

RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE: PASSATO, PRESENTE E FUTURO DI UNA TECNICA SPETTROSCOPICA CHE HA CAMBIATO LA CHIMICA E NON SOLO

VALENTINA DOMENICI ^a, CARLO ALBERTO VERACINI ^b

*Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università degli studi di Pisa,
via Risorgimento 35, 56126 Pisa, Italia*

^a e-mail: valentin@dcci.unipi.it

^b e-mail: verax@dcci.unipi.it

Sommario:

La risonanza magnetica nucleare (NMR) è una spettroscopia nata nella seconda metà del ventesimo secolo, grazie alle intuizioni di un manipolo di grandi scienziati che nel giro di trenta anni contribuirono con alcune importanti innovazioni sia teoriche che sperimentali allo sviluppo di una delle tecniche oggi più utilizzate dai chimici. L’NMR si basa su alcuni principi quanto-meccanici che descrivono l’interazione tra radiazione elettromagnetica nella regione delle radio frequenze e i nuclei atomici della materia.

In questo breve saggio esploreremo le tappe più significative della storia di questa spettroscopia, anche attraverso le vicende umane di alcuni scienziati, fino ad arrivare ai giorni odierni e alle innumerevoli applicazioni dell’NMR.

Parte I

Introduzione

Partire dalla teoria dei quanti e dai primi del Novecento potrebbe sembrare un salto troppo indietro nel tempo. In realtà, questo salto è inevitabile se vogliamo capire come si è arrivati alla nascita e allo sviluppo della spettroscopia di risonanza magnetica nucleare, abbreviata con NMR secondo la dicitura inglese *Nuclear Magnetic Resonance* [1,2].

Formalmente questa spettroscopia viene fatta nascere nel 1945, in concomitanza con la prima osservazione sperimentale di un segnale di assorbimento del nucleo di idrogeno (¹H) nella regione delle radiofrequenze, da parte di Purcell, Torrey e Pound, e, contemporaneamente, da Bloch, Hansen e Packard. A cosa corrispondeva il segnale osservato? E perché tutto questo interesse per la regione delle radiofrequenze? A queste domande tecniche vanno aggiunte però questioni più profonde, perché l’NMR, oltre ad aver rappresentato una svolta da un punto di vista tecnico-scientifico, ha segnato la chimica e i chimici in

modo profondo [3]. Alcuni concetti prettamente chimici, che prima dello sviluppo della tecnica NMR erano solo ipotesi e congetture, trovarono con l’NMR, inteso come “*chemist’s tool*”, visualizzazioni concrete e prove inequivocabili. Basti pensare alla stereochimica e alle questioni conformazionali, o più semplicemente all’immediatezza che l’NMR ha nel mostrare i gruppi funzionali e le interazioni tra gruppi di atomi [4, 5, 6].

Un’immagine particolarmente efficace, data dallo storico della chimica Pierre Lazlo [3], è la seguente: “*the NMR tube replaced the test tube*”. Come dire che se prima il chimico era associato al tubo da saggio usato per l’analisi qualitativa dei composti, per scoprirne la natura chimica, dalla seconda metà del Novecento il chimico venne associato al tubo NMR.

“For centuries, chemists were associated with test tubes, not only in the popular imagination. The test tube was used primarily for qualitative analysis. Adding a few drops of a reagent would trigger a response, maybe a color change, a turbidity, or a precipitation, from which the chemist would infer the likely presence of a component in the liquid mixture, be it a ketone or sulfate anions. With the NMR tube, chemists were offered a lighter and subtler perturbation. The reagent now consisted only of radiofrequencies (RF). Their resonant absorption by the sample in the NMR tube yielded a comprehensive inventory of the groups of atoms present.” (Pierre Lazlo)[3].

L’analisi spettrale, ovvero l’interpretazione degli spettri NMR, in particolare al protone e al carbonio, hanno parzialmente sostituito l’analisi elementare e l’analisi chimica in senso stretto.

Non solo, l’NMR ha permesso di “vedere” le interazioni tra gli atomi appartenenti a una stessa molecola: l’accoppiamento scalare e quello dipolare tra nuclei atomici hanno aperto la strada all’identificazione dello scheletro molecolare e della geometria d’equilibrio di molecole complesse in soluzione e in fase solida.

La tecnica NMR ha cambiato nel tempo anche la professione dei chimici che, organici o inorganici che siano, non possono prescindere dalla conoscenza dei rudimenti di base di questa spettroscopia.

Ma oggi, grazie agli sviluppi tecnici e scientifici della risonanza magnetica nucleare, e grazie anche all'evoluzione dei mezzi informatici, altre discipline, come la medicina e la biologia, hanno avuto grandi benefici dall'NMR. Un esempio è rappresentato dalla risonanza magnetica usata in medicina come test diagnostico non invasivo, che nacque come sviluppo pratico della scoperta riguardante l'effetto dei gradienti di campo magnetico sul segnale NMR e la possibilità di ricostruire immagini tridimensionali sfruttando questi gradienti.

Altre scienze, come la biologia molecolare, che può essere considerata come un'estensione della chimica al campo di studio della biologia, la scienza dell'alimentazione, e altre discipline, come quelle dedicate al restauro e al monitoraggio del patrimonio artistico e storico, fanno ampio uso della spettroscopia NMR come metodo di analisi chimica e strutturale.

Dalla teoria dei quanti alla misura di Rabi

Negli anni '20 del Novecento, la teoria quantistica, elaborata dal fisico danese Niels Bohr [7], era diventata già una teoria di grande successo e dalle potenzialità ancora più promettenti.

Con questa teoria, Bohr era riuscito a spiegare gli spettri di assorbimento e di emissione di atomi e di piccole molecole, come l'idrogeno molecolare [8], cosa che non era pensabile ricorrendo alla teoria classica. Tuttavia, c'erano alcuni fenomeni sperimentali [9] che non si riuscivano a spiegare, come il cosiddetto "effetto Zeeman anomalo" che consiste nella presenza di segnali sdoppiati, o comunque molto più complessi, quando si registrano ad alta risoluzione spettri di assorbimento in presenza del campo magnetico.

