

## Historias de la RMN

Jorge Santoro

### 13. El desarrollo de la RMN de $^{13}\text{C}$

Tras el descubrimiento del desplazamiento químico (1-3), el trabajo de Arnold, Dharmatti y Packard (4) puso de manifiesto la importancia de la espectroscopía de  $^1\text{H}$  para la caracterización de moléculas orgánicas. La espectroscopía de RMN de carbono constituía el complemento ideal para dicho estudio. Sin embargo, el desarrollo de ésta sería mucho más lento que la de protón por varios motivos. En primer lugar, el isótopo más abundante del carbono, el  $^{12}\text{C}$ , carece de spin. Este hecho es en parte beneficioso, puesto que en caso contrario los espectros de  $^1\text{H}$  se verían complicados por acoplamiento heteronucleares  $^1\text{H}$ - $^{12}\text{C}$ . El lado desfavorable de este hecho es que la espectroscopía RMN del carbono debe realizarse con el isótopo  $^{13}\text{C}$  cuya abundancia natural es de tan solo el 1,1%. El momento magnético del  $^{13}\text{C}$  había sido determinado mediante el método de resonancia magnética en haces moleculares con KCN y NaCN enriquecidos en  $^{13}\text{C}$  (5) obteniendo un valor de 0,7 magnetones nucleares, un valor que es aproximadamente la cuarta parte del momento magnético del protón. Esta relación sería confirmada posteriormente, con mayor precisión, por Poss (6) y por Virginia Royden (7). En ambos casos mediante RMN de onda continua en materia condensada y utilizando yoduro de metilo enriquecido en  $^{13}\text{C}$ . Particularmente ingenioso es el método utilizado por Virginia Royden (7). El espectro de  $^1\text{H}$  del yoduro de metilo enriquecido al 50% en  $^{13}\text{C}$  mostraba un doblete debido al acoplamiento  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . Irradiando a frecuencias cercanas al valor esperado para el  $^{13}\text{C}$  el doblete colapsaba cuando la frecuencia coincidía con la resonancia del carbono del  $^{13}\text{CH}_3$ . De este modo se determinaba simultáneamente la frecuencia de resonancia del  $^1\text{H}$  y la del  $^{13}\text{C}$ . Se trata del primer experimento de desacoplamiento descrito en la bibliografía y es un precursor de los actuales métodos de espectroscopía inversa.

Mientras que a mediados de la década de los 50 del siglo pasado se había desarrollado la espectroscopía de algunos núcleos distintos del  $^1\text{H}$ , fundamentalmente del  $^{19}\text{F}$ , del  $^{14}\text{N}$  y del  $^{31}\text{P}$ , la del  $^{13}\text{C}$  se había visto retrasada por la baja abundancia natural del isótopo. A pesar de esta dificultad en 1957 se publicaron dos notas (8,9) en las que se recogía el resultado de la observación del espectro de  $^{13}\text{C}$  de más de un centenar de compuestos. En ambos casos la estrategia para superar los problemas de baja sensibilidad consistió en utilizar líquidos netos o soluciones saturadas, emplear un campo  $B_1$  intenso, efectuar barridos rápidos y observar la señal de dispersión, que en esas condiciones sufre menos el efecto de saturación que la de absorción. El intervalo de desplazamientos químicos del  $^{13}\text{C}$  era unas 20 veces mayor que el de los protones, lo que hacía esta espectroscopía de gran valor para el estudio de compuestos orgánicos. Al año siguiente Paul Lauterbur publicó un extenso artículo (10) en el que analizaba los datos que había obtenido previamente (8) en función de características moleculares, fundamentalmente de la electronegatividad de los sustituyentes. A pesar de este éxito, la espectroscopía de  $^{13}\text{C}$  seguía siendo obstaculizada por su baja sensibilidad y en los años siguientes se realizaron pocos estudios. Un pequeño avance se produjo cuando Ed Paul y David Grant introdujeron dos mejoras en el modo de obtener los espectros (11-13). Por un lado, el uso del giro de la muestra, con lo que la intensidad de las señales y la resolución espectral se mejoraban mucho debido a una mayor homogeneidad del campo magnético. Por otro, el uso de desacoplamiento de un modo similar al del experimento de Virginia Royden (7), si bien irradiando en este caso a la frecuencia del protón y observando el espectro de  $^{13}\text{C}$ . El colapso del multiplete y la

ganancia Overhauser incrementaban la intensidad de las señales de  $^{13}\text{C}$  compensando parcialmente su baja sensibilidad.

