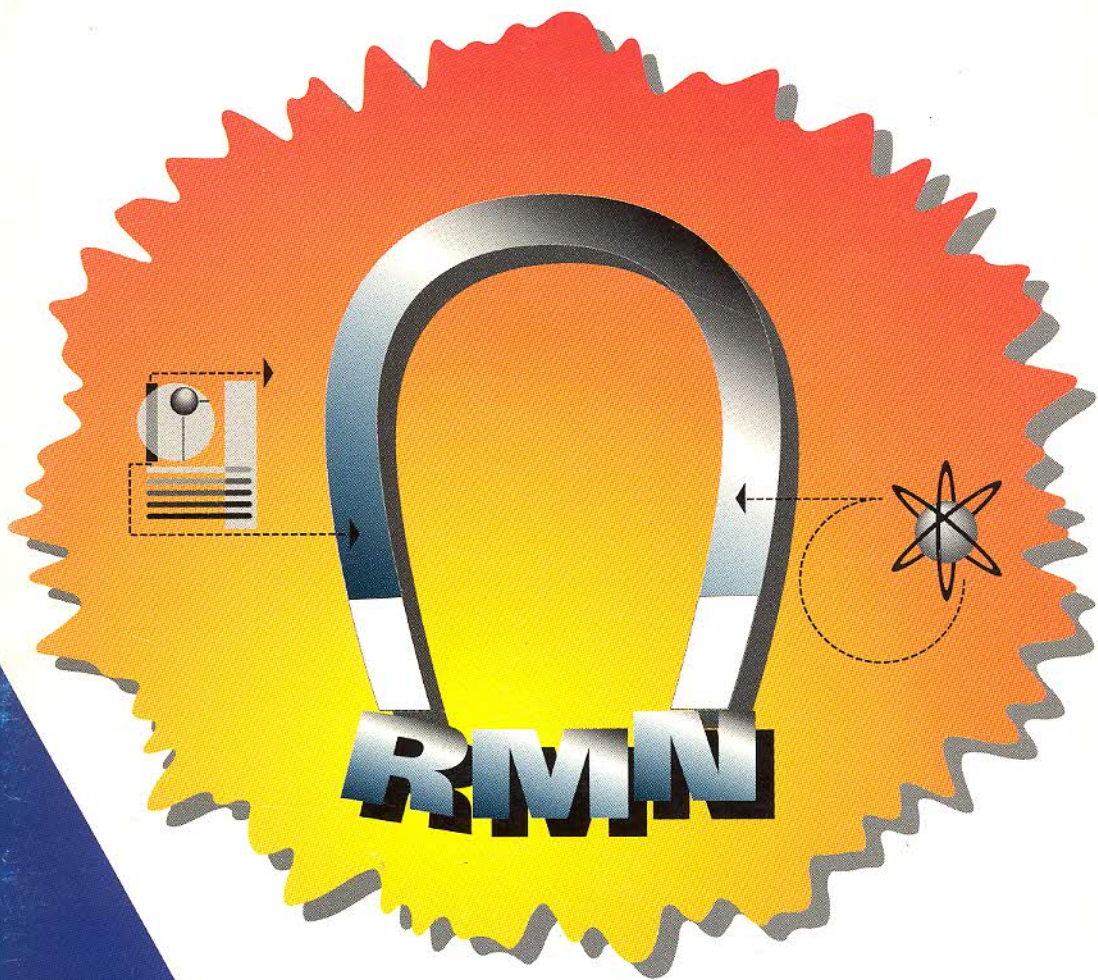




Ressonància magnètica nuclear, 1944-1994

Cinquanta anys al servei de les ciències

Francesc Sánchez

Universitat Autònoma de Barcelona
Servei de Biblioteques



1500585878



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Ciències

SANT ALBERT 1994

Don.

1120 / 365

Ressonància magnètica nuclear, 1944-1994.

Cinquanta anys al servei
de les ciències

Facultat de Ciències
Universitat Autònoma de Barcelona

Ressonància magnètica nuclear, 1944-1994.

Cinquanta anys al servei
de les ciències

Francesc Sánchez
Departament de Química



Biblioteca de Ciències

Conferència
pronunciada l'11 de novembre de 1994
a la Facultat de Ciències
de la Universitat Autònoma de Barcelona
arran de la festivitat
de Sant Albert Magne,
patró de la Facultat

Bellaterra, novembre de 1994

EDITAT I IMPRÈS PEL
SERVEI DE PUBLICACIONS
DE LA
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
08193 Bellaterra (Barcelona)

Dipòsit legal: B. 38.613/1994

Imprès a Espanya

Introducció

Digníssimes autoritats acadèmiques,
benvolguts companys científics,
estimats estudiants:

Permeteu-me iniciar aquest acte donant les més expressives gràcies a l'equip de Deganat de la nostra Facultat de Ciències per haver-me encarregat aquesta conferència amb motiu de la diada de Sant Albert, sense cap més mèrit per la meua part que el fet d'ésser ja prou vell per haver participat en la trajectòria de la Facultat des del ja llunyà any 1969, en què s'inicià la docència a Ciències. Pocs encàrrecs em podrien fer tanta il·lusió com aquest, en l'any que celebrem el vint-i-cinquè aniversari de la nostra facultat, i que, per una d'aquelles casualitats, coincideix amb el curs acadèmic en què se celebrarà el cinquantè aniversari del descobriment de la ressonància magnètica nuclear.

Res no pot ser més apropiat que el marc d'una Facultat de Ciències (i no una suma de diverses facultats d'àmbit científic més o menys restringit), per parlar d'una tècnica com la ressonància magnètica nuclear (RMN), que en els seus fonaments teòrics i en les seves aplicacions pràctiques conjuga totes les disciplines conreades a la nostra facultat. Així, la matemàtica ha proporcionat eines com la transformació de Fourier en una o més dimensions, o la teoria estocàstica, que són imprescindibles per a l'obtenció dels espectres a partir de les mesures primàries de magnetització. La física, per descomptat, es troba a l'arrel mateixa del descobriment de la RMN, produït durant estudis del moment angular intrínsec (o spin) de

certs nuclis. La informàtica ha fet possible el control ràpid, fiable i segur de les molt diverses variables instrumentals que cal establir per tal d'obtenir espectres RMN (polsos de radiofreqüència de microsegons, amb fases pre-determinades amb menys de mig grau; períodes d'evolució de micro- a mil·lisegons; potències d'irradiació; control de temperatura; etc.), com també la digitalització del senyal i la transformació digitalitzada de Fourier. La química ha estat des de fa més de quaranta anys la gran beneficiària de les aplicacions d'aquesta tècnica, que permet esbrinar detalls molt subtils de l'estructura molecular de les substàncies, i que també permet estudiar-ne el comportament dinàmic i les reaccions. La biologia, especialment la fisiologia, la bioquímica i la biologia molecular han pogut investigar amb gran detall des de fa uns vint anys les biomolècules, tant en estudis estructurals de biopolímers (pèptids, proteïnes, polinucleòtids) com en el seguiment dinàmic de rutes metabòliques o mitjançant l'espectroscòpia localitzada *in vivo*. La geologia, per la seva banda, ha pogut aprofitar les tècniques de RMN en fase sòlida per fer estudis estructurals de minerals (o de nous materials), i fins i tot s'han descrit aplicacions d'antenes RMN per a la determinació del contingut en olis minerals (petroli) de les roques.

