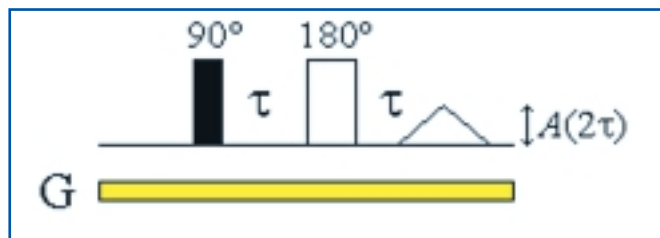


Misura del coefficiente di autodiffusione senza probe a gradienti: l'arte di arrangiarsi! (prima parte)

Nei numeri di giugno e luglio 2001 di questa rubrica, Silvia Davalli ha presentato alcuni interessanti esempi di un tipo di spettroscopia NMR chiamata DOSY (Diffusion Ordered SpectroscopY). Come è stato descritto, un DOSY è (nella sua forma più semplice) uno spettro bidimensionale sulla cui dimensione F_2 appare il normale chemical shift del nucleo in esame (tipicamente il protone), mentre l'altra dimensione riporta il coefficiente di autodiffusione delle sostanze presenti nella miscela analizzata. Ogni sezione di uno spettro DOSY, presa ad un coefficiente di autodiffusione, permette di ottenere lo spettro monodimensionale della sostanza avente quel particolare coefficiente. Per utilizzare le sequenze DOSY è però essenziale l'uso di un probe a gradienti presente di solito solo sulle macchine più moderne. In questo numero di "Non solo NMR" vogliamo continuare a parlare di diffusione illustrando un metodo per misurare i coefficienti di autodiffusione di liquidi puri mediante uno spettrometro NMR non dotato di probe a gradienti. L'esperimento, inventato da Norwood nel 1993 (*J. Magn. Res. A*, **103**, 258), ha a nostro parere una rilevanza didattica poiché permette di mostrare, ad esempio, agli studenti di un corso di "metodi fisici" che la diffusione esiste e cambia con la sostanza considerata. Anche se nel seguito di questa nota ci riferiremo ad uno spettrometro AC 200 Bruker la sequenza descritta è facilmente utilizzabile anche su spettrometri di altre marche. Ogni sequenza NMR per la misura del coefficiente di autodiffusione deve necessariamente contenere due elementi: 1) uno *spin-echo* (sia esso "normale" o "stimolato") e 2) l'applicazione continua o ad impulsi di un gradiente di campo magnetico nel corso dello *spin-echo*. Nello Schema 1 è riportata la più semplice sequenza per la misura del coefficiente di autodiffusione descritta da Carr e Purcell già nel 1954 (*Phys. Rev.*, **94**, 630). Si tratta di uno *spin-echo* ottenuto durante l'applicazione di un gradiente di campo magnetico per tutta l'estensione temporale della sequenza. In tali condizioni, si dimostra che l'ampiezza $A(2\tau)$ dell'eco è correlata al coefficiente di autodiffusione (D) secondo l'equazione [1]:

$$A(2\tau) = A(0) \cdot e^{\left(-\frac{2\tau}{T_2} - \frac{2}{3}\gamma^2 D G^2 \tau^3\right)} \quad [1]$$

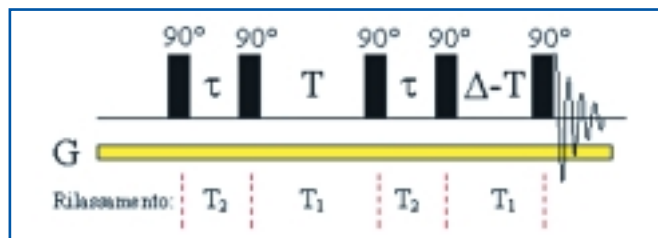
ove $A(0)$ è l'intensità dell'eco in assenza del gradiente di campo magnetico G applicato, T_2 è il tempo di rilassamento tra-



