

G. Barone, I. Giudicianni, A. Pezzella

Elementi di Spettroscopia NMR

Indice:

1. Definizione	pag. 2
2. Principio fisico	pag. 2
3. Campo magnetico	pag. 3
4. Spin nucleare	pag. 4
5. Nuclei osservabili	pag. 5
6. Un moderno Spettrometro	pag. 17
7. Tabella	
8. Spettroscopia NMR ad impulso.	pag. 23
9. Frequenza di risonanza ed intensità di campo magnetico	pag. 33
10. La Trasformata di Fourier di un segnale	pag. 33
11. Esecuzione di uno spettro	pag. 37
11.1 Rapporto segnale-rumore	pag. 38
11.2 Procedura per determinare l'impulso a 90° (PW)	pag. 39
11.3 Larghezza spettrale e "folding"	pag. 39
12. Procedura di "shimming"	pag. 42
12.1 Shim di spinning	pag. 44
12.2 Shim di non-spinning	pag. 45
12.3 Shimming automatico	pag. 46
13. Applicazioni della risonanza magnetica nucleare	pag. 48
13.1 Analisi degli alimenti	pag. 48
13.2 Analisi degli olii e dei grassi	pag. 48
13.3 Analisi ² H-NMR delle bevande fermentate	pag. 51
13.4 Tomografia a risonanza di spin nucleare	pag. 52
13.5. Lo stato solido	pag. 53
14. Prevenzione e Sicurezza	pag. 54
15. Elenco dei simboli	pag. 57
16. Vocabolario NMR	pag. 58

1. Definizione.-

La spettroscopia di RMN è una tecnica per determinare quantitativamente la presenza di alcuni elementi chimici misurando la quantità di energia assorbita da parte di una spirale a radiofrequenza (RF) che circonda il campione. Elementi con uno o più isotopi che possiedono un momento magnetico, cioè che si comportano come piccoli magneti, possono essere rilevati in questo modo quando l'esperimento è condotto in un opportuno campo magnetico.

Se la forza del campo magnetico oppure la radiofrequenza sono mantenuti costanti mentre l'altro varia in un certo intervallo di valori, ovvero in uno spettro, si osservano delle piccole variazioni nei picchi di assorbimento che possono essere interpretate in termini di diversi intorni chimici del particolare elemento analizzato. La suddivisione di alcuni di questi picchi in più linee può avvenire dalle interazioni tra vari nuclei magnetici all'interno della molecola, e questo fornisce ulteriori informazioni sulle relazioni strutturali tra gli atomi stessi.

2. Principio fisico.-

Per meglio comprendere il fenomeno della risonanza si pensi all'attraversamento di un ponte da parte di un plotone di soldati. Il ponte sarà dotato di una sua elasticità che produrrà delle oscillazioni di una certa frequenza. Fino a quando i soldati percorreranno il ponte disordinatamente, la frequenza delle sue oscillazioni non subirà alcun incremento significativo. Se i soldati invece decideranno di percorrere il ponte al passo, può verificarsi che la frequenza della loro marcia cadenzata, raggiunga e si sommi a quella del ponte innescando il fenomeno della "risonanza" che, in questo caso, anziché agire sul nucleo di un atomo, come nell'NMR, può provocare un fenomeno grave come la rottura del ponte stesso.

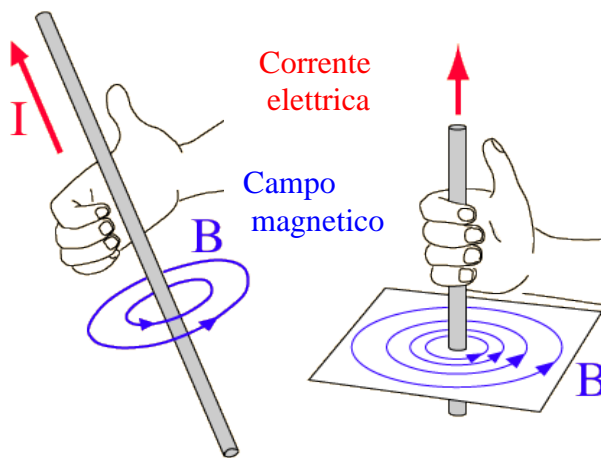
3. Campo magnetico.-

Per poter eseguire, quindi, un esperimento di NMR è indispensabile una sorgente di campo magnetico ed una di radiofrequenza. Il campo magnetico ^{rif 1} deve essere rigorosamente omogeneo, indipendentemente da come è generato: magnete permanente, elettromagnete, superconduttore.

Rif. 1. La magnetite (Fe_3O_4) è un minerale naturale che ha la proprietà di attirare il ferro e di respingere o, comunque, interagire con altri minerali. Questa proprietà viene detta magnetismo e i corpi che la posseggono vengono detti magneti o comunemente calamite. Da un semplice esperimento effettuato con un magnete e con della limatura di ferro si intuisce subito che la capacità di attrarre non è estesa a tutta la superficie del magnete ma solo alle sue estremità, le quali prendono il nome di poli magnetici (convenzionalmente nord o positivo, sud o negativo). Pur esistendo strane polarizzazioni geomagnetiche all'interno della struttura del nostro pianeta, si può tuttavia escludere l'esistenza in natura di "monopoli", possibili invece per le cariche elettriche. Dalla suddivisione di un magnete rettilineo, infatti, si ottengono frammenti sempre dotati di polarità magnetica.

I magneti permanenti degli spettrometri, venivano largamente usati quando in passato, i campi magnetici non prodotti da elettromagneti non erano molto diffusi e la superconduttività, ancora sperimentale, si affacciava nel mondo scientifico con strumenti non ancora commerciali (anni settanta). Attualmente i superconduttori rappresentano la frontiera tecnologica più avanzata nel campo della spettroscopia di risonanza magnetica nucleare. L'uso dei superconduttori^{rif2} ha permesso, infatti, di poter disporre di campi magnetici sempre più intensi (18 Tesla quello attualmente più potente) e ciò, con l'ausilio di una elettronica sempre più sofisticata, ha consentito lo studio strutturale anche di molecole mai potute studiare con i vecchi spettrometri.

Figura 1. Regola della mano destra



Oltre alla ferrite, i campi magnetici possono essere prodotti da magneti “resistivi”: elettromagneti e superconduttori. Gli elettromagneti sfruttano il passaggio di corrente in un conduttore che, come è noto, quando è percorso da cariche elettriche in moto, produce non solo un campo elettrico indotto ma anche un campo magnetico esterno che sarà proporzionale alla quantità di cariche che fluiscono. Questi magneti producono campi relativamente modesti che possono però superare i 2 Tesla. Essi hanno bisogno dell'erogazione di una grande quantità di energia elettrica e, per il conseguente effetto Joule che si produce, anche di un efficace sistema di raffreddamento, normalmente ad acqua, per dissipare il calore prodotto dalla grande quantità di elettroni in movimento.

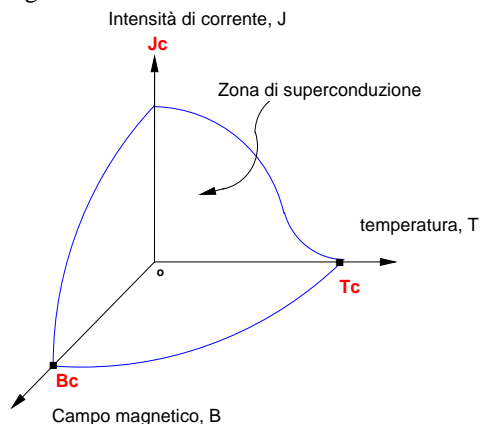
Rif. 2 Conduttori e superconduttori. La conduzione elettrica consiste nel passaggio di cariche elettriche da un punto ad un altro che può trovarsi allo stato solido, liquido o gassoso. Per un metallo alle temperature ordinarie, la conducibilità elettrica, che misura la capacità di condurre è inversamente proporzionale alla temperatura assoluta. Gli atomi del conduttore metallico formano un reticolo che vibra quanto più è alta la temperatura del conduttore stesso. Gli elettroni, che si muovono attraverso il reticolo, non procedono in linea retta a causa delle collisioni che avvengono tra loro e le imperfezioni ed i difetti del reticolo oltre alle vibrazioni termiche degli atomi del reticolo stesso (note come fononi). A causa delle collisioni, quindi, gli elettroni perdono energia sotto forma di calore. Questa diffusione di elettroni rende il materiale resistivo. **I superconduttori** come gli elettromagneti, sono annoverati impropriamente tra quelli resistivi ma, come vedremo in seguito, è proprio la loro capacità di non opporsi al passaggio della corrente elettrica che li rende tali.