Fora de l'àmbit d'una facultat de Ciències, la RMN també és coneguda pel gran públic gràcies a les seves aplicacions mèdiques, que donen lloc a imatges de gran espectacularitat obtingudes mitjançant aquesta tècnica no invasiva. De totes maneres, aquest coneixement és incomplet fins i tot en el nom, ja que la denominació que universalment utilitzen els metges (l'única que el ciutadà corrent coneix) és simplement *ressonància magnètica*. Sembla que l'adjectiu «nuclear» és perjudicial per als facultatius, potser perquè pot fer pensar al públic desinformat en perilloses radiacions produïdes per desconeguts processos radioactius. Permeteu-me tranquil·litzar-vos immediatament dient-vos que l'estabilitat del protó (nucli majoritàriament utilitzat per a l'obtenció d'imatges mèdiques per RMN) és molt gran, ja que la seva vida mitjana és d'uns 10^{31} anys, molt més gran que l'edat de l'Univers des del Big Bang, i únicament gràcies a la seva gran abundància s'espera poder detectar alguna vegada la desintegració espontània d'un protó. Bromes a part, he de dir que la supressió injustificada de l'adjectiu «nuclear» hauria d'ésser rebutjada per la comunitat científica.

Fonaments de la RMN

És ben sabut que l'electró presenta un moment angular intrínsec, també anomenat moment angular de spin, o abreujadament spin. De fet, el concepte de spin electrònic és àmpliament conegut.

També els nuclis poden presentar un moment angular de spin, que s'abreuja habitualment com a spin nuclear. En particular, el nucli més abundant (almenys a l'escala de l'Univers), que és el nucli de l'hidrogen (o protó) té spin $1/2$, igual que l'electró. Això vol dir que el protó, com l'electró, presenta un moment angular intrínsec P (o moment angular de spin), com si fos una partícula en rotació sobre el seu propi eix. També com en el cas de l'electró, el moment angular de spin d'un nucli, que és una magnitud vectorial, està quantitzat. Això vol dir que no pot prendre qualsevol valor; únicament pot prendre els valors que acompleixin l'expressió

$$P = [I(I + 1)]^{1/2} \times h/2\pi$$

en la qual P és el mòdul del moment angular, h és la constant de Planck, i I és el denominat nombre quàntic de spin (o abreujadament spin) del nucli en qüestió, una característica de cada nucli (o, més precisament, de cada isòtop). Es coneixen nuclis amb nombres quàntics de spin enters o semienters ($1/2, 1, 3/2, 2, 5/2, 3$, etc.), però el del protó resulta ser $1/2$, igual que el de l'electró. També hi ha nuclis sense spin (és a dir, amb spin $I = 0$), que per tant no presenten moment angular intrínsec ni poden ésser estudiats per RMN.

També com en el cas de l'electró, la projecció P_z d'aquest moment angular intrínsec sobre una direcció determinada de l'espai (per exemple, sobre un camp magnètic extern B_0), que definirem com l'eix z , no pot prendre qualsevol valor perquè P_z també està quantitzada. Això implica que l'orientació relativa dels vectors P i B_0 no pot ser qualsevol, sinó que l'angle entre els dos vectors pot prendre únicament un conjunt discret de valors. En el cas del protó (com en el de l'electró) i tots els altres nuclis de spin $I = 1/2$, la projecció P_z només pot prendre un dels dos valors següents: $+1/2 \times h/2\pi$ o bé $-1/2 \times h/2\pi$. En el cas de nuclis amb spin $I = 1$ (com, per exemple, el deuteri), la projecció pot prendre els tres valors següents (en unitats de $h/2\pi$): $+1, 0, -1$. Per als nuclis amb spin $3/2$ hi ha quatre projeccions possibles (en unitats $h/2\pi$): $+3/2, +1/2, -1/2$ i $-3/2$. En el cas general d'un nucli amb spin I hi ha un total de $2I+1$ projeccions possibles (en unitats $h/2\pi$): $+I, +(I-1), +(I-2), \dots, -(I-2), -(I-1), -I$.

Com que els nuclis són partícules carregades que podríem dir que giren (spin), a més del moment angular P també presenten un moment magnètic de spin μ proporcional a l'anterior:

$$\mu = \gamma \times P$$

expressió en la qual la constant de proporcionalitat γ és una magnitud escalar característica de cada nucli (en realitat, de cada isòtop) i es coneix amb el nom de constant magnetogírica. El protó, afortunadament, presenta una constant magnetogírica molt gran, de manera que el moment magnètic del protó (uns tres ordres de magnitud més petit que el de l'electró), comparat amb el d'altres nuclis, és un dels més fàcils de mesurar.

En presència d'un camp magnètic B_0 (eix z), les dues orientacions possibles del moment magnètic d'un protó corresponen a dos estats de diferent energia (donada pel producte escalar dels vectors μ i B_0). Així, l'energia d'un protó amb spin «paral·lel» a B_0 seria

$$\begin{aligned} E_{\uparrow} &= \mu \cdot B_0 = \mu \times B_0 \times \cos \Theta = \mu_z \times B_0 = \\ &= \gamma \times P_z \times B_0 = \gamma \times 1/2 h / 2\pi \times B_0 = 1/2 \frac{\gamma h B_0}{2\pi} \end{aligned}$$

mentre que l'energia d'un protó amb spin «antiparal·lel» a B_0 seria, anàlogament,

$$E_{\downarrow} = - 1/2 \frac{\gamma h B_0}{2\pi}$$

Cada una de les dues orientacions possibles, paral·lela i antiparal·lela, correspon a un estat estacionari del sistema, que en absència d'altres pertorbacions no pot fer variar l'angle que formen els vectors μ i B_0 . Així, el vector μ precessiona a freqüència constant ν_0 al voltant de B_0 , tot mantenint constant el valor de l'angle que formen.

Resulta possible promoure transicions entre els dos nivells d'energia del sistema mitjançant la irradiació amb radiació electromagnètica de freqüència ν_0 tal que compleixi la condició de Bohr, és a dir, que l'energia dels fo-

tons corresponents sigui exactament igual a la diferència d'energia entre els dos nivells energètics. Aquesta diferència val

$$\Delta E = E_{\uparrow} - E_{\downarrow} = \frac{\gamma \hbar B_0}{2\pi}$$

D'altra banda, l'energia d'un fotó és el producte de la seva freqüència per la constant de Planck. Si aquest fotó ha de promoure transicions entre els dos nivells, la seva freqüència ν_0 haurà de complir la condició

$$h\nu_0 = \frac{\gamma \hbar B_0}{2\pi}$$

i, suprimint la constant de Planck als dos membres, s'arriba a l'equació fonamental de la RMN:

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

en la qual ν_0 és precisament la freqüència de precessió dels nostres spins respecte del camp magnètic aplicat B_0 . Precisament l'absència de la constant de Planck en aquesta expressió ens permet un tractament clàssic (no quàntic) del fenomen: els spins precessionen en un o altre estat respecte del camp magnètic aplicat a la freqüència ν_0 ; en irradiar amb radiació electromagnètica circularment polaritzada de la mateixa freqüència, el sistema entra en ressonància, i es produeixen transicions entre els dos nivells energètics.

Com que el valor de la constant magnetogírica del protó es coneix, podem calcular la freqüència de ressonància que correspon a cada valor del camp magnètic aplicat. Així, per a un camp $B_0 = 2,35$ T (23.500 gauss), la ressonància dels protons té lloc a 100 MHz, és a dir, dins del rang típic de la radiofreqüència.

La detecció de l'absorció d'aquesta radiofreqüència en un espectròmetre de RMN no és immediata, ja que les quantitats d'energia involucrades són molt petites, al voltant d'unes poques mil·livalories per mol. Això impedeix la utilització dels sistemes tradicionals en espectroscòpies òptiques (UV-

Vis, IR), en les quals es comparen les intensitats de dos feixos de radiació, un dels quals ha travessat la mostra que s'ha de mesurar i l'altre constitueix el feix de referència. A causa d'aquesta petita energia que s'ha de mesurar, la RMN és una tècnica espectroscòpica de molt baixa sensibilitat. En condicions òptimes, en un espectròmetre modern d'alt camp magnètic, cal un mínim de 10^{15} spins d'un determinat tipus per poder-ne detectar senyals útils en un període d'una hora.