Schema 1

sversale, γ è il rapporto giromagnetico e τ è il tempo tra l'impulso a 90° e quello a 180° . Poiché il gradiente di campo magnetico è applicato lungo l'asse longitudinale del campione, ogni singola sezione di esso è sottoposta ad un campo magnetico leggermente diverso e dunque risuona ad una frequenza (f_i) leggermente diversa. Nel tempo τ che intercorre tra l'impulso a 90° e quello a 180° i segnali corrispondenti ai nuclei di ogni singola sezione si sfasano di un angolo $2\pi f_i \tau$. L'impulso a 180° e il successivo intervallo τ possono annullare le differenze di fase tra le varie sezioni (rifocalizzando il chemical shift) solo se i nuclei non si sono mossi dalla posizione che occupavano all'inizio della sequenza. A causa della diffusione, questo evidentemente non avviene e la differenza di fase accumulata dai nuclei non può più essere riportata a zero. Di conseguenza, l'ampiezza dell'eco in presenza del gradiente di campo diviene più piccola di quella che si misurerebbe in assenza dell'applicazione di G . Per estrarre D dalla [1] si possono seguire due vie. La prima prevede di eseguire una serie di esperimenti a τ costante variando il campo G (questo è ciò che normalmente si fa negli strumenti moderni usando però impulsi di G). Un semplice grafico di $\ln[A(2\tau)]$ in funzione di G^2 permette di estrarre D dalla pendenza della retta ottenuta logaritmando la [1]. La seconda via, all'opposto, utilizza τ variabili a parità di G . In questo caso è meno agevole estrarre D dalla [1] poiché l'ampiezza dell'eco è influenzata anche dal T_2 della sostanza in esame. È dunque necessario misurare a parte il T_2 , scorporarne l'effetto sull'ampiezza dell'eco e solo allora ricavare D dalla pendenza della retta del $\ln[A(2\tau)]$ in funzione di τ^3 . Questo modo di procedere, oltre che laborioso e poco automatizzabile, aumenta l'errore sperimentale su D a causa degli errori sulla determinazione del T_2 . L'approccio di Norwood alla determinazione di D è interessante: invece di calcolare a parte il T_2 e poi scorporarne l'effetto sull'altezza dell'eco, basta fare in modo che gli effetti diversi da quello dovuto alla diffusione rimangano costanti in tutti gli esperimenti utilizzati per il calcolo di D . La sequenza OE-CTPG (One-Echo Constant Time, Pulse and Gradient) segue proprio questa filosofia (Schema 2).

Nell'OE-CTPG viene utilizzato il cosiddetto "eco stimolato", un eco ottenuto in due stadi contigui invece che con un singolo impulso a 180° . In questa sequenza ci sono due periodi il cui rilassamento dipende da T_1 e altri due che dipendono da T_2 . In presenza del gradiente di campo magnetico G , l'intensità del segnale in uscita dalla sequenza OE-CTPG segue la [2]:



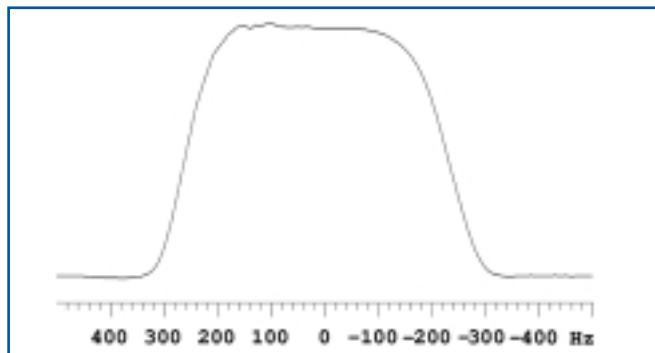
Schema 2

$$A(t) = \frac{1}{2}A(0) \cdot e^{\left\{-\frac{2\tau}{T_2} - \frac{\Delta}{T_1} - \gamma^2 G^2 D \left[\tau^2 \left(T + \frac{2}{3}\tau \right) \right] \right\}} \quad [2]$$

ma se si opera a τ e Δ costanti la [2] si riduce alla [3]:

$$A(t) = \frac{1}{2}A(0) \cdot e^{(-K - \gamma^2 G^2 D \tau^2 T)} \quad [3]$$

ove K congloba tutti i termini costanti. Sarà dunque sufficiente effettuare una serie di esperimenti OE-CTPG variando ogni volta il tempo T e si potrà facilmente ricavare il coefficiente di autodiffusione D di una sostanza dalla pendenza della retta di $\ln[A(t)]$ in funzione di T. Non è stato ancora toccato il problema della generazione del gradiente di campo magnetico G necessario perché la sequenza possa misurare D. Fortunatamente, tutti gli spettrometri NMR sono in grado di generare G mediante la bobina di omogeneità chiamata, di solito, "Z₁" o "Z". Anche portando la corrente di Z₁ al massimo, il gradiente non sarà certamente paragonabile a quello ottenuto con un probe a gradienti, ma potrà essere sufficiente ad effettuare la misura di D, almeno per liquidi a basso peso molecolare. Non conoscendo a priori il valore di G ottenuto con la bobina di omogeneità Z₁ bisognerà per prima cosa misurarlo utilizzando per esempio un liquido avente un coefficiente di autodiffusione noto. Un'altra possibilità, suggerita da Norwood, è quella di ricavare G dallo spettro di un campione avente un solo picco in



Profilo imaging monodimensionale di un campione di H₂O ottenuto in presenza del gradiente di campo magnetico G. Il campo applicato di $8,66 \times 10^{-4} \text{ Tm}^{-1}$ è stato ottenuto ponendo a +9999 la regolazione della bobina di omogeneità Z₁ di uno spettrometro Bruker AC 200

presenza del gradiente (Figura), ma ciò richiede di conoscere esattamente la lunghezza della bobina di ricezione/trasmmissione all'interno del probe, un'informazione che spesso le stesse case costruttrici non sono in grado di dare... ma di questo parleremo nella rubrica del prossimo mese.

*Mauro A. Cremonini e Luca Laghi
Dip. di Scienze degli Alimenti - Università di Bologna
Via Ravennate, 1020 - 47023 Cesena.
mac@foodsci.unibo.it; llaghi@foodsci.unibo.it.*