4. Spin nucleare.-

Considerando la dualità onda-particella nella meccanica quantistica, per taluni scopi è utile pensare alle particelle come onde, mentre per altri fini è utile pensare alle onde come particelle. Usando infatti questa dualità è possibile descrivere nei termini di particelle tutto l'universo, senza escludere la luce e la gravità. Queste particelle hanno una proprietà denominata **spin** ^{rif 3} Particelle fondamentali come i protoni e gli elettroni si comportano come se ruotassero intorno al proprio asse e, conseguentemente, sono dotati di un momento angolare μ . Se un nucleo contiene un numero pari di protoni e di neutroni gli spin sono appaiati, cioè per ogni nucleone che ruota in una direzione v'è n'è un altro che ruota in senso opposto, ed in totale il nucleo non mostra alcuno spin. Ma, se vi è un numero dispari di nucleoni nel nucleo, come nel caso del ^1H , ^{19}F , ^{31}P , tabella 2, vi sarà un momento angolare di spin risultante che può essere multiplo di $\frac{1}{2} (\hbar/2\pi)$ dove \hbar è la costante di Planck. Il momento angolare di spin è indicato con il simbolo \bar{I} .

La prima teoria microscopica del fenomeno della superconduttività fu formulata nel 1957 dai tre fisici americani John Bardeen, Leon N. Cooper e J. Robert Schrieffer. La teoria è denominata in onore degli autori come teoria BCS. Secondo questa teoria, gli elettroni di conduzione si propagano senza incontrare resistenza perché si muovono in coppie, le cosiddette "coppie di Cooper". Gli elettroni formano coppie di Cooper in quanto interagiscono in modo dinamico con i fononi (vibrazioni degli atomi del reticolo). I fononi tendono a neutralizzare la repulsione colombiana, che normalmente si esercita tra gli elettroni, producendo una debole forza attrattiva che lega gli elettroni in coppie.

Gli ioni (cariche positive) sono attirati a causa dell'interazione colombiana verso un elettrone di conduzione (carica negativa) che si muove attraverso il reticolo del solido, creando così una regione arricchita di carica positiva. Questa regione del reticolo attira a sua volta un altro elettrone che si trova nelle vicinanze. Il legame risultante tra i due elettroni è debole, con una energia tipica di pochi millielettronvolt che è però sufficiente ad impedire che la coppia venga divisa a causa degli ostacoli della normale conduzione. Di conseguenza, le coppie di Cooper si propagano nel



materiale senza incontrare resistenza. L'intensità di questa interazione dipende fortemente dalla temperatura essendo il raffreddamento essenziale per bloccare le vibrazioni reticolari (i fononi). A temperature al di sopra del valore critico, le fluttuazioni termiche distruggono le coppie di Cooper e di conseguenza lo stato di superconduttività del metallo. È bene rilevare che la coppia di Cooper è una struttura dinamica, cioè esiste solo in moto. I superconduttori che normalmente si usano nella risonanza magnetica nucleare hanno una bobina formata da una lega di niobio e titanio ma, comunque, molti elementi sono stati usati per il passato: il mercurio, l'indio, il

lantano, piombo, renio, stagno, vanadio, etc. Lo stato critico dei superconduttori è: la temperatura critica Tc, il campo magnetico critico Bc, e la densità di corrente critica Jc. Ciascuno di questi parametri è strettamente dipendente dagli altri due. Mantenere lo stato di superconduttività significa che le tre grandezze sopra citate debbono essere tutte al di sotto del proprio valore critico.

5. Nuclei osservabili.-

Oltre sessanta elementi chimici sono stati analizzati con tecniche NMR, alcuni di questi hanno addirittura più isotopi con le opportune proprietà nucleari, solo un numero limitato di essi possiede un momento magnetico nucleare che permette una applicazione routinaria a problemi chimici.

Tabella 1. Valori di spin relativi al peso e numero atomico

Nuclei	Protoni spaiati	Neutroni spaiati	Valore di spin	γ (MHz/T)
^1H	1	0	1/2	42.58
^2H	1	1	1	6.54
^{31}P	0	1	1/2	17.25
^{23}Na	2	1	3/2	11.27
^{15}N	1	1	1	3.08
^{13}C	0	1	1/2	10.71
^{19}F	0	1	1/2	40.08

Se noi limitiamo il nostro interesse a quegli elementi che sono elencati nella Tabella 3, solo il protone, ^{19}F ed ^{31}P hanno sia la sensibilità nucleare che l'abbondanza isotopica naturale per essere agevolmente osservati. Negli ultimi decenni lo sviluppo tecnologico ha consentito la costruzione e la diffusione di strumenti in grado di lavorare di routine anche con nuclei a bassa sensibilità e bassa abbondanza naturale come il ^{13}C , ^{15}N e ^{17}O .

Tabella 2. Alcuni nuclei osservabili all'NMR

Isotopo	Valori della frequenza in MHz per 14,082 kG e 23,487 kG	Abbondanza naturale %	Sensibilità relativa	Valore di spin
^1H	60,00 100,00	99,985	1,00	1/2
^2H	9,210 15,351	0,015	$9,65 \times 10^{-3}$	1
^{11}B	19,250 32,084	80,42	0,165	3/2
^{13}C	15,087 25,144	1,108	$1,59 \times 10^{-2}$	1/2
^{15}N	4,334 7,2238	0,3673	$1,01 \times 10^{-3}$	1
^{17}O	8,134 13,56	0,037	$2,91 \times 10^{-2}$	5/2
^{19}F	56,446 94,077	100	0,833	1/2
^{31}P	24,288 40,481	100	0,066	1/2

Rif 3 La condizione dello spin consiste nell'immaginare le particelle come piccole trottole che ruotano intorno al proprio asse, tenendo conto però che la meccanica quantistica non prevede per esse un asse ben definito. Cosa ci dice realmente il valore di spin di una particella e quale aspetto abbia a seconda della posizione dell'osservatore è appresso esemplificato. Una particella di spin 0 è come un punto: essa appare sempre uguale da qualsiasi direzione la si guardi. Una particella di spin 1 è come una freccia: essa ci presenta aspetti diversi se osservata da direzioni diverse e prenderà la posizione originaria dopo una rivoluzione di 360 gradi.

Di solito, i campioni sottoposti ad indagine NMR sono in soluzione, di preferenza in solventi che non abbiano nuclei della stessa specie di quelli in esame.

Tuttavia, sono da pochi anni in commercio anche spettrometri in grado di analizzare sostanze allo stato solido con particolari sonde (probes) per l'analisi di mucillagini, gel, tessuti e sostanze polimeriche viscosi. Gli studi NMR sul protone sono normalmente condotti in solventi deuterati come ad esempio il deuterocloroformio (CDCl_3). La percentuale di cloroformio (CHCl_3) residuo nel solvente, generalmente 0,2-0,5%, dà un piccolo segnale che è facilmente identificabile e distinguibile da quelli del campione.

Associato alla rotazione di una particella carica vi sarà un campo magnetico poiché una carica che si muove in circolo si comporta come una corrente che fluisce in un conduttore. Il nucleo quindi si comporta come se possedesse un momento magnetico dipolare che è indicato con il simbolo μ . In assenza di campo magnetico i nuclei si comportano (fig. 3) come i poli di un dipolo magnetico e possono essere orientati in qualsiasi direzione con uguale probabilità. L'applicazione di un forte campo magnetico al campione che contiene un insieme di tali nuclei porta alla polarizzazione magnetica del campione. Per nuclei con $I = 1/2$ vi sono solo due stati energetici possibili: il momento magnetico può allinearsi parallelamente al campo, analogamente ad un ago calamitato nel campo terrestre, oppure antiparallelamente al campo.