I, no obstant aquestes limitacions, la RMN és la tècnica més àmpliament utilitzada en investigacions estructurals o dinàmiques de compostos químics en fase condensada, tant des del punt de vista dels físics com, especialment, dels químics i, més recentment, dels biòlegs i dels metges. A diferència d'altres tècniques d'investigació estructural, la RMN no es limita al cas de petites molècules de baix pes molecular i alta simetria, sinó que proporciona dades precises i extremament útils fins i tot amb proteïnes de pes molecular relativament elevat, sense requerir la cristallització prèvia de la mostra.

Aquesta gran utilitat de la RMN es pot explicar amb paraules de Richard R. Ernst, premi Nobel de Química 1991:

Els sistemes de spins nuclears presenten característiques singulars que els predestinen per als estudis de les molècules:

1) Els nuclis atòmics que es fan servir com a sensors es troben perfectament localitzats, amb diàmetres d'uns quants femtòmetres, i poden donar informació sobre la situació del seu entorn immediat. Es fa així possible una exploració molt detallada de les molècules i de la matèria.

2) L'energia d'interacció dels sensors amb l'entorn és petitíssima, inferior a $0,2 \text{ J mol}^{-1}$, equivalent a l'energia tèrmica a 30 mK. D'aquesta manera, l'observació i la mesura de propietats moleculars es pot fer pràcticament sense pertorbacions. No obstant això, les interaccions presenten una elevada sensibilitat respecte de l'entorn local.

3) La informació sobre l'estructura de les molècules es pot obtenir a partir de les interaccions entre parells de nuclis. Així, les interaccions magnètiques dipol-dipol proporcionen informació sobre les distàncies internuclears. Per la seva banda, els acoblaments escalars J permeten la determinació d'angles dièdrics.

Aquest conjunt de propietats és el que ha fet que la RMN sigui avui una eina imprescindible en tots els laboratoris de química preparativa i de bioquímica estructural o dinàmica. En un altre context, els instruments d'imatge per RMN són també imprescindibles en els hospitals. Però per arribar a la situació actual, ha calgut superar les dificultats associades a la baixa sensibilitat característica de la RMN. De fet, la història de la RMN és una successió de brillants avenços experimentals que han permès anar augmentant amb els anys la sensibilitat de la tècnica.

Una mica d'història de la RMN: la prehistòria

Un recull dels esdeveniments que van conduir al descobriment de la RMN en fase condensada seria incomplet sense incloure també la seva prehistòria, caracteritzada per notables esforços experimentals destinats a demostrar primer i a detectar després l'existència d'un spin associat als nuclis, amb el seu moment magnètic corresponent.

Els conceptes de spin electrònic i de moment magnètic de l'electró es van confirmar experimentalment al començament dels anys vint amb el famós experiment de Stern-Gerlach, en el qual es van separar feixos d'àtoms en un camp magnètic inhomogeni d'acord amb l'orientació del moment magnètic dels seus electrons desaparellats. Cap al final dels anys vint, Pauli va mostrar clarament que moltes característiques de l'estructura hiperfina dels espectres atòmics únicament resultaven explicables si determinats nuclis presentaven també spin i el seu moment magnètic. Posteriors refinaments de l'experiment de Stern-Gerlach van confirmar-ho l'any 1933, i van proporcionar uns primers valors aproximats per al moment magnètic del protó. S'havia formulat, així, la predicció de l'existència d'un spin nuclear per a certs àtoms, inclòs l'hidrogen, que calia mesurar acuradament.

L'any 1936, C. J. Gorter va intentar mesurar la ressonància magnètica de nuclis de ^7Li en LiCl sòlid emprant tècniques microcalorimètriques, però sense resultat. Tampoc no va tenir èxit en detectar cap ressonància d' ^1H en cristalls d'alum d' AlK . Posteriorment ho va tornar a intentar amb LiF sòlid, novament sense assolir-ho. Avui sabem que una possible causa del seu fracàs és que el LiF cristal·lí de gran puresa presenta una relaxació longitudinal anormalment lenta, de manera que es requereixen temps anormalment llargs per tal que es polaritzi la mostra un cop immersida dins del camp magnètic i es pugui mesurar la seva ressonància magnètica nuclear. Precisament, Gorter fou el primer a escriure l'expressió *Nuclear*

Magnetic Resonance en el títol d'un dels seus articles, publicat l'any 1942, però sempre va atribuir l'expressió a I. I. Rabi.

L'any 1937, B. G. Lasarew i L. W. Schubnikow van demostrar que, a baixes temperatures, els moments magnètics nuclears contribueixen apreciablement a la susceptibilitat magnètica estàtica observada en l'hidrogen sòlid.

L'experiment crucial de la prehistòria de la RMN va arribar l'any 1939, quan I. I. Rabi i col·laboradors van dissenyar i provar una important millora de les tècniques de feixos, que va permetre, per primera vegada, l'observació de ressonància magnètica nuclear, encara que en feixos moleculars (que no presentessin spin electrònic), i la mesura del moment magnètic del protó. A més de fer passar un corrent de molècules a través d'un camp magnètic inhomogeni per deflectir-les, i per un segon camp inhomogeni de signe oposat per reenfocar-les, Rabi va intercalar un tercer camp, variable però homogeni, entre els dos anteriors. En irradiar en la regió central (camp homogeni) amb radiació electromagnètica de freqüència constant, dins del rang de la radiofreqüència, i fer una escombrada del camp magnètic central homogeni, el feix restava inalterat excepte per a un marge de valors del camp homogeni molt estret, en què, com a conseqüència de l'absorció, els components del feix es deflectien i ja no convergien sobre el detector. Havia nascut la ressonància magnètica nuclear, encara que Rabi la denominà espectroscòpia de radiofreqüència. Per aquest important descobriment es concedí a Rabi el premi Nobel de Física de l'any 1944, ara fa cinquanta anys.

Poc després, l'any 1940, amb el mateix tipus d'instrument, Álvarez i Bloch mesuraven el moment magnètic del neutró, però la guerra mundial va introduir un parèntesi en aquestes recerques fonamentals sobre RMN. No fou fins al 1945, acabada la guerra, que dos grups dels Estats Units, treballant independentment, intentaren novament detectar i mesurar ressonàncies magnètiques en matèria condensada, malgrat la manca d'èxit anterior de Gorter. Un d'aquests dos grups, dirigit per E. M. Purcell, treballava a la Universitat de Harvard, Massachusetts. L'altre ho feia a la Universitat de Stanford, Califòrnia. Els dos investigadors no es coneixien personalment, malgrat el fet que Felix Bloch havia passat els anys de la guerra treballant en projectes militars a Harvard. Segons el relat de W. G. Proctor, deixeble de Bloch que va descobrir el fenomen del desplaçament químic, fou precisament durant els anys de guerra passats a Harvard quan Bloch va desenvolupar tranquil·lament (a casa, treballant als vespres) les seves

idees sobre ressonància magnètica nuclear en fase condensada. Per això fou possible efectuar amb èxit l'experiment després de pocs mesos del seu retorn a Stanford un cop acabada la guerra.