Un importante avance que se produjo en este período (años 60 del siglo pasado) fue la disponibilidad de computadoras de promediado de transitorios (CAT) con las que las señales electrónicas se podían digitalizar y, sumando varias señales o promediándolas, mejorar la relación señal/ruido. Aunque varios investigadores habían usado el método en RMN de  $^1\text{H}$  (14-17) el procedimiento no era fácil de implementar, puesto que requería que el espectrómetro tuviera una muy buena estabilidad de la relación frecuencia/campo, una característica difícil de conseguir en los espectrómetros de RMN de la década de 1960. John Roberts consiguió que la empresa Varian le fabricara un espectrómetro especial dotado de un sintetizador digital de frecuencia y de un CAT (18). Esto le permitió obtener, mediante la adición de varios barridos, espectros de  $^{13}\text{C}$  en abundancia natural con muy buena resolución, puesto que no era preciso utilizar un barrido rápido.

El método de desacoplamiento de Paul y Grant resultaba tedioso, puesto que o bien había que localizar e irradiar a cada una de las frecuencias de  $^1\text{H}$  de la muestra, o bien efectuar varios experimentos con frecuencias de irradiación distintas que cubrieran el intervalo espectral de  $^1\text{H}$ . En el segundo caso los resultados distaban de ser óptimos. Afortunadamente a finales de 1966 Richard Ernst había propuesto un método (19) que permitía eliminar simultáneamente todos los desdoblamientos debidos a una especie nuclear. Entre las aplicaciones potenciales del desacoplamiento de banda ancha citaba *"Improvement of the sensitivity in  $^{13}\text{C}$  resonance (or in similar systems) through the collapse of multiplets caused by proton-carbon-13 couplings. At the same time, a strong noise irradiation in the proton frequency region may produce an Overhauser polarization effect which might further enhance the sensitivity of  $^{13}\text{C}$  resonance"*. El grupo de Roberts incorporó casi inmediatamente el método, trabajando en onda continua y utilizando un CAT, con muy buenos resultados. En un primer trabajo presentaron la observación del acoplamiento  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  en derivados del ciclopropano en abundancia natural (20), es decir los satélites  $^{13}\text{C}$  del espectro de  $^{13}\text{C}$  debidos al 0,02% de las moléculas. En una segunda publicación (21) discutían más ampliamente la utilidad del método y lo ilustraban con varios ejemplos. La técnica de Roberts empezó a ser utilizada por otros investigadores que podían disponer de un hardware equivalente con resultados espectaculares para la época (22, 23). Un hito destacado de esta época pre-FT fue el primer espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  en abundancia natural de una proteína, lisozima, publicado por Paul Lauterbur en 1970 (24). Conviene reproducir aquí las condiciones del experimento para mostrar sus dificultades: *"The sample was a 25% aqueous solution, pH 4, of hen's egg white lysozyme (Miles, 4X cryst.), in an 8 mm o.d. sample tube containing a 2 mm tube of  $^{13}\text{C}$ -enriched  $\text{CH}_2\text{I}_2$  to provide a  $^{13}\text{C}$  field-frequency lock signal. Proton noise decoupling was used and the sample temperature was maintained at about 30 °C. The nominal 25.15 MHz radio frequency was swept through the spectral width of 5030 Hz (200 ppm) in 50 sec, and 6260 scans were accumulated in a Varian C-1024 digital averaging device during a total period of about 87 h"*. En la publicación analizaba el espectro por comparación con un espectro simulado a partir de los desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  de los aminoácidos, que eran conocidos (25). La publicación terminaba afirmando que la sensibilidad alcanzada no parecía adecuada para el estudio rutinario de enzimas e indicaba alguna posibilidad de mejorarla. Terminaba con *"Much more attractive is the possibility of reducing the required time by two orders of magnitud by Fourier Transform NMR spectroscopy"*.