In un campo magnetico omogeneo \mathbf{B}_0 si indica solitamente la direzione delle linee di forza del campo coincidente con l'asse z in una terna cartesiana. Un teorema della quantomeccanica stabilisce che un nucleo caratterizzato dal momento angolare $\mathbf{p} = 0$ può orientare il vettore magnetizzazione in modo tale che la sua proiezione sull'asse Z obbedisca ad una delle seguenti equazioni

$$\begin{aligned}
 \text{(a)} \quad P_z &= \frac{h}{2\pi} I & \text{(b)} \quad \mu_z &= \gamma \frac{h}{2\pi} I \\
 &= \frac{h}{2\pi} (I - 1) & &= \gamma \frac{h}{2\pi} (I - 1)
 \end{aligned}$$

Una particella di spin 2 è come una freccia con due punte, una per ciascuna estremità: essa riprenderà lo stesso aspetto solo dopo una semirivoluzione di 180 gradi, come particelle di spin maggiore riprenderanno lo stesso aspetto dopo una frazione minore di rivoluzione completa. Abbastanza inverosimile invece sembra la presenza di particelle che tornano ad avere il loro aspetto originario dopo due rivoluzioni complete. Queste particelle si dice che hanno uno spin di $1/2$ (o spin semintero). Tutte le particelle sono suddivise in due gruppi: particelle di spin $1/2$ che compongono tutta la materia dell'universo, e particelle di spin 0, 1 e 2 etc. che danno origine alle forze che si esercitano tra le particelle di materia.

$$= \frac{h}{2\pi} (I - 2) \qquad \qquad \qquad = \gamma \frac{h}{2\pi} (I - 2)$$

.....

$$= \frac{h}{2\pi} (-I) \qquad \qquad \qquad = \gamma \frac{h}{2\pi} (-I)$$

Poiché la direzione di p e μ sono parallele, ciò significa che anche μ potrà assumere quelle orientazioni che obbediscono alle equazioni **b**.
Le serie di valori $I; (I-1).....(-I)$ è usualmente abbreviata usando il numero quantico magnetico m

$$\mathbf{m} = I; (I-1) \dots (-I)$$

pertanto le equazioni a e b diventano rispettivamente genericamente:

$$P_z = \frac{h}{2\pi} m \quad (\mathbf{a}') \quad \text{e} \quad \mu_z = \gamma \frac{h}{2\pi} m \quad (\mathbf{b}')$$

Ove m può assumere ognuno dei $(2I + 1)$ valori citati precedentemente.

Ora, un tale nucleo immerso in un campo esterno \mathbf{B}_0 , tenderà ad orientare il vettore m secondo le linee di forza del campo.

A tale azione si oppone la presenza di p che mantiene con m una simbiosi come da gemelli siamesi. In definitiva il vettore m inizia un moto di precessione attorno all'asse Z alla frequenza angolare $\omega = \gamma \mathbf{B}_0$, descrivendo in tal modo la superficie laterale di un cono il cui vertice è posto all'origine degli assi.

Se in luogo di un solo nucleo Figura 2, immaginiamo una moltitudine di nuclei in un campo \mathbf{B}_0 , ognuno di essi avrà il proprio vettore m che ruoterà attorno a Z descrivendo una superficie conica. Per un nucleo avente $I = 1/2$ (come ^1H e ^{13}C), le orientazioni del vettore m sono 2, e quindi una parte dei nuclei ruoterà attorno all'asse $+Z$ ed un'altra attorno all'asse $-Z$. Tali popolazioni di spin sono pressochè uguali: a motivo della piccola differenza di energia tra gli stati di spin parallelo ed antiparallelo.

Ovviamente la popolazione con m orientato alla stessa maniera di \mathbf{B}_0 sarà leggermente più abbondante poiché questa orientazione, anche se di poco, è energeticamente più favorevole.

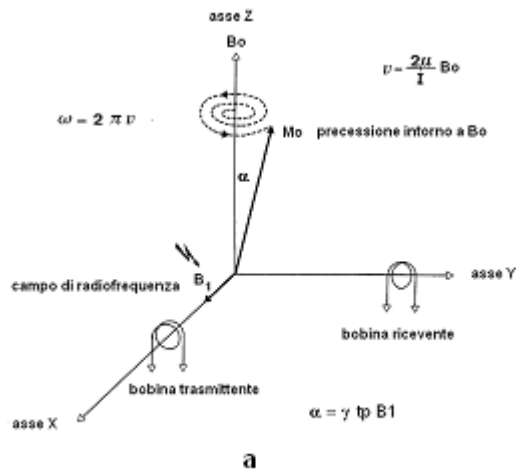
Possiamo pittoricamente descrivere la situazione come nel disegno 2b . ricordando che l'esperimento NMR è provocato dalla differenza di popolazione di spin, il disegno può essere modificato come in 2c Pertanto l'esperimento NMR consiste nel deviare di un certo angolo rispetto all'orientazione iniziale lungo Z tale cono di precessione risultante.

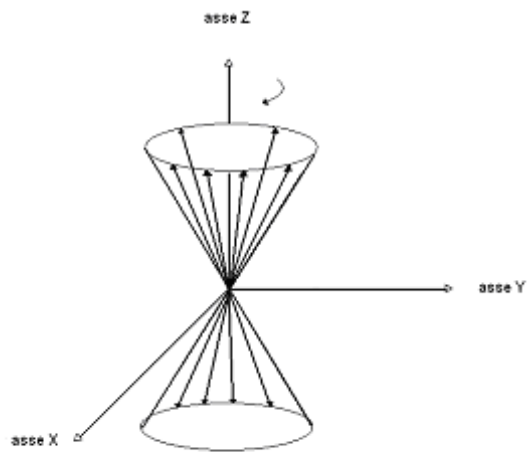
A questo punto si può esemplificare la rappresentazione introducendo il concetto di *magnetizzazione macroscopica* M_0 (2a) ovvero di un vettore che rappresenti la sommatoria di tutte le componenti μ_{zi} lungo l'asse Z .

In tal caso l'esperimento NMR consiste nell'allontanare dall'equilibrio il vettore M_0 , mediante la creazione di un campo magnetico oscillante lungo l'asse X (d)

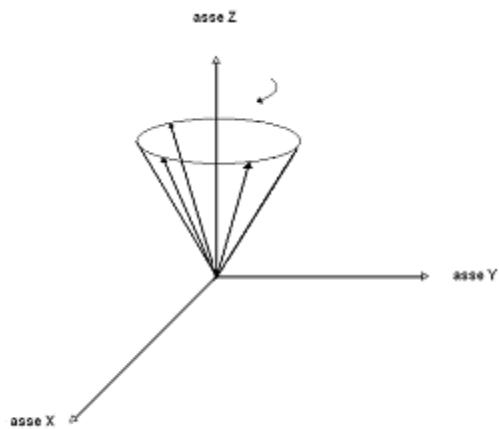
L'orientazione parallela è più stabile di una piccolissima quantità di energia $2\mu B_0$. L'intero sistema è in uno stato di equilibrio dinamico a causa degli urti molecolari dovuti al moto termico delle molecole. Un nucleo non può rimanere in un singolo stato energetico tanto a lungo senza essere disturbato, cosicché o assorbe energia e salta dallo stato parallelo a quello antiparallelo, oppure perde energia e compie la transizione inversa. Quando si raggiunge l'equilibrio tra le popolazioni di due stati è stato calcolato che lo stato parallelo è leggermente più popolato. Tale differenza di popolazione è piccola, inversamente proporzionale alla temperatura assoluta e direttamente proporzionale al momento magnetico e alla forza del campo B_0 . Per il protone in un campo di 1,4T (14092 Gauss) a 300° K (temperatura ambiente) vi sono 1.000.010 nuclei allineati parallelamente al campo esterno per ogni 1.000.000 di nuclei allineati antiparallelamente. I dieci nuclei al di là dei 2.000.000 che rappresentano l'eccesso di popolazione nello stato parallelo sono responsabili dello sviluppo della debole polarizzazione magnetica dell'intero campione.