RMN en fase condensada

La primera detecció de ressonància magnètica nuclear en matèria condensada fou aconseguida per l'equip de Purcell, Torrey i Pound, a Harvard, poc abans del Nadal del 1945 (el seu article fou rebut a *Phys. Rev. Lett.* la vigília de Nadal). L'experiment va consistir a situar un bloc de parafina sòlida, de 850 ml, en una cavitat ressonant de radiofreqüència, alimentada a 29,8 MHz mitjançant un circuit apropiat. Aquest conjunt es trobava dins d'un electroimant de camp magnètic variable. El senyal de sortida del resonador fou equilibrat amb una part del senyal procedent de la font de radiofreqüència, i en procedir a fer una escombrada del camp magnètic s'observà una aguda absorció per ressonància per a un valor del camp de 7100 gauss. Aquest experiment de detecció directa de l'absorció resulta equivalent als intents infructuosos efectuats per Gorter uns quants anys abans, i és interessant indicar que en planificar el seu experiment Purcell no coneixia el fracàs anterior de Gorter. Quan I. I. Rabi va saber el que Purcell volia fer, li va fer notar que Gorter no ho havia assolit, però Purcell va decidir que els preparatius ja eren massa avançats per deixar-ho córrer, i va tirar endavant amb el que, en definitiva, seria la primera detecció de ressonància magnètica nuclear en fase condensada.

De manera completament independent, l'equip de Felix Bloch a Stanford va aconseguir, al final de desembre de 1945, detectar també senyals de RMN de protó emprant, aquesta vegada, un dispositiu experimental molt diferent sobre una mostra d'aigua. En lloc d'un únic circuit de radiofreqüència, en l'experiment de Bloch s'utilitzaren dues bobines, mútuament ortogonals, una per a l'excitació i l'altra com a detector. També en aquest cas, les dues bobines es trobaven dins d'un fort camp magnètic variable, perpendicular a totes dues bobines, i l'elegant aproximació de Bloch preveia detectar sobre la segona bobina la força electromotriu induïda per la precessió de la magnetització nuclear de la mostra provocada per la primera bobina en produir-se l'absorció. Per aquest motiu, a Stanford el fenomen es denominà inicialment inducció nuclear. És interessant seguir el relat d'un dels investigadors que hi van participar. Diu M. E. Packard:

Cap al quart trimestre de 1945, a Stanford, sota la direcció del professor Felix Bloch, ens havíem proposat la tasca de detectar els senyals d'induc-

ció nuclear (nom que en aquella època donàvem a la RMN) dels protons en fase condensada. Amb aquesta finalitat Russell Varian, que també pertanyia al Departament, va construir un electroimant amb una cavitat que, plena d'aigua, era la nostra mostra de protons en fase condensada. La bobina d'excitació i la de detecció eren mútuament ortogonals entre si i amb el camp magnètic. La font de radiofreqüència era molt similar a un radar dels emprats durant la Segona Guerra Mundial. Però el camp magnètic era massa inhomogeni. Malgrat tots els esforços, no aconseguíem veure el senyal d'inducció nuclear a la pantalla de l'oscil·loscopi, així que vaig proposar un mètode consistent a fer una escombrada ràpida del corrent de l'imant amb l'esperança que en algun moment el camp magnètic i la radiofreqüència tindrien la relació precisa per donar el senyal esperat. Després de diversos intents, uns quants dies després de Nadal, tot sol al soterrani del laboratori vaig aconseguir veure el senyal desitjat en apagar el corrent de l'electroimant (realment l'escombrada de corrent més ràpida imaginable).

Com es pot suposar, l'excitació a Stanford va ser màxima, i ràpidament es va escriure un article descrivint el nou fenomen, sense tenir coneixement de l'article de Purcell sobre el mateix tema. L'article de F. Bloch, W. Hansen i M. E. Packard va arribar a *Phys. Rev. Lett.* el 29 de gener de 1946, i tots dos articles foren publicats al mateix número de la revista. Pocs anys més tard, el 1952, Purcell i Bloch rebien conjuntament el premi Nobel de Física pel seu descobriment, ja definitivament conegut amb el nom de ressonància magnètica nuclear (RMN).

És interessant indicar que, a diferència de Purcell, Bloch coneixia perfectament els treballs infructuosos de Gorter, però creia tenir una explicació per al seu fracàs. Bloch creia que l'experiment de Gorter havia fallat perquè el temps de relaxació T_1 era molt més llarg del que es pensava. Per superar aquesta dificultat, Bloch va proposar als seus col·laboradors posar la seva mostra d'aigua dins del fort camp magnètic de l'electroimant durant uns quants dies, abans d'intentar les mesures, per tal de permetre que el sistema de spins nuclears arribés a l'equilibri tèrmic. Així es va fer, i després de posar-hi la mostra, Bloch se'n va anar a esquiar durant uns dies. En tornar al laboratori, després de diversos intents infructuosos, finalment es va poder mesurar el senyal de ressonància, però també es va determinar que el temps de relaxament era molt més curt del que s'havia imaginat. En realitat, únicament calien uns quants segons, en lloc de dies, per establir l'equilibri!

La brillant concepció de Bloch sobre la ressonància magnètica nuclear, tant des del punt de vista teòric com experimental, ha quedat confirmada per les seves nombroses aportacions durant la resta de la dècada dels quaranta. Però un dels aspectes més importants li passà per alt: la gran disminució de l'amplada natural dels senyals RMN en líquids causada pels seus moviments tèrmics, convincentment demostrada per Bloembergen, Purcell i Pound a Harvard, en el seu article publicat l'any 1948. Fins que el contingut d'aquest article no fou conegut a Stanford, la gran amplada de banda dels senyals RMN observats per l'equip de Bloch s'atribuí erròniament a la seva amplada natural, causada per les interaccions dipol-dipol descrites per Bloch en sòlids. En realitat, per a mostres líquides, aquesta amplada de banda era deguda a la gran inhomogeneïtat de camp magnètic de tots els imants disponibles a Stanford durant aquells anys inicials.

Els anys d'infantesa

El període 1945-1955 fou marcat pel gran ritme dels descobriments efectuats pels físics dins del camp de la RMN. Inicialment, després del descobriment de Purcell i Bloch, ells i altres es dedicaren a mesurar els moments magnètics (o, més precisament, la constant magnetogirica) de tots els elements (o isòtops) encara no estudiats, per tal de buscar relacions entre la magnitud mesurada i l'estructura nuclear. Subjacent en aquest mètode hi havia la hipòtesi que el moment magnètic d'un determinat nucli (o isòtop) presentaria sempre el mateix valor, independentment de quin fos el compost utilitzat per fer-ne la determinació. En millorar la qualitat dels dispositius experimentals, fou possible augmentar la resolució dels senyals. Això va portar al descobriment del desplaçament químic, és a dir, que els senyals d'un determinat nucli presenten freqüències que depenen de l'espècie química en què són mesurats. Aquest descobriment fou efectuat a Stanford per Proctor i Yu, dos joves estudiants postdoctorals del grup del professor Bloch. Seguim el relat de W. G. Proctor:

Després d'haver dissenyat i construït un espectròmetre RMN de camp molt homogeni, que constituï la meua tesi doctoral a Stanford, el professor Bloch ens va encarregar al doctor Yu (acabat de graduar a l'Ohio State University) i a mi la tasca de localitzar les ressonàncies i mesurar els moments magnètics i els spins de tots els isòtops estables que fos possible, amb l'objectiu de completar la taula periòdica en un any, aproximadament. En el decurs d'aquests treballs, en tocar-li el torn al nitrogen com a nucli de referència, ens proposàrem de mesurar-ne el seu moment magnètic amb gran preci-

sió (crec recordar que la ressonància de ^{14}N havia estat mesurada l'any anterior per Pound a Harvard). Recordo que vaig anar al magatzem de química i vaig escorcollar-lo buscant un compost que donés la ressonància més forta possible. Aviat vaig triar el flascó marcat NH_4NO_3 , perquè òbviament havia d'ésser molt soluble en aigua i, a més, en tenir dos nitrògens per molècula, havia de donar un fort senyal. Un cop preparada una solució concentrada i introduïda a l'instrument, Yu i jo ens recolzàvem en l'imant, tot esperant que el petit motor de rellotge que canviava gradualment la freqüència de l'espectròmetre fes aparèixer la ressonància. Així fou, i un magnífic senyal de ressonància va aparèixer a la cinta que enregistrava l'espectre. Però mentre ho miràvem, ens vam quedar astorats en veure aparèixer un segon senyal d'igual amplitud que el primer. Repetirem l'experiment diverses vegades per assegurar-nos que no hi havia cap possible error instrumental, i finalment vam pujar amb els enregistraments al despatx del professor Bloch. Ell es va mostrar molt interessat, i immediatament ens posàrem a discutir possibles causes d'aquest fenomen. Finalment, en seleccionàrem dues, una molt més interessant que l'altra. La més interessant era la possible existència d'isòmers nuclears estables, de la mateixa massa, amb propietats lleugerament diferents. Crèiem haver fet un descobriment físic transcendent. Però calia descartar la segona causa possible, sense interès per a nosaltres, deguda a algun fenomen químic tal com un apantallament diamagnètic del nucli dependent del seu entorn químic que afectés la densitat electrònica del nucli de nitrogen.

Per tal de descartar aquesta segona hipòtesi, Bloch va demanar al professor Segra una petita mostra de ^{15}N . Si les dues ressonàncies no apareixien en una mostra de nitrat amònic fet a partir de ^{15}N , òbviament l'explicació hauria d'ésser nuclear, com nosaltres desitjàvem, i no simplement química. La conversió de la mostra de ^{15}N en nitrat amònic va tardar tres setmanes, molt angoixants per a tots nosaltres. Finalment, la mostra va arribar i en poques hores havíem tornat a veure les dues ressonàncies d'igual intensitat, proporcionalment amb la mateixa separació entre elles. Per tant, arribàrem a la conclusió que es tractava d'un enutjós efecte químic que podria arribar a impedir el nostre progrés en la mesura de moments nuclears magnètics. El nostre article fou publicat l'any 1950 en forma de carta, i per casualitat el mateix número de *Phys. Rev. Lett.* portava un article de W. C. Dickinson, del MIT, que descrivia el mateix fenomen per al nucli de ^{19}F .

D'aquesta manera fou descobert el desplaçament químic, sense el qual la RMN no tindria avui gaire utilitat analítica. Fou durant estudis per clarificar les causes del desplaçament químic que Gutowsky, al començament

del 1950, va descobrir l'acoblament escalar spin-spin. Seguem el seu relat:

Al començament del 1950 ens va interessar investigar desplaçaments químics en líquids i vam seleccionar el nucli de ^{19}F . Inicialment ho provàrem amb qualsevol compost fluorat que ens queia a les mans, fins que el 26 d'abril de 1950 vam aconseguir resoldre els senyals d'un trifluorometilbenzè fluorat també al nucli aromàtic. Això ens va encoratjar molt i em va portar a pensar de quina manera es podrien correlacionar els desplaçaments químics amb l'estructura molecular. Influït pel llibre de Linus Pauling *The Nature of the Chemical Bond*, vaig pensar que el desplaçament químic, com a fenomen elèctric, hauria d'estar relacionat d'alguna manera amb la naturalesa de l'enllaç químic. Aquest, al seu torn, depèn de la naturalesa dels àtoms que s'enllacen, de manera que vaig decidir estudiar els fluorurs binaris senzills, elecció que va resultar molt afortunada.

El dia 8 de setembre de 1950, al nostre laboratori, C. Hoffmann va observar per primera vegada una línia doble en la resonància de ^{19}F d'una petita mostra de PF_3 que ell mateix havia sintetitzat dins del nostre estudi dels desplaçaments químics del fluor. Com que la síntesi es feia per fluoració de PCl_3 , decidírem que la doble línia era deguda a la presència d'impureses de PClF_2 o PCl_2F en la mostra. Però, en purificar la mostra, el parell de senyals restà immutable. El mateix resultat s'obtingué amb una mostra de PF_3 preparada per una altra ruta. També en una mostra de PF_5 s'observaren dues bandes, i en aquest cas l'explicació que semblava més adient era que es tractava d'un desplaçament químic diferent per als F equatorials i els apicals. Finalment, al març de 1951, en examinar l'espectre de ^{31}P de POCl_2F , s'observà un doblet 1:1 que em va convèncer que havíem trobat un nou tipus d'interacció internuclear relacionada amb els estats de spin dels dos nuclis. En efecte, l'espectre de ^{31}P de CH_3OPF_2 presentà un triplet 1:2:1 tal i com jo ho havia predit.

Així va ésser descobert el segon gran paràmetre de la RMN, sense el qual no podria tenir la gran utilitat analítica que ha assolit. Les millores instrumentals d'aquells primers anys van permetre ben aviat l'observació de diferents desplaçaments químics de protó en compostos orgànics (el primer fou l'etanol), en forma de senyals «ben resolt» d'intensitat proporcional al nombre de protons.

El procediment habitual per a l'observació de línies de RMN en aquells temps consistia a variar la freqüència (o, més sovint, el camp magnètic)

a través de la condició de ressonància, recollir els senyals de deflexió en un oscil·loscopi i enregistrar-los. Aquest mètode, denominat d'ona contínua (CW, *continuous wave*), ha estat el generalment utilitzat durant molts anys, perquè permet l'observació seqüencial de cada una de les moltes línies de l'absorció de multiplets complexos, però cal que l'escombrada sigui molt lenta per tal de permetre l'enregistrament sense distorsions de les bandes, i això ha exigut considerables millores en l'estabilitat dels instruments, ja que cada enregistrament d'un espectre requereix uns deu minuts.

Bloch va suggerir des de l'inici un procediment alternatiu d'excitació mitjançant un pols molt curt de radiofreqüència. L'any 1949, E. Hahn va demostrar que aquest procediment, efectivament, era capaç d'induir un senyal (FID, *free induction decay*) corresponent a la lliure precessió de la inducció nuclear. A més, va demostrar que emprant seqüències de polsos es generaven ecos de spin que contenien informació addicional sobre el sistema. Els mètodes de polsos desenvolupats per Hahn, que són la base de l'actual RMN, van esdevenir els preferits pels físics per a l'estudi del comportament dinàmic del relaxament de sistemes senzills, sovint d'una única línia en l'espectre RMN, tals com, per exemple, les bandes d'absorció molt amples de mostres sòlides. D'altra banda, en l'estudi del relaxament, l'any 1953 fou descobert l'efecte nuclear Overhauser (NOE), encara que les seves aplicacions químiques van haver d'esperar uns anys.

D'aquesta manera, cap al començament dels anys cinquanta, tota la teoria de la RMN havia estat completament desenvolupada pels físics, que a poc a poc van anar perdent l'interès per un fenomen ja tan ben conegut en els seus principis fonamentals com la RMN. I, de manera quasi natural, l'interès per la RMN es desplaçà de la física a la química, gràcies a les seves nombroses aplicacions. En paraules de M. E. Packard, «chemists got the point very quickly, thanked the physicists, and took over».