Fu grazie a un celebre esperimento, noto con il nome dei suoi due ideatori, Otto Stern e Walther Gerlach, che nel 1921 ci fu la prima conferma sperimentale della teoria quantistica (Figura 1-1a).



Figura 1: Otto Stern (da <http://www.aip.org/>)



Figura 1a: Walther Gerlach (da <http://www.aip.org/>)

L'esperimento Stern-Gerlach [10] è abbastanza semplice da realizzare: un fascio di atomi (nel primo esperimento si trattò di atomi di argento) sono fatti passare attraverso un gradiente di campo magnetico, in modo che il fascio e la direzione del gradiente siano perpendicolari tra loro (Figura 2).

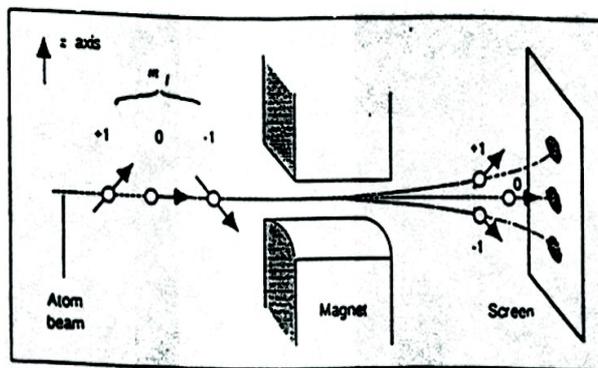


Figura 2: Uno schizzo dell'apparato sperimentale dell'esperimento Stern-Gerlach (da <http://plato.stanford.edu>).

L'interazione del campo magnetico con gli elettroni degli atomi del fascio avrebbe provocato, secondo la teoria di Bohr, una deflessione del fascio stesso [11]. Viceversa, la teoria classica è in grado di prevedere solo un semplice allargamento del fascio. Stern e Gerlach osservarono proprio una deviazione del fascio e non un allargamento: era la prova che su scala atomica la teoria classica lasciava il posto alla teoria di Bohr. Ma la spiegazione corretta dal punto di vista teorico di questo esperimento doveva ancora venire, con l'introduzione dello spin elettronico e della meccanica quantistica.

Lo spin dell'elettrone fu scoperto nel 1924 da Wolfgang Pauli (Figura 3) osservando l'emissione atomica dei metalli alcalini. Anche se in un primo momento Pauli non

aveva idea del significato fisico di questa quantità, che definì semplicemente come un “grado di libertà” aggiuntivo, le ipotesi del 1925 di Kronig e di due giovani fisici, Uhlenbeck e Goudsmit, si rivelarono poi esatte: lo spin elettronico risultava dalla presenza di un momento angolare dell’elettrone.



Figura 3: Wolfgang Pauli, premio Nobel per la fisica nel 1945.

Un anno dopo, Erwin Schrödinger e Werner Heisenberg formularono la meccanica quantistica, e nel 1927, Pauli estese questa teoria includendovi anche il concetto di spin elettronico. Solo a questo punto, con l’introduzione del momento angolare e del momento magnetico dell’elettrone fu possibile avere una spiegazione sia dell’esperimento Stern-Gerlach sia dell’effetto Zeeman anomalo: questa anomalia è causata proprio dall’interazione con il campo magnetico del momento magnetico di spin dell’elettrone [12].

Nel fermento di questi anni, si moltiplicarono gli esperimenti volti a confermare o raffinare la nuova teoria della fisica del Novecento. Accanto ai fenomeni che coinvolgevano gli elettroni, che furono i primi a essere investigati, si cominciarono a esplorare anche le proprietà dei nuclei.

La prima evidenza dell’esistenza del *momento magnetico nucleare* (μ) venne ancora una volta dagli abili sperimentatori Stern e Gerlach, che dopo anni di ottimizzazione del loro apparato sperimentale, nel 1933 riuscirono ad aumentarne notevolmente la sensibilità. Facendo attraversare un gradiente di campo magnetico da un fascio di idrogeno molecolare, i due osservarono ancora una deflessione. In questo caso, però, non si tratta dell’effetto degli elettroni, in quanto nella molecola biatomica dell’idrogeno nello stato fondamentale il momento elettronico è nullo. Viceversa, la deflessione è causata dall’interazione tra campo magnetico e momento

magnetico nucleare.

I nuclei magnetici, che possiedono uno *spin nucleare* (I) diverso da 0, si comportano come delle piccole calamite che, in presenza di un campo magnetico esterno (B) tendono ad allinearsi lungo le linee del campo. In altri termini, la presenza del campo magnetico fa sì che gli stati energetici che, per le regole della teoria quantomeccanica, sono pari a $2I+1$, non siano più degeneri, ma siano separati in energia di un termine pari a mB/I , detto anche energia dei livelli, o stati, Zeeman.

È questa differenza di energia a giocare un ruolo fondamentale nell’NMR, come intuì il fisico olandese Cornelis Jacobus Gorter (*Figura 4*) [13], che tra l’altro fu il primo a dimostrare il fenomeno del rilassamento paramagnetico.



Figura 4: Cornelis Gorter conìò per primo il nome di “nuclear magnetic resonance” nel 1942.

Alla base della comprensione di questo fenomeno c’era un concetto molto importante: le transizioni tra gli stati Zeeman di un sistema di spin nucleare si possono osservare sfruttando l’effetto della risonanza. Convinto di questo, nel 1936 Gorter pubblicò i risultati del primo tentativo di realizzare un esperimento di risonanza, che tuttavia non aveva dato alcun esito positivo [14]. Come sostiene J. H. van der Waals, in un articolo intitolato “*Gorter’s footprints on the trail that led to magnetic resonance*”, nonostante gli insuccessi sperimentali, Gorter andrebbe considerato il vero pioniere della risonanza magnetica nucleare. Fu lui, tra l’altro, a usare per primo questo nome in una pubblicazione del 1942 [15].