Figura 2 - Il vettore “magnetizzazione macroscopica M_0 ”.-

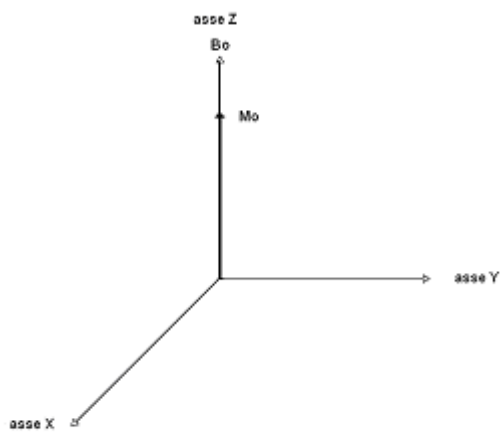




b



c



d

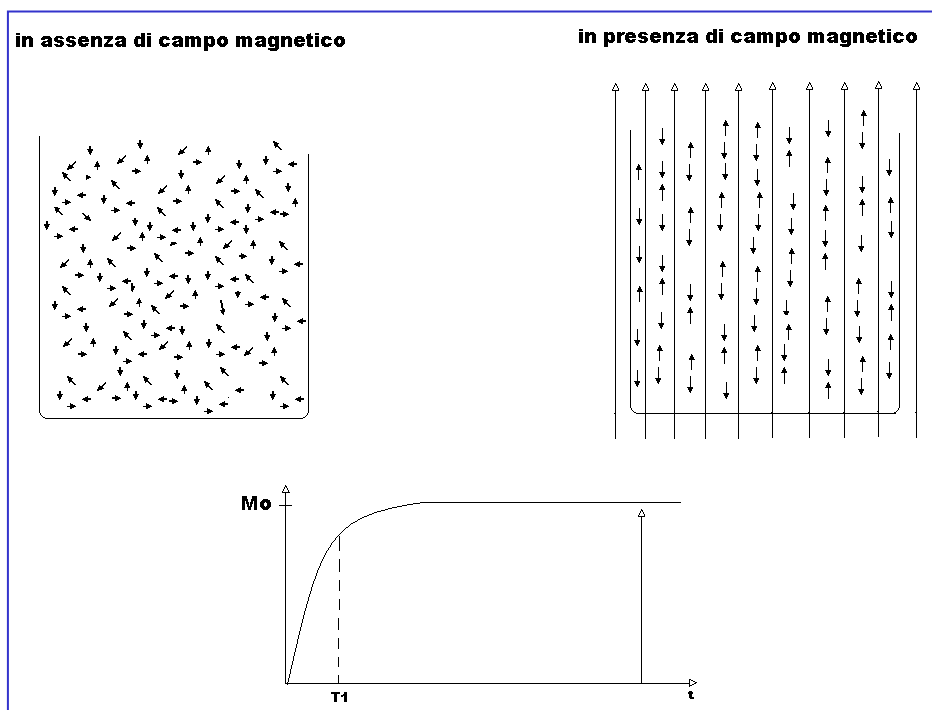
La Fig. 3 mostra che la polarizzazione di un campione raggiunge il suo valore di equilibrio esponenzialmente con un tempo costante, T_1 , chiamato tempo di

rilassamento termico. Questo tempo costante dipende essenzialmente da due fattori: a) la quantità di moto molecolare del campione che influenza il salto dei nuclei da uno stato all'altro. Questo è influenzato sia dalla temperatura che dalla viscosità; b) la forza dell'interazione tra i nuclei e la parte restante del campione. Poiché i nuclei sono inglobati in atomi essi sono protetti dalle collisioni dirette, e quindi possono cambiare di stato esclusivamente mediante l'interazione tra il proprio campo magnetico ed i campi magnetici fluttuanti dei loro vicini. Così T_1 dipende quindi sia dalla grandezza μ che dai momenti magnetici degli altri atomi delle molecole che costituiscono il campione. Esso è inoltre influenzato dallo schermo al quale l'atomo che si analizza è esposto, ovvero "schermato" dalla struttura della molecola che lo contiene.

$$2\mu B_0 = \gamma \frac{h}{2\pi} B_0$$

Le energie dei due stati che corrispondono all'orientazione parallela ed antiparallela dei due nuclei differiscono di $2\mu B_0$. In Fig. 4 sono mostrati i livelli

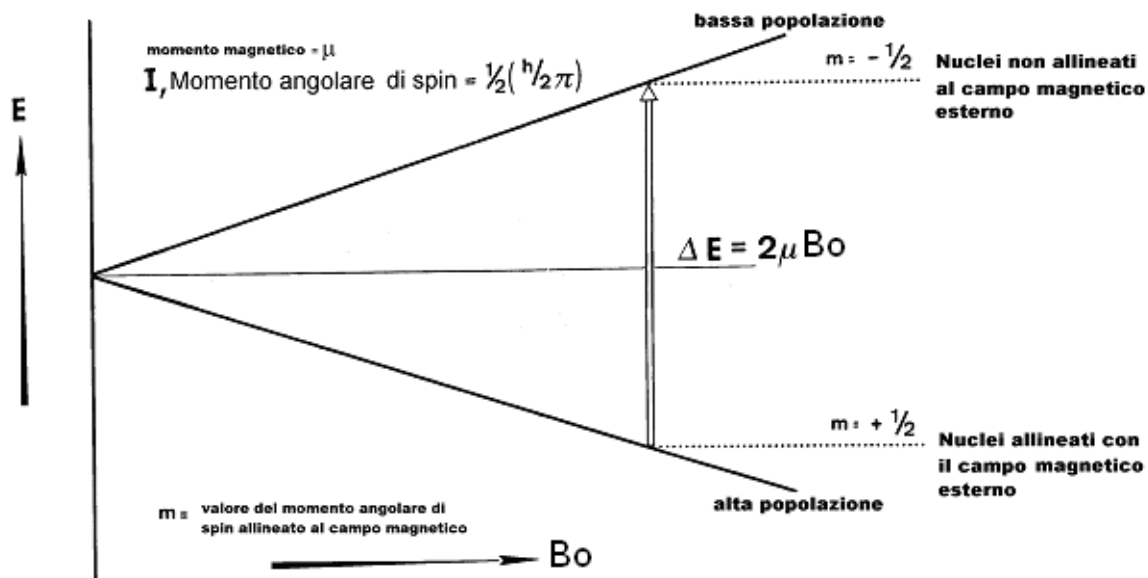
Figura 3



energetici dei due stati di spin per $I = 1/2$. Se si irradia con la opportuna radiazione elettromagnetica, l'eccesso di popolazione dei nuclei allineati secondo il campo

esterno, assorbirà energia e si disporrà in opposizione al campo. Tale energia può essere ceduta da un filamento a spirale che circonda il campione, ed attraverso il quale circola una corrente oscillante con la corretta frequenza.

Figura 4 – Livelli energetici di nuclei in un campo magnetico



Il campo magnetico oscillante, associato con questa corrente, esercita una forza sui nuclei che all'assorbimento di energia invertono lo spin.

La quantità di energia assorbita è misurata con un detector (rifornitore), che è sensibile a variazioni di potenziale ai capi della spirale.

Calcoliamo ora la frequenza alla quale il nucleo assorbe energia. Se la differenza di energia tra i due livelli è $\gamma \frac{h}{2\pi} B_0$ e l'energia della radiazione elettromagnetica è data da:

$$\Delta E = 2\mu B_0 = \gamma \frac{h}{2\pi} B_0$$

dalla legge di Plank si ha anche che: $\Delta E = h\nu$

Uguagliando i secondi membri
$$h\nu = \gamma \frac{h}{2\pi} B_0$$

da cui
$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0$$

la frequenza perciò è funzione sia del momento magnetico nucleare, sia dell'intensità del campo magnetico applicato. Nel caso del protone (^1H), quando $B_0 = 1,4\text{T}$ $\nu = 60\text{ MHz}$.

Qui di seguito vengono elencati i fattori che influenzano il rapporto segnale/disturbo (S/N) ed il modo per determinare la sensibilità di uno spettrometro.

In prima approssimazione, S/N è proporzionale alle seguente espressione:

$$n \cdot (\nu / T)^{3/2} \cdot (Q/B)^{1/2} \cdot dc \quad \text{dove (Equation3)}$$

n = numero di nuclei/cm³

ν = frequenza operativa

T = temperatura assoluta

Q = forma della spira

dc = diametro della spira (assumendo che il campione riempia la spira)

BB = ampiezza di banda del detector

ν è determinata dalla frequenza del campo magnetico dell'apparecchio e dal tipo di nucleo atomico sotto indagine. Q e dc sono determinati dal tipo di strumento utilizzato. Questo lascia all'operatore un certo controllo di soli tre fattori, e cioè: la temperatura e la concentrazione del campione, e il valore BB scelto per il detector.