Les primeres aplicacions químiques

El grup de físics dirigits pels professors Bloch i Hansen a Stanford estava constituït, entre altres, per persones com Russell Varian, Martin Packard, W. G. Proctor, W. A. Anderson i altres que l'any 1948 fundaren una nova empresa, denominada Varian Associates, a Palo Alto, Califòrnia, no gaire lluny del campus de Stanford. Per fundar-la, van ésser obligats a deixar la Universitat de Stanford, oblidar els seus còmodes sous, i fins i tot vendre

les seves cases. La segona línia de productes comercialitzats per la nova empresa era l'espectròmetre de RMN. Russell Varian estava convençut del seu gran valor, però ningú dins l'empresa sabia ben bé per a què serviria. Era l'any 1953, i Varian va fer inserir anuncis del nou producte en revistes de química, com ara JACS, amb el títol «NMR at work». És interessant ressaltar que l'any 1955 Varian ja havia venut tres espectròmetres RMN d'alta resolució, a 40 MHz per protó, precisament a tres empreses privades del ram de la química (Humble Oil, Texas; DuPont, Delaware; i Shell Development, Califòrnia). Investigadors de la talla de M. E. Packard, J. N. Shoolery o H. E. Weaver, a més de les seves funcions com a directius de Varian Associates, proporcionaven noves aplicacions a un nombre creixent de camps de la química, entre els quals no va tardar a aparèixer la química orgànica. En contrast amb el mig segle que va des del descobriment de l'espectroscòpia infraroja (1900) fins a la introducció del primer espectròmetre IR comercial (1946), la rapidesa del desenvolupament de la RMN és molt xocant. Sens dubte, un motiu n'és el clima de base tecnològica i l'acceptació d'innovacions que hi havia en aquells anys postbèl·lics. Però també va tenir molta importància la forta interacció entre una indústria electrònica de gran base tecnològica (Varian) i el grup capdavanter d'investigadors de la RMN comandat per Bloch a la Universitat de Stanford.

Aquells primers espectròmetres RMN a 40 MHz per protó eren aparells molt primitius. Calia enregistrar l'espectre protònic entre 0 i 10 ppm durant uns 5-10 minuts, però no es podien fer enregistraments més lents a causa de la deriva aleatòria del camp magnètic, que podia esdevenir dominant fins i tot sota el control dels denominats superestabilitzadors de camp. Especialment crític era el procés d'ajust de l'homogeneïtat del camp magnètic (*field shimming*), que calia fer per a cada mostra per tal d'obtenir la màxima resolució. Entre unes i altres coses, l'obtenció d'espectres RMN era una tasca llarga i delicada, reservada a bons especialistes instrumentals. Però la recompensa per l'obtenció de bons espectres era molt important. Els químics orgànics aviat comprovaren que l'espectroscòpia RMN era la tècnica ideal per a l'elucidació o comprovació estructural de molècules de pes molecular moderat. Quasi tots els compostos de la taula de laboratori donaven noves i interessants dades espectrals d'utilitat general. L'any 1958, va aparèixer el clàssic article de Shoolery i Rogers sobre l'estudi d'esteroides per RMN, en el qual es demostrava que fins i tot a 40 MHz els desplaçaments químics dels metils angulars eren de gran valor diagnòstic. També en aquells anys es van publicar nombroses dades de biomolècules, tals com alcaloides, sucres, porfirines i altres compostos. Aviat Karplus va demostrar que les constants d'acoblements veïnals a tres

enllaços es podien correlacionar amb els angles de torsió, i això va donar origen a nombrosos estudis conformacionals, especialment en el camp dels sucres. Cap al final de la dècada, l'any 1959, van aparèixer el clàssic llibre de Jackman, en què es correlacionaven les dades RMN amb l'estructura molecular, i el petit opuscle de Roberts, en què es feia una breu introducció del principis teòrics bàsics amb arguments senzills, a l'abast dels químics orgànics. Van aparèixer al mercat instruments comercials d'imant permanent, a 60 MHz per protó, amb molta més estabilitat i resolució que els primers aparells comercials, en els quals els espectres eren força més reproduïbles. L'any 1962 s'instal·là al laboratori de Química Orgànica de la Facultat de Ciències de la Universitat de Barcelona el primer espectròmetre RMN d'Espanya, un Perkin-Elmer R-10 a 60 MHz, sota la responsabilitat del professor Josep Castells, ben conegut a la UAB perquè en fou el primer professor de Química Orgànica. El professor Castells, que fou el meu director de tesi doctoral, va ser l'introduïdor de la RMN a Catalunya i em va guiar en les meves primeres passes dins d'aquella tècnica aleshores tan nova. Recordo molt bé que per obtenir un bon espectre amb aquell instrument calia un mínim de 100 mg de mostra, per a compostos de pes molecular <300, i que en casos veritablement excepcionals, si no es disposava de més mostra, es podia intentar fer l'espectre (amb més baixa qualitat) amb uns 60 mg, però mai amb menys.

Un gran avenç tècnic: RMN de polsos i transformació de Fourier

L'estabilitat i la fiabilitat de l'electrònica van anar millorant la qualitat dels espectròmetres RMN durant tota la dècada 1955-1965.

Especialment important va ésser l'assoliment de camps estables (amb electroimant) de 23,5 kG, que permeteren mesurar protó a 100 MHz emprant quantitats de mostra inferiors als 100 mg. La tecnologia dels superconductors, refrigerats per heli líquid, va fer possible finalment la construcció d'imants permanents de solenoide superconductiu amb camps estables molt més alts (primers espectròmetres de protó a 220 MHz, Varian HR-220, l'any 1966). Amb aquests espectròmetres de camp molt alt fou possible iniciar l'estudi de biopolímers, tals com polipèptids, proteïnes, etc. Però encara tots els espectres s'havien d'obtenir mitjançant la lenta escombrada de camp (o de freqüència) característica del mètode d'ona contínua. De totes maneres, la gran dispersió de freqüències protòniques assolible amb imants superconductius va permetre l'aparició, l'any 1967, d'un primer estudi estructural detallat de proteïnes per RMN.

L'any 1966, va arribar també la primera gran revolució metodològica instrumental de la RMN, vint anys després del seu descobriment, per part d'un dels seus primers investigadors (Weston A. Anderson) i d'un jove suís (Richard R. Ernst) encara poc conegut, que en aquell temps treballava a Varian, a Palo Alto. Es tracta del mètode de polsos i transformació de Fourier, avui universalment emprat per tots els espectròmetres i que ja havia investigat E. Hahn l'any 1950. El gran avantatge d'aquest mètode és que permet excitar simultàniament, amb un únic pols rf de gran intensitat i de duració molt curta (típicament < 10 microsegons), tots els protons de la mostra, independentment del seu desplaçament químic, sense haver de fer cap escombrada de freqüència. La resposta transitòria del sistema (*Free Induction Decay*, FID; també se'n pot dir interferograma), consisteix en l'aparició d'una *inducció nuclear*, en forma de magnetització macroscòpica transversa, que precessiona perpendicularment el camp fix de l'imat, mentre es va esmoreint per l'acció dels mecanismes de relaxament. Com en els experiments de Bloch, aquesta inducció nuclear es pot mesurar gràcies a la força electromotriu que indueix a la bobina del detector i dura prop d'un segon. A més, es pot emmagatzemar digitalment en la memòria d'un ordinador i, tan bon punt s'anul·la, immediatament es pot tornar a enviar un pols a la mostra, sumant coherentment les successives FID a la memòria de l'ordinador. Això permet millorar dos o tres ordres de magnitud la relació senyal-soroll i, així, ampliar els àmbits d'aplicació de la RMN. La transformació de Fourier d'aquesta FID, operació matemàtica que també realitza digitalment l'ordinador, proporciona un espectre amb el mateix format i la mateixa informació que si hagués estat obtingut mitjançant la tècnica de CW, però en molt menys temps. Així, durant els deu minuts que normalment calien per fer un únic registre d'espectre de protó amb ona contínua, el mètode de polsos pot sumar un total de 600 FID, però és que, a més, el senyal de cada una d'aquestes FID és molt més intens que el d'un espectre CW convencional enregistrat amb la mateixa concentració de mostra.

