

- [1] MacDonald, T. S. C., Price, W. S., & Beves, J. E. (2019). Time-Resolved Diffusion NMR Measurements for Transient Processes. *Chem Phys Chem*, 20(7), 926–930. <https://doi.org/10.1002/cphc.201900150>
- [2] Nicolay, K., Braun, K. P. J., Graaf, R. A. de, Dijkhuizen, R. M., & Kruiskamp, M. J. (2001). Diffusion NMR spectroscopy. *NMR in Biomedicine*, 14(2), 94–111. <https://doi.org/10.1002/nbm.686>
- [3] Johnson, C. S., & Wu, D. (2011). Diffusion Measurements by Magnetic Field Gradient Methods. In *Encyclopedia of Magnetic Resonance*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470034590.emrstm0118.pub2>
- [4] Zheng, G., & Price, W. S. (1996). Environmental NMR: Diffusion Ordered Spectroscopy Methods. In *eMagRes* (pp. 561–574). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470034590.emrstm1336>
- [5] Bellaire, D., Kiepfer, H., Münnemann, K., & Hasse, H. (2020). PFG-NMR and MD Simulation Study of Self-Diffusion Coefficients of Binary and Ternary Mixtures Containing Cyclohexane, Ethanol, Acetone, and Toluene. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 65(2), 793–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.9b01016>
- [6] Suárez-Iglesias, O., Medina, I., Sanz, M. de los Á., Pizarro, C., & Bueno, J. L. (2015). Self-Diffusion in Molecular Fluids and Noble Gases: Available Data. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 60(10), 2757–2817. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.5b00323>
- [7] Gupta, A., Stait-Gardner, T., & Price, W. S. (2021). NMR imaging and diffusion. *Adsorption*, 27(3), 503–533. <https://doi.org/10.1007/s10450-021-00298-9>
- [8] Hahn, E. L. (1950). Spin Echoes. *Physical Review*, 80(4), 580–594. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.80.580>
- [9] Carr, H. Y., & Purcell, E. M. (1954). Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *Physical Review*, 94(3), 630–638. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.94.630>
- [10] Sinnaeve, D. (2012). The Stejskal-Tanner equation generalized for any gradient shape-an overview of most pulse sequences measuring free diffusion. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 40A(2), 39–65. <https://doi.org/10.1002/cmr.a.21223>

- [11] Steimers, E., Matviychuk, Y., Holland, D. J., Hasse, H., & von Harbou, E. (2022). Accurate measurements of self-diffusion coefficients with benchtop NMR using a QM model-based approach. *Magnetic Resonance in Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/mrc.5300>
- [12] Price, W. S. (2009). *NMR Studies of Translational Motion*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511770487>
- [13] Hamdoun, G., Guduff, L., van Heijenoort, C., Bour, C., Gandon, V., & Dumez, J.-N. (2018). Spatially encoded diffusion-ordered NMR spectroscopy of reaction mixtures in organic solvents. *The Analyst*, 143(14), 3458–3464. <https://doi.org/10.1039/C8AN00434J>
- [14] Morris, K. F., & Johnson, C. S. (1992). Diffusion-ordered two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 114(8), 3139–3141. <https://doi.org/10.1021/ja00034a071>
- [15] Evans, R., Dal Poggetto, G., Nilsson, M., & Morris, G. A. (2019). Improving the Interpretation of Small Molecule Diffusion Coefficients: Quantitative Use of Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 90(6), 3987–3994. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05032>
- [16] Stejskal, E. O., & Tanner, J. E. (1965). Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *The Journal of Chemical Physics*, 42(1), 288–292. <https://doi.org/10.1063/1.1695690>
- [17] Botana, A., Aguilar, J. A., Nilsson, M., & Morris, G. A. (2011). J-modulation effects in DOSY experiments and their suppression: The Oneshot45 experiment. *Journal of Magnetic Resonance*, 208(2), 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2010.11.012>
- [18] Price, W. S., Stilbs, P., Jönsson, B., & Söderman, O. (2001). Macroscopic Background Gradient and Radiation Damping Effects on High-Field PGSE NMR Diffusion Measurements. *Journal of Magnetic Resonance*, 150(1), 49–56. <https://doi.org/10.1006/jmre.2001.2316>
- [19] Evans, R. (2020). The interpretation of small molecule diffusion coefficients: Quantitative use of diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 117, 33–69. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2019.11.002>
- [20] Barbosa, T. M., Rittner, R., Tormena, C. F., Morris, G. A., & Nilsson, M. (2016). Convection in liquid-state NMR: expect the unexpected. *RSC Advances*, 6(97), 95173–95176. <https://doi.org/10.1039/C6RA23427E>
- [21] Getling, A. V. (1998). *Rayleigh-Benard Convection: Structures and Dynamics*. World Scientific.