Il campo magnetico intorno ad un nucleo non è esattamente uguale a quello fornito dal magnete; se così fosse, infatti, noi dovremmo registrare un solo picco di assorbimento da parte dei nuclei di una data specie chimica, senza alcuna influenza dell'intorno chimico.

In Fig. 5 è mostrato che un nucleo è sito all'interno di un guscio di elettroni orbitanti, particelle cariche negativamente, i quali possono essere impegnati in legami chimici nella molecola, e che il loro moto altera leggermente il campo magnetico e *scherma* il nucleo in una certa misura.

In una molecola complessa, o in un insieme di molecole noi possiamo perciò aspettarci di trovare un certo numero di picchi, se si variano il campo magnetico o la radio-frequenza. La costante nucleare di schermo δ è una quantità dimensionale che non è misurabile sperimentalmente. Essa è definita come:

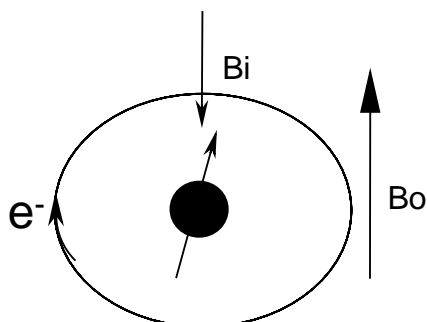
$$B_n = B_0 \cdot (1 - \delta)$$

Ove B_n rappresenta il reale valore del campo magnetico che agisce sul nucleo n . E' vantaggioso misurare la diversa capacità di schermo rispetto ad un nucleo di riferimento. Questo schermaggio relativo è chiamato *chemical shift*.

Poiché il chemical shift in Hz od in Gauss può avere valori diversi a seconda dell'apparecchio che si adopera (a 200 MHz il chemical shift è il doppio di quello misurato a 400 MHz) e quindi per evitare di tabulare valori diversi a seconda della forza del campo magnetico al quale lo strumento opera, il chemical

shift è indicato in δ , una quantità indipendente dal campo usato, allo stesso modo della costante di schermo:

Figura 5. Costante di schermo



$$\delta_i = \mathbf{B}_r - \mathbf{B}_i / \mathbf{B}_0 = \frac{V_r - V_i}{V_o}$$

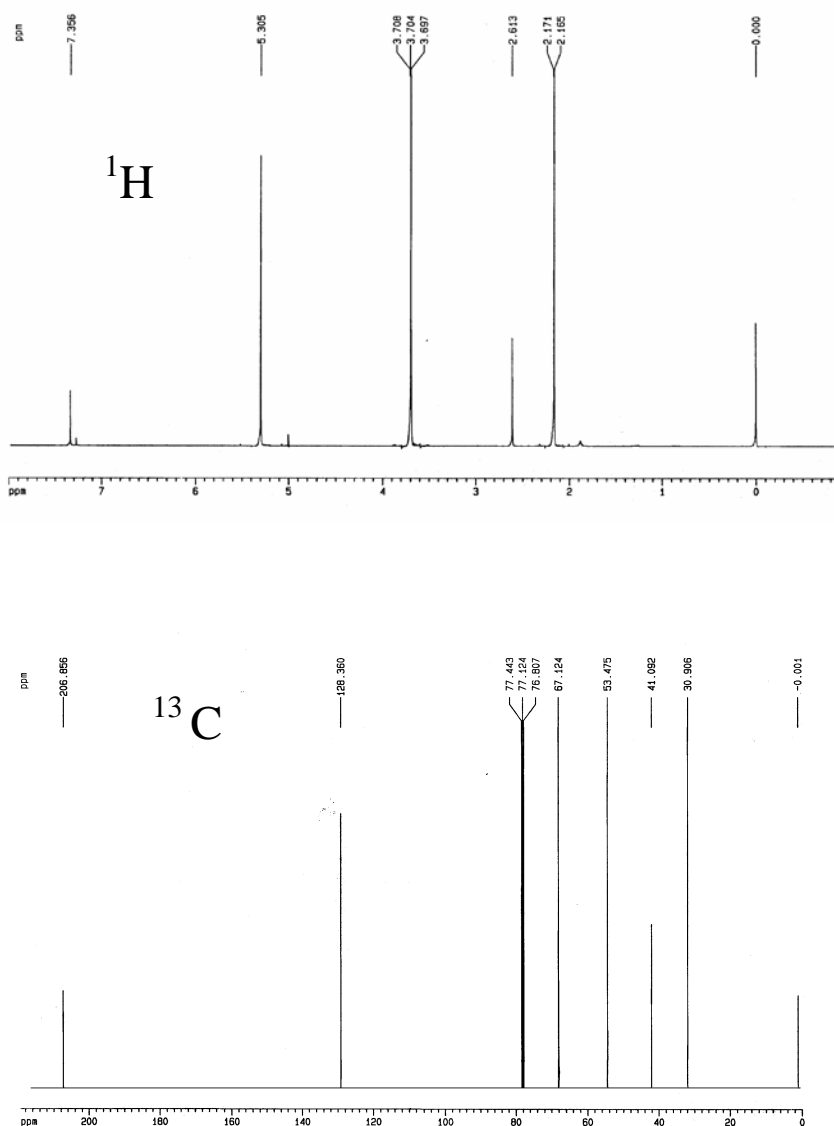
in cui \mathbf{B}_r e \mathbf{B}_i rappresentano i campi magnetici effettivamente operanti sul nucleo di riferimento e su quello del campione. Si è calcolato che δ varia in un campo di 0.001%. Poiché queste variazioni sono piuttosto piccole, normalmente esse vengono moltiplicate per 10^6 quando sono riportate e, perciò, esse rappresentano il chemical shift in *parti per milione* (ppm) del campo applicato. Per avere poi che i valori dello shift abbiano uguale significato per tutti gli studiosi, è necessario scegliere una frequenza di riferimento per le misure.

Dopo anni di controversie, i chimici hanno generalmente adottato la posizione dei protoni del tetrametilsilano (TMS) come valore 0.0 sulla scala del chemical shift indicando la posizione dei protoni a sinistra del TMS con valori positivi, e quella a destra con valori negativi, questo poichè la stragrande maggioranza dei composti sono posizionati a sinistra del TMS.

Le Tabelle 3 e 4 mostrano i chemical shift, protonici e del carbonio, di una serie di composti la cui simmetria rende tutti i protoni della molecola equivalenti, ottenendo così una sola linea per ogni composto. In Fig. 6 vi è lo spettro, ^{13}C e ^1H , di una autentica miscela di questo tipo. La scelta del TMS come riferimento è dovuta alle seguenti ragioni:

- è facile da ottenere a basso costo
- è chimicamente inerte
- è molto volatile, quindi facilmente rimovibile dal campione
- contiene 12 protoni equivalenti per ogni molecola, quindi provoca un segnale intenso a concentrazioni molto basse
- pochissimi picchi di risonanza sono vicino ad esso

Figura 6 Spettro di una miscela



Tutti gli spettri consistono di una serie di singoli segnali, uno per ogni sito o gruppo funzionale non equivalente chimicamente. Se gli effetti che danno origine al chemical shift sono i soli che fanno variare il campo magnetico attorno ad un nucleo, ciò sarà vero. Comunque vi sono interazioni tra gli stessi nuclei magnetici che debbono necessariamente essere tenuti in considerazione poiché esse forniscono un contributo considerevole nel determinare il valore del campo magnetico che agisce su un certo nucleo.

Tabella 3. Intervalli di chemical shift protonici per le principali classi di composti organici e gruppi funzionali.