Fins a aquesta revolució, les aplicacions pràctiques de la RMN s'havien limitat als molt pocs isòtops d'elevada abundància natural i spin $1/2$, principalment ^1H , ^{19}F , ^{31}P i ^{195}Pt . Malauradament, això exclou nuclis tan abundants i importants com el carboni (^{12}C , 98,9%) o l'oxigen (^{16}O , 99,8%), ja que no tenen spin ($I = 0$). Però l'aparició d'aquest article d'Ernst i Anderson va obrir el camp de la RMN *multinuclear*, en fer possible acumular coherentment en poc temps centenars o milers de FID corresponents a nuclis de baixa abundància natural, que fins aquell moment només havien estat accessibles treballant amb molècules isotòpicament enriquides. Entre els

nuclis de major interès que la tècnica de polsos i transformació de Fourier va posar a l'abast, cal esmentar, en primer lloc, el ^{13}C (1,1% d'abundància natural), el ^{15}N (0,37%), el ^2H o deuteri (0,015%) i, en general, tots els elements de la taula periòdica. També, naturalment, va permetre l'obtenció en poc temps d'excel·lents espectres de protó de compostos d'estructura complicada emprant mostres d'un mil·ligram o menys. Els primers espectròmetres comercials que incorporaven la nova tècnica van ser de la casa alemanya Bruker, i eren al mercat cap a l'any 1970.

La combinació d'imants superconductius de camp permanent cada vegada més alt i el mètode de polsos i transformació de Fourier, amb el seu ja inseparable ordinador integrat, va caracteritzar l'increment constant de la sensibilitat de la RMN durant els primers anys setanta. També va permetre convertir la RMN multinuclear en una eina pràctica d'investigació estructural. Així, els espectres de ^{13}C a abundància natural esdevingueren completament rutinaris. Amb graus de dificultat variables, també molts nuclis metàl·lics foren accessibles en la pràctica per primera vegada.

Una altra característica dels avenços produïts durant els anys setanta fou el disseny i la utilització de seqüències multipolsos, amb l'objectiu d'augmentar encara més la relació senyal/soroll (per exemple, mitjançant transferència de polarització) o de singularitzar el tipus d'informació espectral produïda (per exemple, espectroscòpia diferencial, determinació de NOE, excitació selectiva, etc.). Si per obtenir un espectre convencional d'ona continua cal simplement fer una escombrada de freqüències i enregistrar la intensitat absorbida a cada freqüència, amb el mètode de polsos cal únicament excitar la mostra amb un únic pols de curta duració i, immediatament, recollir i emmagatzemar la FID o inducció nuclear, que per transformació de Fourier proporcionarà un espectre idèntic a l'anterior. Però res no impedeix d'efectuar més d'un pols durant l'excitació, com ja havia fet E. Hahn en estudiar els ecos de spin. De fet, és possible variar el nombre de polsos, la seva duració o angle, es poden utilitzar polsos homo- i heteronuclears dins la mateixa seqüència, selectius o inespecífics, etc. Hi ha una gran varietat de seqüències multipolsos que es poden aplicar a l'obtenció d'informacions estructurals específiques, i que avui dia ja són més o menys operacions rutinàries, desenvolupades durant els anys setanta.

També durant els anys setanta s'inicià l'estudi de mostres sòlides per RMN d'alta resolució, amb la introducció de mètodes de desacoblament d'alta potència i, sobretot, de la rotació d'angle màgic. Finalment, els anys se-

tanta, Lauterbur va endegar un ambiciós programa de localització en l'espai de senyals RMN, que ell denominava *zeugmatografia*, que seria la base de l'actual tècnica d'obtenció d'imatges mèdiques per RMN.

La segona revolució metodològica: RMN multidimensional

Veiem, doncs, que des del descobriment (1946) de la RMN fins a la primera revolució metodològica (polsos i transformació de Fourier, 1966) havien passat vint anys. La segona gran revolució metodològica, la RMN bidimensional (2D NMR), va tardar molt menys a arribar: conceptualment fou formulada com a possibilitat teòrica per J. Jeener, en un dels *unpublished papers* més citats del món, durant un congrés celebrat l'any 1971 a Basko Polje, al país encara denominat Iugoslàvia. Cinc anys més tard, l'equip de Richard Ernst, ara ja definitivament instal·lat a l'ETH de Zuric, havia completat la teoria de la 2D NMR, havia incorporat als espectròmetres les modificacions necessàries i havia aplicat els mètodes experimentals bidimensionals, amb exemples concrets i aplicacions pràctiques, tot publicat entre els anys 1973 i 1976. Amb la segona dimensió, novament la RMN revelava l'existència d'un nou terreny inexplorat per investigar: correlacions homo- i heteronuclears, espectroscòpia J, processos de bescanvi químic o topològic, transferències de polarització, seqüències multipolsos, excitacions selectives i un llarg etcètera. Significativament, un dels nous camps ara oberts, gràcies a la gran simplicitat dels espectres bidimensionals, fou el de l'estudi de transicions prohibides, en particular les biquàntiques (*double quantum transitions*). En paraules del mateix Ernst: «Chemists will find great excitement in the forbidden fruits of spectroscopy».

El principi en què es basa la RMN bidimensional és conceptualment senzill. En RMN monodimensional s'excita el sistema de spins, i es mesura la magnetització o senyal S en funció de la variable temps. Així s'obté la funció temporal $S(t)$, o FID, que cal mesurar a intervals constants. Per transformació de Fourier, aquesta funció temporal $S(t)$ dona l'espectre $F(\nu)$, funció de la freqüència.

Podem suposar ara que sotmetem el nostre sistema de spins a dues pertorbacions diferents, separades en el temps per un període incrementable que denominarem t_1 . Si, com abans, mesurem la magnetització després de la segona pertorbació en funció del temps, que ara denominarem t_2 , obtindrem un senyal $S(t_1, t_2)$ que serà funció de totes dues variables temporals. Per doble transformació de Fourier obtindrem un espectre bidimen-

sional, $F(v_1, v_2)$, en què la intensitat del senyal serà funció simultàniament de dues variables freqüència.

Calen tres dimensions per representar correctament dues freqüències i una intensitat. Per presentar espectres bidimensionals en les dues dimensions d'un paper (o, més habitualment, d'una pantalla) hi ha dos procediments: la visió en perspectiva i el mapa de contorns. El primer és molt inconvenient, i en general es prefereix el segon, que és un sistema semblant al dels mapes topogràfics, en què es fan talls horitzontals a diverses intensitats i se'n dibuixa la secció amb diferents colors.

Segons quina sigui la naturalesa de la primera pertorbació, que naturalment depèn de les seqüències multipolsos utilitzades, la freqüència v_1 pot tenir un o altre significat físic. Però l'existència d'un pic sobre l'espectre bidimensional sempre s'ha d'interpretar de la mateixa manera. Hi ha spins que durant el temps t_1 han evolucionat amb freqüència v_1 i que sota l'acció de la segona pertorbació: 1) han passat a fer-ho amb freqüència v_2 durant el temps t_2 ; o, alternativament, 2) han transferit memòria d'aquesta precessió a altres spins que durant el temps t_2 precessionen amb freqüència v_2 .