A partire dagli anni ‘30, uno dei laboratori più attivi nella fisica dei fasci atomici e molecolari era il laboratorio di Isidor Isaac Rabi, alla Columbia University (*Figura 5*) [16]. È qui che nel 1937 avvenne la svolta. Rabi aveva inizialmente provato a ripetere gli esperimenti ideati da Gorter, anche lui senza successo.



Figura 5: Isaac Rabi, premio Nobel per la fisica nel 1944.

Nel 1937, Gorter si recò personalmente presso il laboratorio del professor Rabi, per mostrargli il metodo per misurare il momento magnetico nucleare. Rabi accettò i suggerimenti di Gorter e, con piccole modifiche, fu finalmente in grado di osservare per primo il fenomeno della risonanza. In questo esperimento Rabi utilizzò un fascio di cloruro di litio (LiCl), che fece passare attraverso un campo magnetico costante e molto intenso.

Perpendicolarmente a questo campo magnetico fisso, venne applicato un campo magnetico oscillante con frequenza variabile. All'aumentare della frequenza delle oscillazioni, man mano che ci si avvicinava alla frequenza di Larmor del nucleo sotto osservazione, la condizione di risonanza si realizzava: in quel momento il rivelatore di Rabi segnò un picco di intensità del segnale. Nel caso più semplice di uno spin nucleare $I=1/2$, questa condizione corrisponde a fornire al sistema nucleare l'energia ΔE necessaria per passare dal livello fondamentale Zeeman ($-\mu B$) a quello eccitato ($+\mu B$). La risonanza si verifica applicando una frequenza del campo oscillante, ν , uguale a $\gamma B/2\pi$, dove γ è una costante specifica per il nucleo sotto osservazione e B è l'intensità del campo magnetico esterno. Questo esperimento fu descritto nel 1938 nel famoso articolo "A New Method of Measuring Nuclear Magnetic Moment"[17], fondamentale per l'assegnazione del Nobel per la fisica del 1944 a Isaac Rabi, mentre l'anno precedente lo stesso prestigioso premio era andato a Otto Stern per la scoperta del momento magnetico del protone.

Dal primo segnale NMR ai primi strumenti commerciali

Il periodo della seconda guerra mondiale interruppe momentaneamente la ricerca nel campo della risonanza

magnetica nucleare appena nato.

Gli anni immediatamente successivi alla guerra però videro esplodere, soprattutto negli Stati Uniti, l'interesse per questo nuovo settore sulla scia della "scuola di Rabi", che influenzò molti giovani fisici.

Tra loro c'era Edward Purcell, che nel periodo bellico era stato professore al *Radiation Laboratory* del MIT di Boston e aveva lavorato all'esplorazione di nuove tecniche spettroscopiche sfruttando le frequenze nella regione delle microonde. Questi lavori gli furono utili anche per le successive ricerche presso la Harvard University, in cui si concentrò sul magnetismo nucleare, sui fenomeni di rilassamento e su problemi legati alla struttura molecolare [18].

Nello stesso periodo, presso la Stanford University, Felix Bloch e i suoi collaboratori Hansen e Packard stavano sviluppando un nuovo metodo di induzione nucleare, una procedura sperimentale per studiare i momenti nucleari di sostanze solide, liquide e gassose. Durante la guerra Bloch aveva lavorato anche a Los Alamos dove aveva acquisito grande familiarità con le più moderne tecniche elettroniche. Inoltre, i suoi primi lavori scientifici avevano riguardato il momento magnetico del neutrone [19]. Presupposti questi del successo che ottenne nella ricerca del primo segnale NMR in sostanze solide.

Nel 1945, appena finita la guerra, i due gruppi, guidati da Purcell (*Figura 6*) e Bloch (*Figura 6a*), arrivarono, in modo indipendente e a distanza di poche settimane, allo sviluppo del primo metodo per osservare la risonanza magnetica in nuclei di molecole in fase liquida o solida, facendo un grosso passo in avanti rispetto all'esperimento di Rabi del 1938, applicabile solo a molecole isolate.



Figura 6: Edward Mills premio Nobel per la fisica nel 1952



Figura 6a: Felix Bloch, premio Nobel per la fisica nel 1952.

Entrambi avevano scelto per motivi diversi di studiare il protone, ovvero il nucleo dell'atomo di idrogeno, che è uno dei nuclei magnetici più studiati ancora oggi, per la elevata sensibilità, ma soprattutto per la sua abbondanza nei composti organici.

Purcell, con i suoi collaboratori Torrey e Pound, dopo aver assemblato uno strumento in grado di registrare le transizioni energetiche del nucleo di idrogeno sfruttando le radiofrequenze, testò la nuova tecnica su un materiale solido molto ricco di idrogeno, la paraffina [18]. Bloch, da parte sua, utilizzò come materiale da investigare delle gocce d'acqua in una sfera di vetro [20].

Entrambi avevano dovuto superare alcuni limiti tecnici per riuscire a registrare il segnale di assorbimento in corrispondenza della radiofrequenza associata alla transizione nucleare. In particolare, si doveva stimolare la transizione degli spin nucleari dallo stato fondamentale allo stato eccitato per alterare la situazione di equilibrio in cui, per la legge di Boltzmann, esiste una piccola differenza di popolazione dei livelli energetici dovuta proprio alla differenza di energia magnetica di questi livelli, che nel caso del protone sono due. In protone infatti ha spin nucleare I uguale a $\frac{1}{2}$, e l'energia che separa i due livelli, o stati Zeeman, è pari a $(\gamma h B)/(2\pi)$, dove h è la costante in Plank. Applicando una frequenza nella regione delle radiofrequenze pari a $(\gamma B)/(2\pi)$, seguendo lo stesso metodo sperimentale usato da Rabi, sia Purcell che Bloch verificarono la condizione di risonanza e registrarono un segnale di assorbimento, come quello riportato in *Figura 7* [21]. Per distinguerlo dall'esperimento di Rabi, chiamato "molecular beam magnetic resonance", quello di Bloch e Purcell, che per questo condivisero il primo Nobel della fisica nel 1952, fu chiamato "nuclear magnetic resonance in the condensed matter".