Relativi al TMS	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0	-1
H ₃ C-Alchile													●	
H ₃ C-C-Alogeno												●		
H ₃ C-C=C												●		
H ₃ C-C≡C												●		
H ₃ C-Arile,-Eteroarile											●			
H ₃ C-CO											●	●		
H ₃ C-S-											●			
H ₃ C-SO ₂ -										●	●			
H ₃ C-N										●	●			
H ₃ C-O-Alchile										●				
H ₃ C-O-Arile, -O-CO-										●				
C-CH ₂ -Alchile												●		
Ciclopropano													●	●
C-CH ₂ -CO											●	●		
C-CH ₂ -O-									●	●				
C-CH ₂ -S										●				
C-CH ₂ -NO ₂									●					
C-CH ₂ -N										●	●			
C=C-CH ₂ -C=C											●			
N-CH ₂ -CO-									●	●	●			
-O-CH ₂ -CO-								●	●					
-O-CH ₂ -O-, -Arile								●	●					
Relativi al TMS	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0	-1
CH-Alchile												●		
CH-Alogeno								●	●					
C-CH-O-									●	●				
C-CH-N									●	●	●			
CO-CH-C=C									●	●				
CH-Arile,-NR ₂ ,-O-							●	●	●	●				
-C≡CH										●	●			
CH=C-						●	●	●	●					
Ar-H				●	●	●								
Alchile-, Arile-CHO			●	●										
Alchile-OH										●	●	●		
Arile-OH						●	●	●	●	●				
R-COOH	●	●	●	●										
Alchile-SH										●	●	●		
Arile-SH									●	●				
Alchile-NH ₂ , Alchile ₂ -NH											●	●		
Arile-NH ₂ , Arile ₂ -NH								●	●	●				
R-CO-NH-				●	●	●	●							
R-C=NR'-H-														
-CO-NH-CO			●	●										
Relativi al TMS	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0	-1

Tabella 4. Valori medi di chemical shift del ¹³C per le principali classi di composti organici e gruppi funzionali.

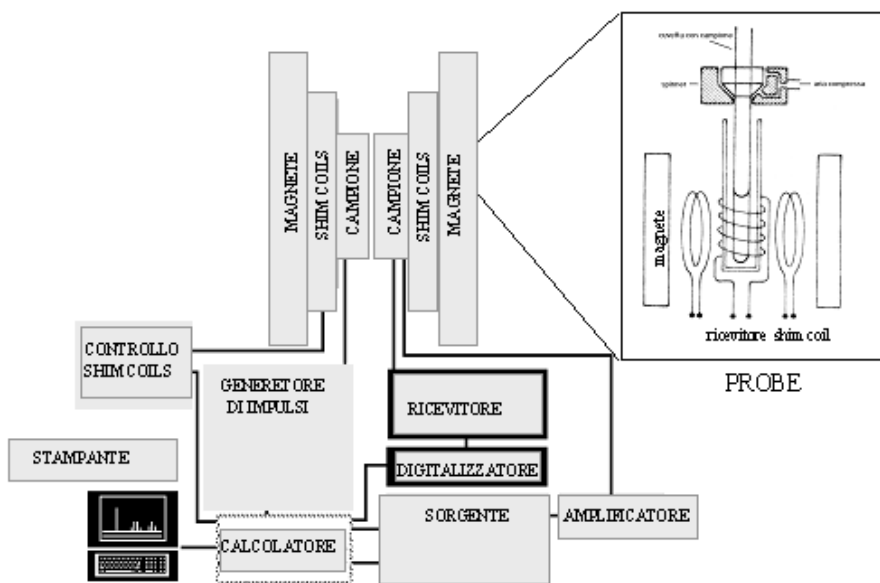
Relativi al TMS	220	200	180	160	140	120	100	80	60	40	20	0	-20
H ₃ C-C- primario										●	●		
H ₃ C-S-										●	●		
H ₃ C-N									●	●			
H ₃ C-O-									●				
-H ₂ C-C secondario									●	●			
Ciclopropani											●	●	
-H ₂ C-S-									●	●			
-H ₂ C-N									●				
-H ₂ C-O-								●	●				
-H ₂ C-Alogeno								●	●	●	●		
>CH-C- terziario									●	●			
>CH-S-								●	●				
>CH-N								●	●				
>CH-Alogeno							●	●	●	●			
C-C quaternario									●	●	●		
C-S-							●	●					
C-N								●	●				
>CH-O-; C-O-							●	●					
C-Alogeno								●	●	●			
Relativo al TMS	220	200	180	160	140	120	100	80	60	40	20	0	-20
Alchini							●	●					
C=C=C Alleni							●	●					
C=C Alcheni				●	●	●	●						
Composti Aromatici				●	●	●							
Composti Eteroaromatici				●	●	●							
-S-CN Tiocianati						●							
-N=C=S Isotiocianati					●								
-O-CN				●									
-N=C=O					●								
-CN					●	●							
-NC			●	●									
>C=N- Azometini			●	●									
(-CO) ₂ O Anidridi			●	●									
-COOR			●	●									
-CONHR			●	●									
-(CO) ₂ NR Immidi			●										
-COOH		●	●										
-COCl			●										
-CHO	●	●	●	●									
>C=O, >C=O coniugato	●	●	●										
Relativo al TMS	220	200	180	160	140	120	100	80	60	40	20	0	-20

6. Architettura di uno Spettrometro.-

Un moderno spettrometro è costituito da due parti principali: il magnete e la consolle (fig. 7). Il magnete superconduttore (fig. 8) è formato da due vasi di dewar concentrici, l'uno nell'altro, quello più interno contiene, immerso in elio

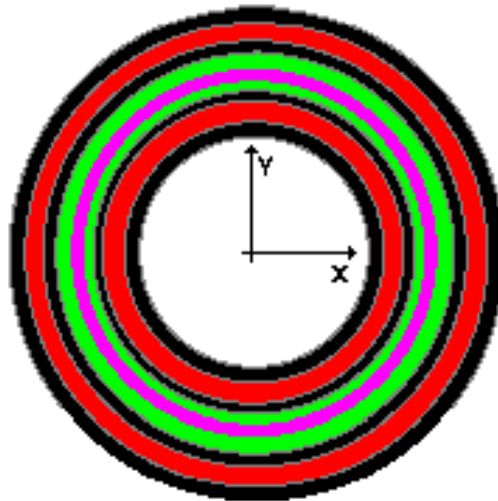
liquido (-269°C), il solenoide superconduttore che genera il campo magnetico, quello esterno contiene azoto liquido (-196°C) in modo da creare, con l'ausilio di una terza camera in cui è stato praticato vuoto spinto (10^{-7} mm/Hg), una barriera con l'esterno per ridurre al minimo l'evaporazione dell'elio liquido. Il dewar è collegato all'esterno con appositi condotti (fig. 9) provvisti di valvole di ritegno che consentono i rabbocchi dei gas liquidi.

Figura 7. Schema di un assemblaggio dei componenti di uno spettrometro.



La consolle rappresenta la zona gestionale dello strumento, essa contiene l'elettronica, la sorgente di radiofrequenza e l'impulsatore, il ricevitore di radiofrequenza e l'interfaccia che trasferisce i dati ad un computer che, attraverso un software adatto, li elabora.

Figura 8. Pianta del dewar di un superconduttore



- Vuoto**
- Elio Líquido**
- Azoto Líquido**
- Contenedor e supporto**
- Bobina superconduttore**

Figura 9. Spaccati di un superconduttore



Tab. 5. Caratteristiche del magnete della figura 8 acquistato dal CIMCF nel 1978

Caratteristiche	Oxford NMR instrument
Data di costruzione	Approssimativamente 1978-1979
Numero del progetto	Y24090
Numero di serie	90252
Campo magnetico	6.34 Tesla (63400 gauss) 270 MHz per l' ¹ H
Materiale superconduttore	Niobio-titanio
Diametro del foro del magnete	54 mm
Intensità di corrente	34.735 Ampere
Lunghezza del filo della bobina	19000 metri
Induttanza	70 Henry
Evaporazione dell'elio liquido	16 cc/ora (12 litri/mese)
Evaporazione dell'azoto liquido	150 cc/ora (25 litri/settimana)
Peso complessivo del magnete	190 Kg. circa
Shims del superconduttore	Z ₀ , Z ₁ , Z ₂ , X, Y, ZX, ZX, XY, X ₂ -Y ₂

7. Il Probe.-

E' una sonda in cui è posta la bobina di radiofrequenza, il sistema pneumatico di rotazione del campione, la resistenza elettrica ed il dewar. Questi ultimi permettono di effettuare misure a temperatura variabile (di norma da -70°C a 130°C). La radiazione di radiofrequenza (RF.), generata dal sintetizzatore dello strumento, viene inviata, attraverso un cavo con doppia schermatura, alla bobina che circonda il campione, (Fig. 12). Nella figura 12b) sono visibili i condensatori variabili che consentono di accordare la frequenza che irraggia i nuclei. Tale operazione deve essere effettuata all'inizio di ciascun esperimento per evitare sia cadute di potenza che la formazione di onde stazionarie nel sistema. Nella figura 10 è mostrato un Probe dell'ultima generazione, funzionante in vapori di elio liquido (-250°C) in grado di aumentare di circa 4 volte il rapporto S/N di un normale spettrometro