En els espectres bidimensionals de *correlació homonuclear*, les dues variables freqüència corresponen al desplaçament químic d'un mateix nucli. En un cas de gran importància, els denominats espectres COSY, totes dues variables freqüència són desplaçaments químics de protó. Els espectres COSY presenten dos tipus de pics: els pics diagonals i els pics creuats. Poca informació es pot treure dels pics diagonals, perquè evidentment un spin està correlacionat amb si mateix. Però la presència de pics creuats, amb $v_1 \neq v_2$, ens diu que hi ha acoblament entre els spins 1 i 2, i sovint permet també la mesura de la constant d'acoblament $J_{1,2}$. Aquestes són informacions estructurals de gran importància, ja que en el cas dels protons això permet desxifrar la *connectivitat* dels sistemes de spins. A més, com que la constant d'acoblament veïnal (a tres enllaços) depèn de l'angle de torsió, els valors de J permeten determinar la conformació de la molècula. Un altre cas molt important són els espectres NOESY, en els quals també totes dues variables freqüència són desplaçaments químics de protó. Ara, però, els pics creuats amb $v_1 \neq v_2$ indiquen que els dos spins són molt propers en l'espai, generalment a menys de 4,5 Å, i de la intensitat del pic creuat se'n pot deduir la distància internuclear.

Hi ha també espectres bidimensionals de *correlació heteronuclear*, en els

quals les dues dimensions de freqüència corresponen a desplaçaments químics de dos nuclis diferents. El cas més habitual és el de la correlació entre ^1H i ^{13}C (espectres HETCOR, HSQC, HMQC), en què els pics de l'espectre bidimensional correlacionen protons i carbonis directament units, però també hi ha mètodes per correlacionar protons i carbonis enllaçats a dos i/o tres enllaços de distància (HMBC). Tots dos tipus de correlacions heteronuclears constitueixen un gran ajut a l'assignació estructural.

Durant els vint anys que ja han passat des de la introducció pràctica de la RMN en més d'una dimensió, el concepte s'ha estès des de les 2D inicials, i avui ja és rutinari l'ús de RMN en 4D per a la investigació estructural de proteïnes de gran complexitat, amb l'ajut de marcatges isotòpics amb ^{13}C i ^{15}N , i de mètodes d'enginyeria genètica (DNA recombinant) per disposar d'aquestes proteïnes còmodament biosintetitzades a partir d'aminoàcids doblement marcats amb els dos isòtops. Els resultats són del tot espectaculars. La RMN dona avui una informació tan precisa i fiable com la difracció de raigs X per a proteïnes de pes molecular inferior a 50.000, amb l'avantatge que, en treballar en solució, pot donar també informació sobre processos dinàmics, de gran interès per entendre moltes funcions biològiques d'aquestes macromolècules.

Des del 1975, en què s'inicià la pràctica de la RMN bidimensional, hi ha hagut també moltes millores en la instrumentació, que han facilitat l'aplicació d'aquests mètodes. Vegem-ne uns quants exemples.

El camp magnètic estable i homogeni dels imants disponibles comercialment ha anat augmentant des dels 5,17 T del vell Varian HR-220, de l'any 1966, fins als actuals 17,6 T dels recents espectròmetres Bruker i Varian a 750 MHz per protó. De fet, ja s'ha començat a parlar de l'espectroscòpia de GHz, sens dubte reservada per a les aplicacions (encara llunyanes) dels nous materials superconductius d'alta T_c . No oblidem que a més camp magnètic, més sensibilitat, i també més dispersió dels senyals de protó, imprescindible per a l'estudi de biopolímers.

El desenvolupament de la informàtica ha permès la incorporació als espectròmetres RMN d'ordinadors de gran capacitat i velocitat. A més, el *software* s'ha dissenyat pensant a facilitar a l'usuari no especialista en informàtica un control fàcil sobre les variables instrumentals, i també a oferir-li un fàcil i ràpid processament de dades, que actualment ja es pot fer *off line*, amb ordinadors personals o estacions de treball.

Els avenços en electrònica aplicada han permès disposar d'espectròmetres multicanal, en els quals és possible pertorbar simultàniament diversos isòtops, emprant excitacions de radiofreqüència precisable fins al mHz, que van des de pocs mHz fins a molts kHz d'amplada d'excitació, amb control (menys de mig grau sexagesimal) de fases d'excitació, desacoblament i detecció.

El desenvolupament pràctic de mètodes de detecció inversa (per a correlacions heteronuclears) i la disponibilitat actual de gradients polsants de camp magnètic han estat dues contribucions recents (la segona, dels anys noranta) que han facilitat el disseny i la realització de tot tipus d'experiments RMN en una o més dimensions per esbrinar gairebé qualsevol detall estructural o dinàmic de les molècules orgàniques o bioquímiques.

D'altra banda, la RMN en estat sòlid ha experimentat progressos molt notables amb el desenvolupament de mètodes que van més enllà de la rotació d'angle màgic, com per exemple els mètodes de doble rotació posats a punt per l'equip de Pines els darrers deu anys. Això ha permès la utilització de la RMN en l'estudi de materials polimèrics, ceràmics, etc., que avui ja es pot fer quasi de manera rutinària en una o més dimensions (si es disposa de la instrumentació adequada).

Però, sens dubte, és en les biociències on la moderna RMN té un futur més prometedor. A més de les ja clàssiques determinacions estructurals i dinàmiques de biopolimers (com les proteïnes), que encara avui constitueixen un repte molt important en el cas d'oligonucleòtids de més de dues dotzenes de parells de bases, la RMN s'ha utilitzat amb èxit en l'estudi del metabolisme, tant *in vivo* com *in vitro*, gràcies al seu caràcter de tècnica no invasiva. Així, ja fa quasi vint anys que es van observar per primera vegada senyals diferenciats de RMN de ^{31}P per a diversos metabòlits fosforilats de gran importància, com ATP, ADP, fosfocreatina, etc. També són ja clàssics els estudis de pH intracel·lular en funció del desplaçament químic de certs senyals. S'han desenvolupat mètodes de perfusió per a l'estudi d'òrgans en fluids nutrients apropiats, antenes per a l'estudi d'elements de volum propers a la pell en éssers vivents, polsos de profunditat predeterminada per a l'estudi de zones més internes, i, finalment, la RMN mèdica (en la qual es mesura el senyal de l'aigua) és avui una tècnica rutinària en molts hospitals per a la diagnosi. També hi ha una notable investigació, en RMN mèdica, que podem denominar espectroscòpia localitzada *in vivo*, ja que permet determinar espectres de determinades molècules en zones de l'organisme intacte prèviament determinades.

Mig en broma, Bloch deia que el primer experiment de RMN *in vivo* l'havia fet ell mateix, l'any 1946, en posar el seu dit dins la sonda del seu espectròmetre RMN i observar un senyal d'aigua. Entre els químics orgànics és molt conegut un article del *J. Org. Chem.*, de fa uns trenta anys, en què es descriu l'espectre RMN d'un ratolí sencer i viu. Avui, les aplicacions de la RMN a les biociències són cada vegada d'abast més gran, però també ho són en ciència dels materials, en geologia (magnetòmetres, sondes RMN per a la perforació de pous de petroli), en la indústria alimentària (que utilitza la RMN protònica per mesurar el contingut d'aigua), i fins i tot en estudis agrícoles, en els quals es pot utilitzar la RMN com a tècnica no invasiva per determinar el contingut de les llavors i de plàntules. Però dels més de quinze mil espectròmetres RMN que hi ha a tot el món, cinc mil dels quals són d'imatge mèdica, la majoria (uns deu mil) encara es dediquen a la mateixa finalitat amb què la RMN va començar: la determinació analítica de les estructures de compostos químics, particularment orgànics.

No és gaire corrent que una tècnica instrumental continuï sent objecte de tanta recerca fonamental cinquanta anys després del seu naixement. Però, en el cas de la RMN, fins i tot hi ha hagut recentment la concessió del premi Nobel de Química 1991 al professor R. R. Ernst. En paraules del mateix Ernst, «the possible new experiments based on manipulation of spin physics are only limited by the ingenuity of the spectroscopists». Sembla que l'enginy de teòrics i d'experimentalistes es troba molt lluny d'esgotar-se en el camp de la RMN.



Biblioteca de Ciències