Come anche ricorda lo stesso Purcell nel suo seminario in occasione dell'assegnazione del Nobel per la fisica, uno

dei contributi maggiori al superamento delle difficoltà tecniche nel realizzare un apparato strumentale efficiente venne da un giovane dottorando olandese, Nicolas Bloembergen [22].



Figura 7: il primo segnale di risonanza magnetica nucleare dei protoni dell'acqua (da ref. 15).

Mentre Purcell e Bloch continuarono negli anni successivi al '45 a sfruttare la tecnica NMR per studiare la composizione chimica e la struttura della materia, Bloembergen si dedicò alla misura dei tempi di rilassamento, i cosiddetti tempi di rilassamento spin-reticolo, T_1 , e spin-spin, T_2 : fu lui il primo a misurarli in modo accurato. A tal proposito, il lavoro pubblicato da Bloembergen nel 1948 rappresenta una pietra miliare dello studio della dinamica dei sistemi molecolari mediante NMR [23].

La risonanza magnetica nucleare cominciava a essere usata sempre più per scopi diversi, comprese molte applicazioni di chimica dei composti solidi e in soluzione. Sono di questi anni le scoperte più importanti: tra il 1949 e il 1950, Knight [24] e, insieme, Proctor e Yu [25], scoprirono lo spostamento del segnale di assorbimento per effetto dell'intorno chimico, il cosiddetto *chemical shift*, o spostamento chimico (*Figura 8*).

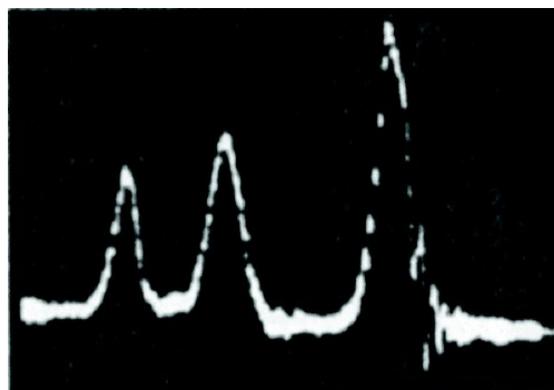


Figura 8: il primo spettro al protone dell'etanolo, con le caratteristiche tre bande per i gruppi OH, CH_2 e CH_3 , da sinistra verso destra.

Questo fenomeno permette di distinguere i nuclei che appartengono a gruppi funzionali diversi, perché a ogni tipo di nucleo corrisponde una diversa frequenza di risonanza, e quindi un diverso segnale nello spettro NMR. Lo provarono nel 1951, Packard e Arnold, della Stanford University, che osservarono per primi l'effetto dello spostamento del segnale del protone del gruppo ossidrilico (OH) nella molecola dell'etanolo, al variare della temperatura. Questa fu una delle prime importanti applicazioni dell'NMR a problematiche inerenti la chimica di base, come è la natura dei legami e delle interazioni molecolari [26], a cui seguirono molti altri lavori basati sull'osservazione di altri nuclei, come il fluoro (^{19}F) e l'azoto (^{14}N).

Nel 1950 fu realizzata la prima sequenza di impulsi di radiofrequenze con lo scopo iniziale di studiare l'effetto degli impulsi sulla forma degli spettri NMR e per misurare i tempi di rilassamento. Il successivo sviluppo delle tecniche impulsate fu possibile grazie ai primi lavori di Hahn [27], che studiò soprattutto l'evoluzione del sistema di spin nucleare negli intervalli di tempo tra un impulso e l'altro, di solito indicati con τ . Hahn realizzò anche gli impulsi di echo di spin, chiamati oggi impulsi di Hahn.

Sempre in questi anni fu scoperto il meccanismo alla base dell'accoppiamento tra gli spin, chiamato *accoppiamento scalare*, o accoppiamento J. Per la precisione, i primi a osservare uno spettro al protone con le caratteristiche righe divise in multipletti per effetto dell'accoppiamento scalare furono ancora Proctor e Yu [28], che però non seppero interpretare correttamente quanto osservato.

Subito dopo, con una serie di lavori sia teorici che sperimentali, Gutowsky, McCall e Slichter contribuirono alla completa comprensione di questo importante fenomeno [29]. La teoria dell'accoppiamento scalare tra gli spin non è affatto semplice, perché chiama in ballo una serie di contributi che coinvolgono l'interazione fra i momenti magnetici dell'elettrone e dei nuclei. Tuttavia, l'effetto dell'accoppiamento scalare sugli spettri è relativamente semplice e rappresenta uno degli strumenti più usati per assegnare i segnali NMR ai diversi siti molecolari.

Il futuro delle tecniche NMR vide un salto di qualità con il lavoro di Albert Overhauser [30], nel 1953. Overhauser ipotizzò come un'alterazione della popolazione degli spin elettronici potesse provocare un grosso cambiamento nella polarizzazione dello spin nucleare [31]. In una celebrazione di questa scoperta, presso l'università di Chicago, fu detto: "*Overhauser proposed ideas of startling originality, so unusual that they initially took portions of the scientific community back, but of such depth and significance that they opened vast new areas of science*". L'effetto Overhauser è infatti molto importante per la determinazione di strutture chimiche complesse: molte tecniche bidimensionali sono basate sul *NOE*, o sul *ROE*, ovvero sull'effetto Overhauser in un sistema di

riferimento statico o rotante.

In termini semplici, Overhauser fu il primo a dimostrare che è possibile incrementare l'intensità dei segnali, ovvero di polarizzare gli spin nucleari, di un fattore 1000 o anche di più. Il modo per ottenere questo effetto prevede di applicare una potenza, nella regione delle microonde, al sistema accoppiato nucleo-elettroni, eccitando in particolare gli elettroni. La risposta del sistema all'alterazione dell'equilibrio comporta un aumento della popolazione degli stati eccitati dei nuclei accoppiati agli elettroni e questo permette anche di ottenere informazioni strutturali del sistema sotto osservazione, come distanze di legame e geometrie di equilibrio.