Figura 10. Un moderno probe

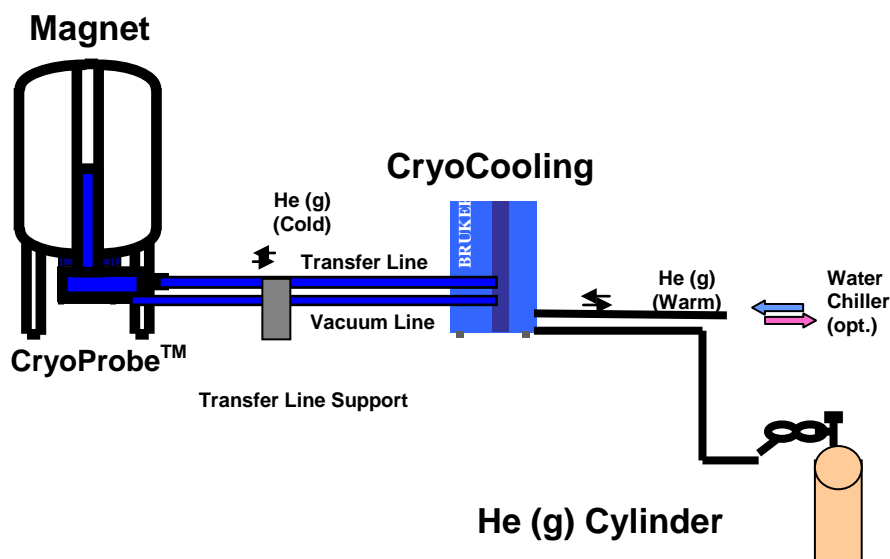


Figura 11. Schema di controllo di temperatura variabile

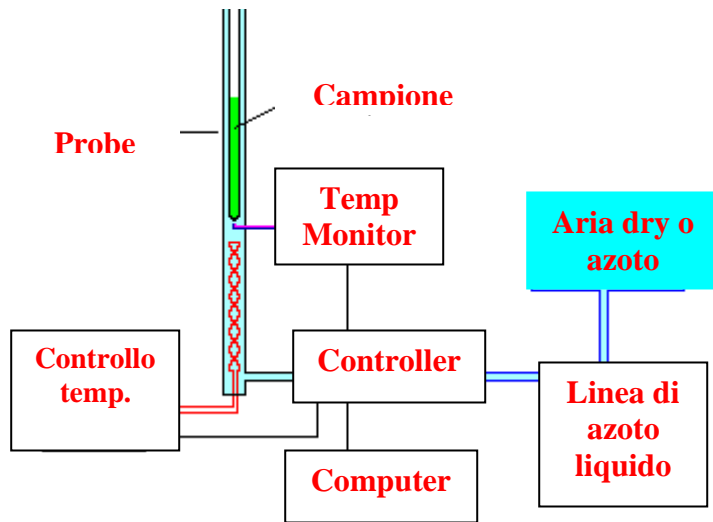
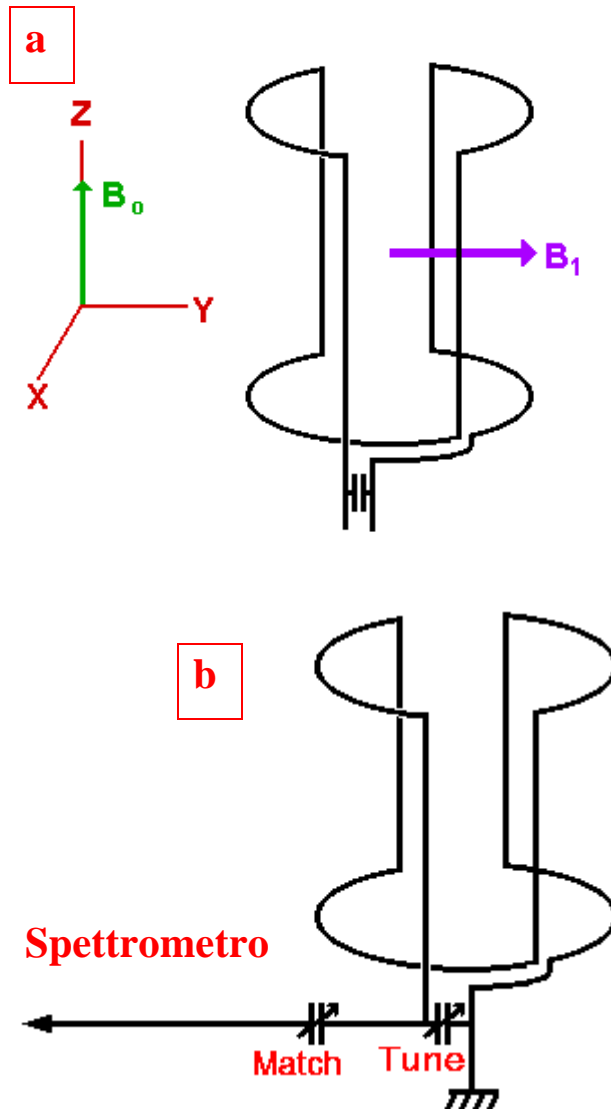


Figura 12. Bobine a sella rice-trasmittenti RF

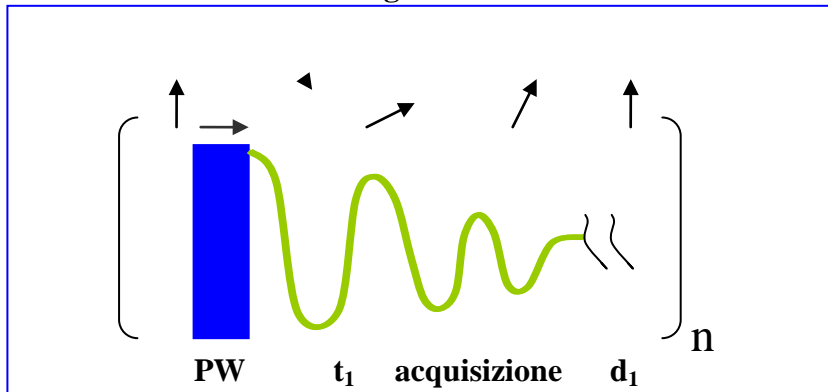


8. Spettroscopia NMR ad impulso.-

Per ottenere uno spettro esistono due tecniche fondamentalmente diverse: quella ad onda continua (CW) e quella impulsiva a trasformata di Fourier (FT). I dati spettroscopici che si ottengono da entrambe le tecniche sono assolutamente simili. Quella più largamente utilizzata è quella impulsiva che, come descritto in seguito, offrendo enormi vantaggi, rappresenta l'unica usata sia per l' ^1H che per i restanti nuclei, con spettrometri operanti da 90 a 900 MHz. L'osservazione ad onda continua è relazionabile, non tanto a quegli spettrometri i cui magneti operavano a campi compresi tra 5000 e 24000 Gauss, bensì al loro sistema di trasmissione di

radiofrequenza a bassa potenza e al modo di porre in risonanza una frequenza alla volta e registrare contemporaneamente su carta come un grafico di intensità su frequenze. Ciò comporta un enorme dispendio di tempo (circa 2' per spettro) e, data la scarsa riproducibilità dei segnali non è possibile né accumulare più scansioni né analizzare gli eventuali dati raccolti. Un moderno strumento impulsivo a trasformata di Fourier (PFT) consente di mettere contemporaneamente in risonanza tutte le frequenze di interesse con un impulso di radiofrequenza molto potente di quello ad onda continua (250 W circa, a seconda del tipo di nucleo in esame) e molto breve (μsec). Dopodiché resta da attendere (di solito pochi secondi) che l'eccesso di energia venga disperso dal sistema di spin attraverso processi di rilassamento, prima di un altro impulso a RF. E' possibile con tale tecnica accumulare molti transienti a beneficio della scarsa sensibilità della metodica e soprattutto di quei nuclei meno abbondanti. Qui di seguito si riporta uno schema per l'acquisizione di singoli transienti e immaginando di esaminare un solo nucleo o più nuclei equivalenti.