La posibilidad apuntada por Lauterbur se debía a la publicación por Ernst y Anderson en 1966 de un método alternativo de obtener los espectros de RMN (26): excitación mediante un pulso y transformada de Fourier de la señal temporal debida a la respuesta del sistema de espines. La ganancia en sensibilidad del nuevo método se estimaba en la raíz cuadrada de la anchura espectral dividida entre la anchura de línea, un valor muy elevado en el caso de los espectros de  $^{13}\text{C}$ , puesto que la anchura espectral es grande. El cambio en el modo de obtener los espectros requería modificaciones en el hardware de los espectrómetros que las casas comerciales tardarían en implementar. Por ello las primeras aplicaciones se realizaron con espectrómetros caseros. Un caso relevante aquí es el de Thomas Farrar, que se dio cuenta de que su espectrómetro era adecuado para obtener espectros por el nuevo método. En una colaboración con Edwin Becker obtuvo espectros de  $^{13}\text{C}$  que mostraban una ganancia impresionante en sensibilidad y que presentó en una reunión de la *Society for Applied Spectroscopy* que tuvo lugar en Anaheim, USA, en 1970 (27). El procedimiento de obtención era tan complicado como cuenta Ernst de su desarrollo de la espectroscopía FT. Farrar lo cuenta así (27): *"The collaborative work between NIH (Ted Becker and his group) and NBS (my research group) used our homemade spectrometer and a Fabri-Tek model 1064 signal averager. The 1064 had 4096 words of 20-bit memory and the output was in the form of punched paper tape. FID spectra were output on the punch paper tape and when we had a laundry basket full of tape we would drive 10 miles down the road to NIH to carry out the data reduction. The data reduction at NIH involved several computers since the computer which could read the punched paper tape had no plotter or graphics; it was used to convert the paper tape to punched cards which were then carried to another computer where the Fourier transformation and plotting were done"*. Farrar y Becker además idearon un método (28) que permitía una repetición rápida de la secuencia pulso-fid. Curiosamente el nombre del experimento está relacionado con la caza de brujas del senador McCarthy (27): *"We called our experiment the DEFT experiment (driven equilibrium Fourier transform). We had originally thought about calling it the LEFT (longitudinal equilibrium Fourier transform), but the McCarthy days were still fresh in everyone's mind and the US government was not wildly enthusiastic about LEFTist activities"*. El método es útil en los casos en los que  $T_1 > T_2^*$  (28,29) y consiste en aplicar un pulso de  $180^\circ$  tras haber adquirido la fid durante un tiempo  $t$ . Un tiempo  $t$  tras el pulso de  $180^\circ$  se produce un eco y un pulso de  $90^\circ$  de fase adecuada lleva la magnetización del plano al eje  $z$ . Se recupera con ello la magnetización longitudinal más rápidamente que con la secuencia habitual, aumentando con ello el número de repeticiones posibles por unidad de tiempo. El método, sin embargo, no era nuevo. Tal como descubrieron sus autores poco después de la publicación, Herman Carr, en el tiempo pre-FT en el que no se realizaba la transformada de Fourier de la fid, lo había diseñado durante un estudio del tiempo de relajación  $T_1$  del  $^{129}\text{Xe}$  (30).

Paralelamente al trabajo de Farrar y Becker, Tony Keller, que dirigía la representación de la empresa Bruker en USA, estaba realizando modificaciones de uno de sus espectrómetros que eran adecuadas para usar la técnica de FT (31). Un avance fundamental era que el CAT estaba asociado a una computadora PDP-8, por lo que el tratamiento de la fid no requería el largo proceso que habían tenido que usar Farrar y Becker. Sus primeros intentos con espectros de  $^1\text{H}$  fueron decepcionantes porque los pulsos de protón afectaban a la señal de  $^{19}\text{F}$  que utilizaba para el lock. Decidió entonces probar con espectros de  $^{13}\text{C}$  con desacoplamiento de protón de banda ancha, obteniendo espectros de gran calidad. Los resultados los presentó en el mismo congreso que Farrar. Inmediatamente Bruker empezó a comercializar accesorios FT para sus espectrómetros de 60 y 90 MHz. Algo más tarde Varian hizo lo mismo para la serie XL-100 y Jeol para el PS-100. Un tercer caso a resaltar (32) es el de la publicación por Adam Allerhand del espectro de  $^{13}\text{C}$  de una proteína, ribonucleasa, obtenido

mediante el método FT, en el que la ganancia apuntada por Lauterbur (24) era evidente. La concentración usada era similar a la de Lauterbur, pero trabajando a una frecuencia de 15 MHz, inferior a los 25 MHz de Lauterbur, los autores obtenían un espectro de mayor calidad en "tan solo" 10 horas en las que acumulaban 65.000 fids.