Nel 1957 due ricercatori, Lauterbur e Holm, registrarono per la prima volta, uno indipendentemente dall'altro, un segnale NMR dell'isotopo del carbonio con massa atomica 13 (^{13}C) [32,33]. Il carbonio più abbondante, il ^{12}C , non è magneticamente attivo, ovvero ha spin I nullo. Al contrario il ^{13}C ha spin $1/2$, come il protone, ma ha lo svantaggio di essere poco abbondante e poco sensibile. Tuttavia, i primi spettri al carbonio 13 aprirono la strada a nuove frontiere della spettroscopia NMR, dal momento che oggi questo è uno dei nuclei più osservati, insieme al protone, per la determinazione della composizione delle molecole organiche.

Di questo stesso anno sono i primi studi NMR applicati ai polimeri di Wilson e Pake [34], e del 1959 il primo libro sulla risonanza magnetica nucleare per chimici, scritto da Pople, Schneider e Bernstein [35].

Una pietra miliare dell'NMR applicato alle sostanze solide è il lavoro di Andrew e Lowe, che in questi stessi anni [36] dimostrarono che in composti in fase solida si potevano semplificare gli spettri, agendo direttamente sulle anisotropie delle interazioni nucleari, come il chemical shift. Andrew e Lowe furono i pionieri della tecnica chiamata *Magic Angle Spinning* (MAS), che comporta la rotazione del campione a un angolo θ , uguale a 54.7° (angolo magico), con il campo magnetico statico dell'NMR. Occorreva prima ridurre il solido a polvere sottile, poi inserire la polvere in un cilindretto, da infilare in un probe modificato per poter ruotare. Oggi, la maggior parte degli studi NMR sui campioni solidi sfrutta la tecnica MAS.

Ma anche altri furono i nomi illustri: lo sviluppo delle tecniche NMR di stato solido ebbe un grosso contributo, da Hartmann e Hahn [37], Pines e Waugh [38], Redfield [39], Slichter [40] e Mansfield [41], con l'introduzione della polarizzazione incrociata (cross-polarization) e di nuove tecniche bidimensionali ad alta risoluzione dedicate ai solidi [42].

In questi anni di grande fermento sia teorico che sperimentale furono commercializzati i primi strumenti NMR. Nel 1961, dopo cinque anni di prove, la *Varian Associates Inc*, grazie al lavoro di Shoolery, mise in commercio il primo prototipo, il Varian A-60, uno spettrometro ad alta risoluzione, con la frequenza di Larmor

per il protone di 60 MHz (vedi *Figura 9*).[43]

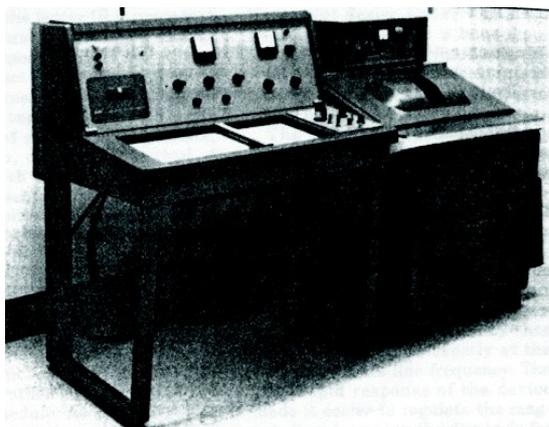


Figura 9: Primo strumento NMR commercializzato nel 1961, era un Varian A-60.

Dalla rivoluzione FT alla struttura delle macromolecole

Uno dei centri più attivi della ricerca di frontiera della risonanza magnetica nucleare fu senza dubbio la California. Negli anni sessanta, presso la stessa *Varian*, un giovane chimico, Robert Ernst, (*Figura 10*) lavorava alacremente per lo sviluppo delle tecniche strumentali di questa spettroscopia. La svolta fu il 1966. Cercando di aumentare la sensibilità della tecnica, Ernst, in collaborazione con Weston Anderson, riuscì ad applicare la tecnica di trasformata di Fourier (FT) all'NMR.

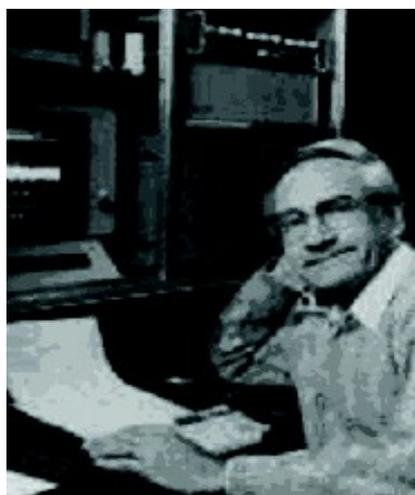


Figura 10: Richard R. Ernst, premio Nobel per la chimica nel 1991.

Fino ad allora, gli strumenti utilizzati da fisici e chimici si basavano sull'irradiazione in onda continua del segnale nella regione delle radiofrequenze. Con la tecnica sviluppata da Ernst, si poteva mandare un impulso con

una opportuna frequenza ω direttamente sul campione, e poi si trasformava il segnale registrato, che era un'intensità di corrente che decadeva nel tempo (FID), nel dominio delle frequenze, con una semplice operazione matematica: la trasformata di Fourier.

Questo velocizzava la registrazione degli spettri a qualche minuto e aumentava di un fattore 100 la sensibilità dell'NMR.[44] In precedenza, con la tecnica sviluppata da Rabi, prima, e da Purcell e Bloch, dopo, ovvero con il cosiddetto "frequency / field-sweep method", una singola scansione poteva durare 10 minuti, e un intero esperimento, che richiedeva di registrare molte volte lo spettro per far emergere il segnale sul rumore, poteva durare anche 10 ore.