- [22] Goux, W. J., Verkruyse, L. A., & Saltert, S. J. (1990). The impact of Rayleigh-Benard convection on NMR pulsed-field-gradient diffusion measurements. *Journal of Magnetic Resonance* (1969), 88(3), 609–614. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(90\)90292-H](https://doi.org/10.1016/0022-2364(90)90292-H)
- [23] Esturau, N., Sánchez-Ferrando, F., Gavin, J. A., Roumestand, C., Delsuc, M.-A., & Parella, T. (2001). The Use of Sample Rotation for Minimizing Convection Effects in Self-Diffusion NMR Measurements. *Journal of Magnetic Resonance*, 153(1), 48–55. <https://doi.org/10.1006/jmre.2001.2411>
- [24] Swan, I., Reid, M., Howe, P. W. A., Connell, M. A., Nilsson, M., Moore, M. A., & Morris, G. A. (2015). Sample convection in liquid-state NMR: Why it is always with us, and what we can do about it. *Journal of Magnetic Resonance*, 252, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2014.12.006>
- [25] Jerschow, A., & Müller, N. (1997). Suppression of Convection Artifacts in Stimulated-Echo Diffusion Experiments. Double-Stimulated-Echo Experiments. *Journal of Magnetic Resonance*, 125(2), 372–375. <https://doi.org/10.1006/jmre.1997.1123>
- [26] Jerschow, A., & Müller, N. (1998). Convection Compensation in Gradient Enhanced Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, 132(1), 13–18. <https://doi.org/10.1006/jmre.1998.1400>
- [27] Mao, X. (2020). Calculation of the energy transferred by radiation damping from nuclear spin system to receiver coil in NMR. *Chemical Physics Letters*, 756, 137853. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2020.137853>
- [28] Connell, M. A., Davis, A. L., Kenwright, A. M., & Morris, G. A. (2004). NMR measurements of diffusion in concentrated samples: avoiding problems with radiation damping. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(6), 1568–1573. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2387-y>
- [29] Krishnan, V. V., & Murali, N. (2013). Radiation damping in modern NMR experiments: Progress and challenges. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 68, 41–57. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2012.06.001>
- [30] Mao, X.-A., & Ye, C.-H. (1997). Understanding radiation damping in a simple way. *Concepts in Magnetic Resonance*, 9(3), 173–187. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0534\(1997\)9:3<173::AID-CMR4>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0534(1997)9:3<173::AID-CMR4>3.0.CO;2-W)

- [31] Claridge, T. D. W. (2016). Diffusion NMR Spectroscopy. In *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry* (pp. 381–419). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099986-9.00010-5>
- [32] Wu, D. H., Chen, A. D., & Johnson, C. S. (1995). An Improved Diffusion-Ordered Spectroscopy Experiment Incorporating Bipolar-Gradient Pulses. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, 115(2), 260–264. <https://doi.org/10.1006/jmra.1995.1176>
- [33] Pelta, M. D., Morris, G. A., Stchedroff, M. J., & Hammond, S. J. (2002). A one-shot sequence for high-resolution diffusion-ordered spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 40(13), S147–S152. <https://doi.org/10.1002/mrc.1107>
- [34] Botana, A., Howe, P. W. A., Caër, V., Morris, G. A., & Nilsson, M. (2011). High resolution ¹³C DOSY: The DEPTSE experiment. *Journal of Magnetic Resonance*, 211(1), 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2011.03.016>
- [35] Seedhouse, S. J., & Hoffmann, M. M. (2008). Magnetic Field Gradient Calibration as an Experiment To Illustrate Magnetic Resonance Imaging. *Journal of Chemical Education*, 85(6), 836. <https://doi.org/10.1021/ed085p836>
- [36] Holz, M., Heil, S. R., & Sacco, A. (2000). Temperature-dependent self-diffusion coefficients of water and six selected molecular liquids for calibration in accurate ¹H NMR PFG measurements. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2(20), 4740–4742. <https://doi.org/10.1039/b005319h>
- [37] Connell, M. A., Bowyer, P. J., Adam Bone, P., Davis, A. L., Swanson, A. G., Nilsson, M., & Morris, G. A. (2009). Improving the accuracy of pulsed field gradient NMR diffusion experiments: Correction for gradient non-uniformity. *Journal of Magnetic Resonance*, 198(1), 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2009.01.025>
- [38] Stephens, F. S. (1975). Coriolis effects and rotation alignment in nuclei. *Reviews of Modern Physics*, 47(1), 43–65. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.47.43>
- [39] Hayamizu, K., & Price, W. S. (2004). A new type of sample tube for reducing convection effects in PGSE-NMR measurements of self-diffusion coefficients of liquid samples. *Journal of Magnetic Resonance*, 167(2), 328–333. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2004.01.006>
- [40] Lounila, J., Oikarinen, K., Ingman, P., & Jokisaari, J. (1996). Effects of Thermal Convection on NMR and Their Elimination by Sample Rotation. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, 118(1), 50–54. <https://doi.org/10.1006/jmra.1996.0008>