A partir de 1970 la transición del modo de onda continua al modo FT se produjo de modo acelerado. Con la llegada del modo FT la espectroscopía de  $^{13}\text{C}$  adquirió gran importancia. Tanto es así que la empresa Varian presentó en 1973 un espectrómetro, el CFT-20, dedicado exclusivamente a la RMN de  $^{13}\text{C}$  (un anuncio puede verse en Anal. Chem., 45, 871A, 1973). El número de publicaciones sobre  $^{13}\text{C}$ -NMR aumentó significativamente y muy pronto se publicaron libros dedicados exclusivamente a esta rama de la RMN (33,34). El de George Levy y Gordon Nelson apareció pronto en nuestro país en una traducción de M<sup>a</sup> Rosa Cuberes y Francisco Sánchez Ferrando (35).

Paralelamente al desarrollo de la espectroscopía de  $^{13}\text{C}$  se produjo el impulso de la de otros núcleos. Hasta principios de la década de 1970 era habitual que las casas comerciales construyeran sus espectrómetros alrededor de núcleos específicos en lugar de ser multinucleares. Esta dificultad junto con los problemas de una baja constante magnetogírica, escasa abundancia natural o la presencia de un momento cuadrupolar había obstaculizado el desarrollo de la RMN de muchos núcleos. Las ventajas del modo FT y del desacoplamiento de banda ancha junto con la llegada de espectrómetros de mayor campo magnético, basados en sintetizadores de frecuencia con sondas de banda ancha, cambió por completo el panorama. En pocos años se registraron espectros RMN de prácticamente todos los elementos de la tabla periódica (36).

## Referencias

1. W.G. Proctor, F.C. Yu, *The Dependence of a Nuclear Magnetic Resonance Frequency upon Chemical Compound*, Phys. Rev., 77, 717, 1950.
2. W.C. Dickinson, *Dependence of the  $F^{19}$  Nuclear Resonance Position on Chemical Compound*, Phys. Rev., 77, 736-737, 1950.
3. G. Lidström, *An Experimental Investigation of the Nuclear Magnetic Moments of  $D^2$  and  $H^1$* , Phys. Rev., 78, 817-818, 1950.
4. J.T. Arnold, S.S. Dharmatti, M.E. Packard, *Chemical Effects on Nuclear Induction Signals from Organic Compounds*, J. Chem. Phys., 19, 507, 1951.
5. R.H. Hay, *The Nuclear Magnetic Moments of  $C^{13}$ ,  $Ba^{135}$  and  $Ba^{137}$* , Phys. Rev., 60, 75-86, 1941.
6. H.L. Poss, *On the Magnetic Moments of  $C^{13}$ ,  $F^{19}$ ,  $Tl^{203}$ , and  $Tl^{205}$* , Phys. Rev., 75, 600-606, 1949.
7. V. Royden, *Measurement of the Spin and Gyromagnetic Ratio of  $^{13}\text{C}$  by the Collapse of Spin-Spin Splitting*, Phys. Rev., 96, 543-544, 1954.
8. P.C. Lauterbur,  *$C^{13}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectra*, J. Chem. Phys., 26, 217-218, 1957.
9. C.H. Holm, *Observation of Chemical Shielding and Spin Coupling of  $C^{13}$  Nuclei in Various Chemical Compounds by Nuclear Magnetic Resonance*, J. Chem. Phys., 26, 707-708, 1957.
10. P.C. Lauterbur, *Some Applications of  $C^{13}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectra to Organic Chemistry*, Ann. N. Y. Acad. Sci., 70, 841-857, 1958.
11. E.G. Paul, D.M. Grant, *Additivity Relationships in Carbon-13 Chemical Shift Data for the linear Alkanes*, J. Am. Chem. Soc., 85, 1701-1702, 1963.