Per questa vera e propria rivoluzione introdotta nel campo dell'NMR, che d'ora in poi divenne la FT NMR, Ernst ricevette il premio Nobel in chimica nel 1991,[45] ma vale la pena ricordare che prima di riuscire a pubblicare la sua scoperta nel '66, Ernst dovette provare e riprovare molte volte, perché, forse proprio per la portata innovativa del suo lavoro, non erano in molti a comprendere l'importanza e il valore di questo suo contributo.

Dall'introduzione dell'NMR in trasformata di Fourier ci fu un successivo grande sviluppo di tecniche e metodi sempre più semplici da usare per applicazioni chimiche e anche biologiche. Basti pensare alle tecniche bidimensionali (2D NMR) suggerite da Jeener nel 1971,[46] e poi sviluppate con il celebre esperimento di correlazione protone-protone, conosciuto come COSY (*Figura 11*).

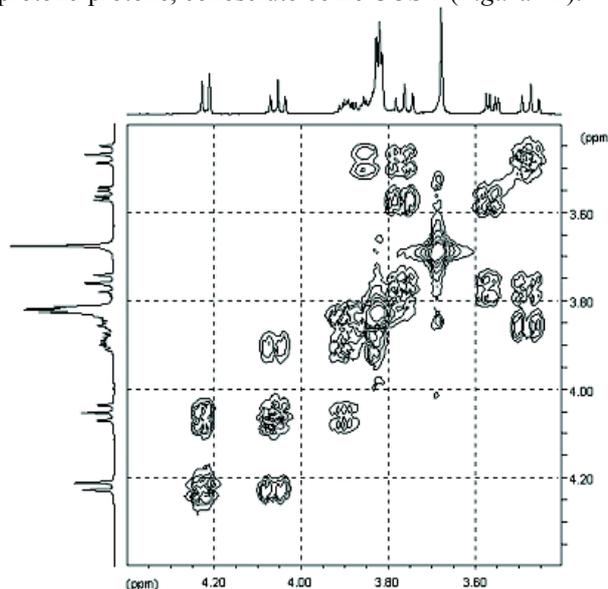


Figura 11: Spettro in due dimensioni del saccarosio, ottenuto con l'esperimento ^1H - ^1H COSY.

Dagli anni settanta in poi, l'NMR è stato applicato a problemi sempre più complessi, tra cui la risoluzione della struttura tridimensionale di macromolecole in soluzione e l'applicazione della risonanza magnetica alla medicina.

Questo aspetto fu sviluppato a partire dagli anni settanta soprattutto da Kurt Wüthrich,[47] che ha lavorato per oltre trenta anni alla determinazione della struttura delle proteine, partendo dai primi metodi che sfruttavano l'effetto NOE fino alle tecniche più sofisticate, bidimensionali, che adattò alla complessità di queste molecole,[48] insieme con Richard Ernst, presso l'ETH di Zurigo. Tra le decine di strutture risolte (Figura 12) c'è anche la prima proteina globulare, l'inibitore della proteinasi (BUSI).[49]

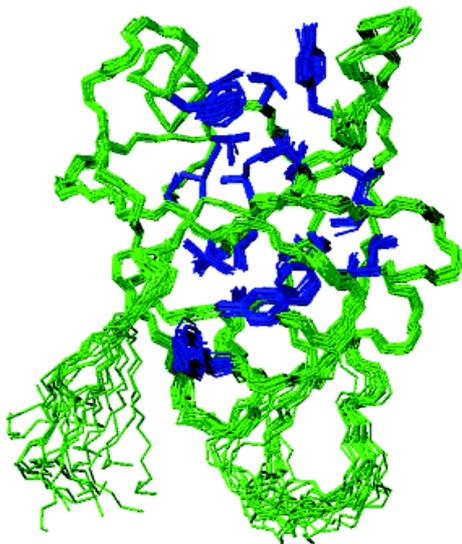


Figura 12: Struttura tridimensionale della proteina TM1290, dell'organismo *Thermotoga maritima*, risolta dal gruppo di Wüthrich (*J. Biomol. NMR* 29, 403–406 (2004)).

Per questo, e per altri contributi fondamentali alla comprensione del ruolo della struttura nell'attività degli enzimi grazie alla tecnica NMR, Wüthrich ha ricevuto il premio Nobel per la chimica nel 2003.[50] Edwin Becker, spettroscopista e divulgatore, scrive a proposito di questi contributi: “*In structural biology, NMR rivals x-ray crystallography in providing precise three-dimensional structures for proteins and other macromolecules, but NMR goes beyond x-ray crystallography in furnishing information on internal mobility and overall molecular motion in both large and small molecules*”. Oggi i biologi molecolari continuano a usare i raggi X per la determinazione delle strutture cristalline, ma non possono prescindere dalla risonanza magnetica nucleare per conoscere la struttura d'equilibrio delle proteine in soluzione, ovvero in un contesto più simile a quello fisiologico.

Non dobbiamo dimenticare però che il moltiplicarsi di nuove sequenze di impulsi NMR per la registrazione di spettri in due, tre e anche quattro dimensioni, fu il risultato della creatività di numerosi scienziati, ma fu

possibile anche grazie alle nuove tecnologie e ai nuovi materiali. Tra gli eventi che contribuirono allo sviluppo dell'NMR, va ricordata la scoperta dei materiali superconduttori di nuova generazione, che permisero di raggiungere campi magnetici molto intensi (oggi esistono strumenti con campi di 20 Tesla, operanti a 1 GHz di frequenza di Larmor per il protone), e lo sviluppo di computer e sistemi informatici sempre più veloci e dalle prestazioni avanzate.

