



Gruppo Interdivisionale  
Risonanze Magnetiche



## DOSY, ma a cosa serve? (seconda parte)

**D**opo aver visto cosa è un esperimento DOSY, vediamo ora come acquisirne e processarne uno.

I requisiti strumentali per poter acquisire un esperimento DOSY non sono particolarmente restrittivi: per quanto riguarda l'hardware sono necessari solo uno strumento ad alto campo e un probe a gradienti (commerciale). Tuttavia ottenere buoni risultati con molecole a basso peso molecolare e/o con pesi molecolari simili, è più complicato, in quanto occorre avere alta risoluzione in entrambe le dimensioni. Infatti molecole piccole avranno coefficienti di diffusione simili, mentre è alto il rischio di sovrapposizione dei segnali. La qualità dei coefficienti calcolati peggiora molto in caso di sovrapposizione, in quanto il valore calcolato è in realtà la media pesata dei coefficienti dei singoli componenti. Per ottenere alta risoluzione è ovviamente necessario ridurre gli errori che, in un esperimento DOSY, sono dovuti principalmente ad imperfezioni nei gradienti e a fenomeni di convezione. In pratica è importante ottenere segnali in puro assorbimento e minimizzare le perturbazioni dovute agli after effect dei gradienti. Per ottenere questo è necessario avere un probe a gradienti di alta qualità, che incorpori un buon sistema di schermaggio, con gradienti costanti su tutta l'area del campione e in grado di coprire in modo uniforme una finestra di almeno 10 ppm. I probe commerciali si avvicinano a queste specifiche anche se non arrivano alla idealità, mentre il problema maggiore rimane quello delle perturbazioni (dette eddy current) indotte dai gradienti nelle strutture metalliche circostanti del probe e del magnete. Queste correnti a loro volta inducono dei campi magnetici nel campione, portando a variazioni di fase e quindi a distorsioni nello spettro. Per minimizzare tali effetti occorre scegliere attentamente parametri e sequenza. Fra le varie sequenze riportate in letteratura noi abbiamo utilizzato per tutti i nostri esperimenti DOSY la *bppste* (Figura 1). Anche la scelta dei parametri è particolarmente delicata. Ecco un breve riepilogo dei fattori più sensibili sulla base della nostra esperienza e di quanto riportato in letteratura:

- $d1$ :  $1-2 T_1$ , sufficiente per avere steady state prima dell'acquisizione. Infatti per il DOSY è sufficiente che tutte le acquisizioni inizino con la stessa magnetizzazione longitudinale e non che gli spin siano completamente rilassati.
- *dummy scan*: sono importanti per evitare variazioni di temperatura provocate dai gradienti (soprattutto ad alta potenza), che possono influire sia sui chemical shift che sulla velocità di diffusione.
- $\delta$ : a parità di area gradiente (ricordiamo che l'area del gradiente è data dal prodotto di durata per potenza) è meglio utilizzare alta potenza e ridurre la durata in quanto durante questo intervallo si ha evoluzione delle costanti di accoppiamento.
- $\Delta$ : il delay di diffusione deve essere il più breve possibile (compatibilmente con le proprietà dei prodotti in esame) per ridurre i fenomeni di convezione.

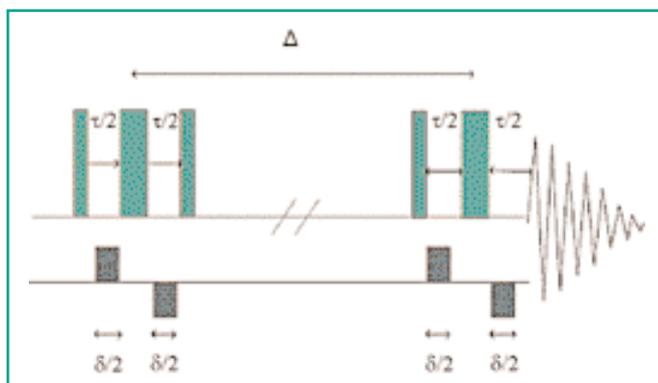


Figura 1 - Sequenza *bppste* (D.H. Wu, A.D. Chen, C.S. Johnson, J. Magn. Reson., 1995, Ser. A 115, 260)

- *volume del campione*: per lo stesso motivo è meglio lavorare con un volume ridotto di campione (nel caso di strumenti Varian è consigliabile usare 0,6 ml, che è anche il volume del campione di  $D_2O$  utilizzato per la calibrazione dei gradienti).
- *nt*: il numero di scansioni consigliato con questa sequenza è di 256, ma almeno con campioni semplici noi non abbiamo notato differenze apprezzabili rispetto ad esperimenti acquisiti con  $nt=16$ .

Per gli utenti di strumenti Varian, il set-up di un esperimento DOSY è molto semplice: una volta ottenuto lo spettro protonico del prodotto e calibrato il  $90^\circ$  è sufficiente richiamare la sequenza *bppste*. I parametri da inserire sono pochi: il delay di diffusione, la durata del gradiente e l'array di potenze (questi parametri vanno calibrati sulla base del proprio strumento e della massa dei prodotti in esame). Terminata l'acquisizione e trasformati gli incrementi, il software (richiamato con il comando *dosy*) è in grado di effettuare direttamente il fitting delle intensità dei segnali e successivamente di costruire lo spettro pseudo 2D. Alternativamente (non avendo il software a disposizione) è possibile misurare manualmente l'intensità dei segnali di interesse nei vari incrementi, per poi interpolarli con appositi programmi. Anche gli strumenti Bruker sono equipaggiati con analoghi programmi e gli utenti possono cercare nei manuali i comandi corrispondenti. Vari metodi per ridurre gli errori sistematici (migliorando la linea di base e eliminando le componenti in antifase) possono essere utilizzati (come *baseline correction* e *reference deconvolution*), soprattutto qualora la risoluzione sia un fattore critico, ad esempio per prodotti con coefficienti di diffusione simili. Le potenzialità della tecnica sono innumerevoli; per esempio è area di sviluppo ancora aperta la combinazione del DOSY con altri esperimenti bidimensionali. Sono apparse in letteratura varie sequenze 3D-DOSY (quali *DOSY-Tocsy*, *DOSY-Roesy*, *DOSY-Inept* per citarne solo alcune) ma ancora relativamente pochi esempi di applicazioni di questi esperimenti. (Silvia Davalli)

Queste pagine nascono nella prospettiva di diventare un punto di incontro per scambi di esperienze nel campo delle risonanze magnetiche tra i colleghi specialisti e gli utenti "di tutti i giorni". Potete mettervi in contatto con il Girm all'indirizzo [it\\_girm@gsk.com](mailto:it_girm@gsk.com) o [cm5304@gsk.com](mailto:cm5304@gsk.com)