12. E.G. Paul, D.M. Grant, *Carbon-13 Magnetic Resonance. I. Improved Carbon-13 Magnetic Resonance Spectra Obtained by Proton Decoupling and Rapid Sample Spinning*, J. Am. Chem. Soc., 86, 2977-2983, 1964.
13. D.M. Grant, E.G. Paul, *Carbon-13 Magnetic Resonance. II. Chemical Shift Data for the Alkanes*, J. Am. Chem. Soc., 86, 2984-2990, 1964.
14. O. Jardetzky, N.G. Wade, J.J. Fisher, *Proton Magnetic Resonance Investigation of Enzyme-Coenzyme Complexes*, Nature, 197, 183-184, 1963.
15. M.P. Klein, G.W. Barton, *Enhancement of Signal-to-Noise Ratio by Continuous Averaging: Application to Magnetic Resonance*, Rev. Sci. Instr., 34, 754-759, 1963.
16. P. Laszlo, P. von R. Schleyer, *Ring Size Effect on cis-Olefinic Coupling Constants of Cycloalkenes. Use of <sup>13</sup>C Patterns*, J. Am. Chem. Soc., 85, 2017-2018, 1963.
17. L.C. Allen, L.F. Johnson, *Chemical Applications of Sensitivity Enhancement in Nuclear Magnetic Resonance and Electron Spin Resonance*, J. Am. Chem. Soc., 85, 2668, 1963.
18. F.J. Weigert, J.D. Roberts, *Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Benzene-13C*, J. Am. Chem. Soc., 89, 2967-2969, 1967.
19. R.R. Ernst, *Nuclear Magnetic Double Resonance with an Incoherent Radio-Frequency Field*, J. Chem. Phys., 45, 3845-3861, 1966.
20. F.J. Weigert, J.D. Roberts, *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Carbon-Carbon Coupling in Cyclopropane Derivatives*, J. Am. Chem. Soc., 89, 5962-5963, 1967.
21. F.J. Weigert, M. Jautelat, J.D. Roberts, *Natural Abundance C13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Medium-Molecular-Weight Organic Compounds*, Proc. Natl. Acad. Sci. US, 60, 1152-1155, 1968.
22. L.D. Hall, L.F. Johnson, *Chemical studies by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance Spectroscopy: some chemical shift dependencies of oxygenated derivatives*, J. Chem. Soc. D, 509-510, 1969.
23. A.J. Jones, D.M. Grant, K.F. Kuhlmann, *Carbon-13 Magnetic Resonance. XIII. Assignment of Carbon-13 Resonances Using the Nuclear Overhauser Effect*, J. Am. Chem. Soc., 91, 5013-5017, 1969.
24. P.C. Lauterbur, *<sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance of Proteins*, Appl. Spectrosc., 24, 450-452, 1970.
25. W. Horsley, H. Sternlicht, J.S. Cohen, *Carbon-13 magnetic resonance studies of carbon-13 enriched amino acids*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 47-51, 1969.
26. R.R. Ernst, W.A. Anderson, *Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance*, Rev. Sci. Instrum., 37, 93-102, 1966.
27. T.C. Farrar, *Historical Reminiscences of Some NMR Experiences*, en *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance* (D.M. Grant, R.K. Harris, eds), Vol 1: *Historical Perspectives*, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 1996.
28. E.D. Becker, J.A. Ferretti, T.C. Farrar, *Driven Equilibrium Fourier Transform Spectroscopy. A New Method for Nuclear Magnetic Resonance Signal Enhancement*, J. Am. Chem. Soc. 91, 7784-7785, 1969.
29. R.R. Shoup, E.D. Becker, T.C. Farrar, *The Driven Equilibrium Fourier Transform NMR Technique: An Experimental Study*, J. Magn. Reson., 8, 239-310, 1972.
30. R.L. Streever, H.Y. Carr, *Nuclear Magnetic Resonance of Xe129 in natural Xenon*, Phys. Rev., 121, 20-25, 1961.

31. T. Keller, *The Development of the First Multinuclear Fourier NMR Spectrometers*, en *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance* (D.M. Grant, R.K. Harris, eds), Vol 1: *Historical Perspectives*, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 1996.
32. A. Allerhand, D.W. Cochran, D. Doddrell, *Carbon-13 Fourier Transform NMR Spectroscopy, II. Ribonuclease*, Proc. Natl. Acad. Sci., 67, 1093-1096, 1970.
33. J.B. Stothers, *Carbon-13 NMR Spectroscopy*, Academic Press, New York, 1972.
34. G.C. Levy, G.L. Nelson, *Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance for Organic Chemists*, Wiley-Interscience, New York, 1972.
35. G.C. Levy, G.L. Nelson, *Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 para Químicos Orgánicos*, traducción de M.R. Cuberes y F. Sánchez Ferrando, Ediciones Bellaterra, 1976.
36. R.K. Harris, B.E. Mann, *NMR and the Periodic Table*, Academic Press, London, 1978.