Accanto all'evoluzione dell'NMR per applicazioni chimiche e biologiche, la risonanza magnetica nucleare ha contribuito negli ultimi decenni anche alla medicina grazie alla tecnica di “*magnetic resonance imaging*”, indicata comunemente in medicina con il termine di tomografia di risonanza magnetica, o brevemente *MRI*.[51] È da notare come la risonanza magnetica per immagini, nata intorno agli anni '70, abbia perso nella sua definizione il termine “nucleare”. Nell'immaginario collettivo infatti la parola nucleare ha un connotato negativo, e per questo fu deciso di toglierla dalla definizione. Di fatto però i principi su cui si basa la tecnica MRI sono gli stessi dell'NMR.

I personaggi che hanno segnato la storia di questo potente strumento sono molti, ma tra questi merita ricordare il contributo di Damadian,[52] Edelstein,[53] Lauterbur,[54] Mansfield[55] e dello stesso Ernst. Tutti lavorarono in modo indipendente allo sviluppo di una nuova tecnologia in grado di ottenere immagini ad alta risoluzione di tessuti e parti del corpo umano, anche se, non senza polemiche, solo Lauterbur e Mansfield hanno ricevuto per questi studi il premio Nobel per la medicina nel 2003. Nel 1971, Raymond Damadian notò per primo che i tempi di rilassamento del protone in tessuti sani sono diversi da quelli dei tessuti malati, aprendo la strada all'utilizzo dell'NMR per la diagnosi dei tumori. Nel 1973 Paul Lauterbur sperimentò la tecnica NMR per l'osservazione di tessuti tumorali in piccole provette, utilizzando per la ricostruzione delle immagini un metodo simile a quello usato nella tomografia computerizzata a raggi X, nota come TAC. Nello stesso anno, Richard Ernst suggerì un procedimento migliore per la codifica della fase e della frequenza dei segnali registrati, applicando la trasformata di Fourier: è questo il metodo di base dell'MRI di oggi. Nel 1977 Damadian fu il primo a fare una MRI sull'intero corpo umano e nello stesso anno Peter Mansfield sviluppò la tecnica di imaging echo-planare (EPI). Un grosso impulso venne anche da Edelstein, che migliorò l'MRI da un punto di vista strumentale e tecnico, permettendo l'acquisizione delle immagini in pochi secondi.

Tra le prime applicazioni mediche dell'MRI ci fu lo studio in tempo reale del ciclo cardiaco:[56] si osservava il flusso sanguigno nel corpo umano senza bisogno di un agente di contrasto, fatto questo abbastanza sorprendente. Un ulteriore sviluppo fu la risonanza magnetica funzionale, o *fMRI*, applicata allo studio del cervello, che oltre a ricostruire immagini tridimensionali (Figura 13), permetteva di evidenziare le diverse aree deputate a funzioni cerebrali diverse.



Figura 13: Esempio di immagine del cervello ottenuta mediante risonanza magnetica nucleare (MRI).

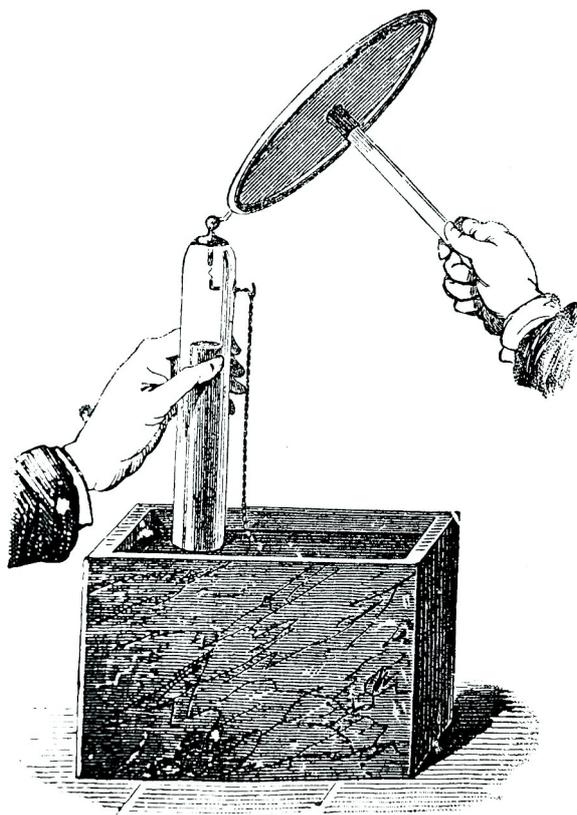
A partire da questa importante applicazione, oggi, con gli oltre 30 mila strumenti MRI sparsi per il mondo, la risonanza magnetica per immagini permette di diagnosticare malattie come la sclerosi, molti tipi di cancro e molte malattie cardiache, oltre a rivelare la rottura dei legamenti e le lesioni ai tessuti molli, non osservabili con le altre tecniche.

Riferimenti Bibliografici

- [1] <http://www.nmr.unsw.edu.au/historyofnmr.htm>
- [2] http://www.ebyte.it/library/refs/Refs_NMR_AboutHistory.html
- [3] P. Lazlo, "On the Self-Image of Chemists, 1950-2000", *Intern. J. Phys. Chem. HYLE* 2006, 12, 99.
- [4] H. Zandvoort, *Models of Scientific Development and the case of NMR*, Groningen, Doctoral dissertation 1985.
- [5] F. A. L. Anet, "A Lapsed Organic Chemist in the Wonderland of NMR", in: D.M. Grant & R.K. Harris (eds.), *Encyclopedia of nuclear magnetic resonance*, Wiley, Chichester, 1996, 1, 187.
- [6] P. Diehl, "NMR at the Physics Department of the University of Basel, Switzerland (1949-96)", in: D. M. Grant & R. K. Harris (eds.), *Encyclopedia of nuclear magnetic resonance*, Wiley, Chichester, 1996.
- [7] M. Born, *My Life: Recollections of a Nobel Laureate*, Scribner, New York 1978, p. 78.
- [8] J. S. Rigden, *Hydrogen: The Essential Element*, Harvard U. Press, Cambridge, Mass, 2002.
- [9] J. Mehra, H. Rechenberg, *The Historical Development of Quantum Theory*, 1, part 2, Springer-Verlag, New York 1982, p. 433.
- [10] <http://plato.stanford.edu/entries/physics-experiment/app5.html>
- [11] B. Friedrich, D. Herschbach, "Stern and Gerlach: How a Bad Cigar Helped Reorient Atomic Physics", *Physics Today*, December 2003, p. 53.
- [12] G. Herzberg, *Spettri atomici e struttura atomica*, Torino 1961, Boringhieri.
- [13] C. J. Gorter, *Paramagnetic relaxation*, Leyden, November 1946.
- [14] C. J. Gorter, *Physica (The Hague)*, 1936, 3, 503.
- [15] C. J. Gorter, L. J. F. Broer, "Negative result of an attempt to observe nuclear magnetic resonance in solids." *Physica (The Hague)* 1942, 9, 591.
- [16] http://nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1944/rabi-bio.html.
- [17] I. I. Rabi, J. R. Zacharias, S. Millman, P. A. Kusch, *Phys. Rev.*, 1938, 53, 318.
- [18] E. M. Purcell, H. C. Torrey e R. V. Pound, "Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid", *Phys. Rev.* 1946, 69, 37.
- [19] F. Bloch, "A Quantitative Determination of the Neutron Moment in Absolute Nuclear Magnetons", *Phys. Rev.*, 1940, 57, 111.
- [20] F. Bloch, W. W. Hansen e M. Packard, *Phys. Rev.* 1946, 69, 127.
- [21] http://nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1952/bloch-lecture.pdf
- [22] E. M. Purcell, N. Bloembergen e R. V. Pound, "Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a single crystal of CaF_2 ", *Phys. Rev.* 1946, 70, 988.
- [23] E. M. Purcell, N. Bloembergen e R. V. Pound, "Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption". *Phys. Rev.* 1948, 73, 679.
- [24] W.P. Knight, "Nuclear Magnetic Resonance Shift in Metals", *Phys. Rev.* 1949, 76, 1259.
- [25] W. G. Proctor e F. C. Yu, *Phys. Rev.* 1950, 77, 717.
- [26] J. T. Arnold e M. E. Packard, *J. Chem. Phys.* 1951, 19, 1608.
- [27] E. L. Hahn, *Phys. Rev.* 1950, 77, 297; E. L. Hahn, *Phys. Rev.* 1950, 80, 580.
- [28] W.G. Proctor, F. C. Yu, "On the Nuclear Magnetic Moments of Several Stable Isotopes", *Phys. Rev.* 1951, 81, 20.
- [29] H. S. Gutowsky, D. W. McCall, C. P. Slichter, "Coupling among Nuclear Magnetic Dipoles in Molecules", *Phys. Rev.* 1951, 84, 589; H. S. Gutowsky, D. W. McCall, C. P. Slichter, *J. Chem. Phys.* 1953, 71, 709.
- [30] http://www.physics.purdue.edu/about_us/history/Albert_W_Overhauser.shtml
- [31] A. W. Overhauser, "Polarization of Nuclei in Metals", *Phys. Rev.* 1953, 92, 411.
- [32] P. C. Lauterbur, "C13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra", *J. Chem. Phys.* 1957, 26, 217.
- [33] C. H. Holm, "Observation of Chemical Shielding and Spin Coupling of C13 Nuclei in Various Compounds by NMR", *J. Chem. Phys.* 1957, 26, 707.
- [34] C.W. Wilson e G. E. Pake, "Nuclear Magnetic Relaxation in Polytetrafluoroethylene and Polyethylene", *J. Chem. Phys.* 1957, 27, 115.
- [35] J.A. Pople, W.G. Schneider, H. J. Bernstein, *High-resolution Nuclear Magnetic Resonance*, McGraw-Hill, New York 1959.
- [36] E. R. Andrew, A. Bradbury, e R. G. Eades, *Nature* 1958, 182, 1659; I. J. Lowe, *Physics Rev. Lett.* 1959, 2, 285.
- [37] R. S. Hartmann, E. L. Hahn, *Phys. Rev.* 1962, 128, 2042.
- [38] A. Pines, M. G. Gibby, J. S. Waugh, *J. Chem. Phys.* 1972, 56, 1776.
- [39] A. G. Redfield, *J. Chem. Phys.* 1971, 55, 5405.
- [40] F. M. Lurie, C. P. Slichter, *Phys. Rev.* 1964, 133, A1109.
- [41] P. Mansfield, D. Ware, *Phys. Lett.* 1966, 7, 421.

Risonanza magnetica nucleare

- [42] R. M. Lynden Bell, R. K. Harris, *Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare*. Casa Editrice Ambrosiana - Milano, 1972.
- [43] Varian Associates. "Instruction manual: Model A-60 analytical NMR spectrometer system" (instrument manual). Varian Associates Instrument Division. 1961-1965.
- [44] R. R. Ernst e W. A. Anderson, "Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance" *Review of Scientific Instruments*, 1966, 37.
- [45] http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1991/ernst-lecture.html
- [46] J. Jeneer, Lecture at the Ampere Summer School in Basko Polje, Yugoslavia, September 1971.
- [47] K. Wüthrich, "High resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of cytochrome c." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1969, 63, 1071.
- [48] K. Wüthrich, G. Wider, G. Wagner, W. Braun, *J. Mol. Biol.* 1982, 155, 311.
- [49] M. P. Williamson, T. F. Havel, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* 1985, 182, 295.
- [50] http://www.mol.biol.ethz.ch/groups/wuthrich_group/wu_people/wkurt/res_highs
- [51] <http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/>
- [52] <http://web.mit.edu/invent/a-winners/a-damadian.html>
- [53] W. A. Edelstein, *Magn. Reson. Imag.* 1991, 9, 865.
- [54] P.C. Lauterbur, "Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance," *Nature* 1973, 242, 190.
- [55] http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2003/man-sfield-autobio.html
- [56] T. F. Budinger e P.C. Lauterbur, "NMR Technology for Medical Studies," *Science* 1984, 226, 288.



Combinaison de l'oxygène et de l'hydrogène par l'étincelle électrique.