Figura 13



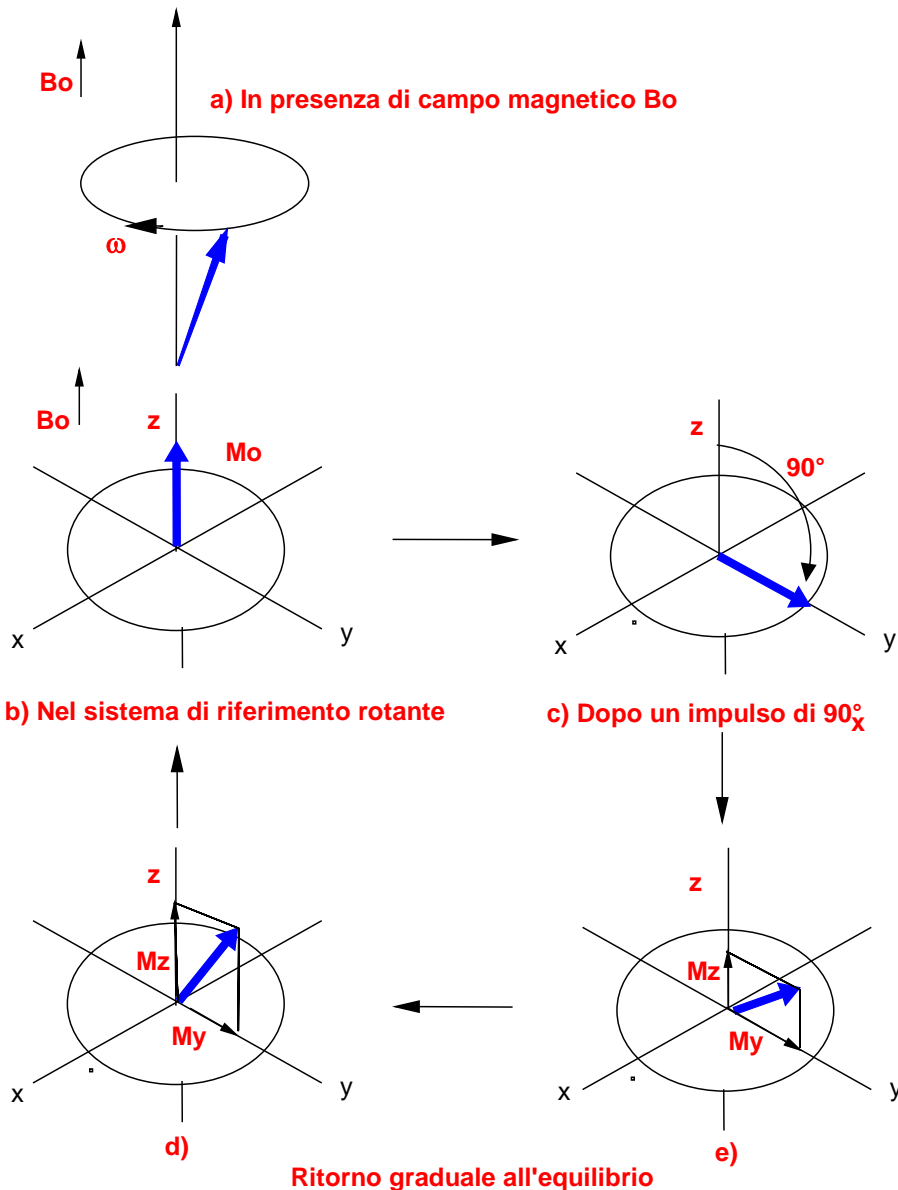
d_1 = tempo di pausa comprendente impulso e acquisizione (0,1-10 sec)

PW = tempo dell'impulso di RF (μsec)

t_1 = tempo di acquisizione nella memoria del computer (1-5 sec)

Nella figura 14 è rappresentato il vettore \mathbf{B}_0 che è riferito come la fig. 13 ad un solo nucleo o a più nuclei con uguale spostamento chimico. In condizione di equilibrio termico, il vettore \mathbf{B}_0 ruota, con moto detto di precessione intorno alla direzione del campo magnetico principale \mathbf{B}_0 , con velocità angolare che è data da $\omega = \gamma \mathbf{B}_0$. Per semplificare la rappresentazione sia grafica che matematica del comportamento del vettore magnetizzazione, si considera un sistema di assi cartesiani che ruota con lo stesso moto di precessione. Nella Figura 14b \mathbf{B}_0 coincide con l'asse \mathbf{Z} , ed è parallelo al campo magnetico applicato.

Figura 14. Vettore magnetizzazione di un singolo nucleo



Applichiamo una radiofrequenza, in risonanza con il nucleo in osservazione, in forma impulsiva, che faccia ruotare \mathbf{B}_0 intorno all'asse \mathbf{X} di 90° . Terminato l'impulso, il vettore è sul piano \mathbf{XY} e genera una risposta nelle bobine del ricevitore dello strumento. Poiché il campo \mathbf{B}_0 è sempre presente, il vettore tende a disporsi nella direzione dell'asse \mathbf{Z} per raggiungere di nuovo l'equilibrio. La sua componente \mathbf{B}_Y diminuisce, mentre la componente \mathbf{B}_Z aumenta fino a raggiungere la condizione di equilibrio.

Facendo riferimento alla tipica sequenza di impulsi di Figura 13 (PW,t₁,d₁) ed allo stato dopo l'impulso **PW**, la diminuzione della componente **My** viene osservata durante il tempo **t₁**.

Rilassamento, T₁, T₂ ed effetto NOE

Con la tecnica ad impulso si eccitano contemporaneamente un insieme di nuclei della stessa specie, ovvero caratterizzati dallo stesso γ . Accettiamo per il momento senza prove che l'eccitazione di un certo nucleo, ovvero il mutamento della distribuzione degli spin nucleari, sia rappresentabile mediante lo spostamento del vettore magnetizzazione **M** dalla sua condizione di equilibrio lungo l'asse **Z**. Questo moto implica l'esistenza di una componente vettoriale **M_{xy}**, rotante nel piano **xy**, e detta magnetizzazione *trasversale*. La presenza di questo vettore induce un segnale elettrico in una spira che è posta attorno al campione montata con il suo asse longitudinale nel piano **xy**. E' lo stesso fenomeno che si registra quando il piccolo magnete ruota all'interno di una spira ai cui capi è collegato un galvanometro. Questo voltaggio indotto, o meglio, il suo comportamento nel tempo è chiamato FID (Free Induction Decay) Il nome indica che il voltaggio del segnale decade col tempo, proprio come la componente trasversale **M_{xy}**, a motivo di un complesso processo che viene chiamato *rilassamento trasversale*, la cui durata è indicata con il simbolo **T₂**. Ovviamente, l'allontanamento di **M** dalla sua posizione di equilibrio lungo l'asse **z** crea oltre alla componente **M_{xy}**, *magnetizzazione trasversale*, una componente **M_z** lungo l'asse **z**.

M_z è nota come magnetizzazione *longitudinale* ed anch'essa decade nel tempo con complessi meccanismi. Il tempo impiegato dal **M_z** a ritornare al suo valore iniziale **M** è detto tempo di rilassamento longitudinale e indicato col simbolo **T₁**.

In parole povere, il rilassamento *trasversale* **M_{xy}** al suo valore d'equilibrio (**M_{xy}** = 0) è perciò riallineare **M_z** parallelamente a **z** nel tempo costante **T_z** laddove il rilassamento longitudinale porta **M_z** al suo valore di equilibrio **M** nel tempo costante **T₁**

La necessità di utilizzare indicazioni diverse per i tempi di rilassamento, risiede nel fatto che essi sono generalmente diversi a motivo dei differenti processi di rilassamento.

Visto l'andamento esponenziale dei rilassamenti è sufficiente campionare il FID utilmente per un tempo pari a 3 **T₂**; a questi tempi l'ampiezza del FID è minore del rumore di fondo dello strumento, mentre quale tempo di attesa per il ripristino dell'originaria popolazione degli spin nucleari, è necessario intervallare gli impulsi per un tempo pari a 5 **T₁**.

Uno spettro effettuato con la tecnica impulsiva (FT) è la sommatoria di un certo numero preimpostato di scansioni, ognuna ottenuta con una sequenza come quella descritta in figura 11. Dopo l'impulso **PW**, durante **t₁** e poi **d₁**, il vettore magnetizzazione di ciascun nucleo recupera lo stato iniziale di equilibrio, attraverso complessi processi di rilassamento, cedendo l'energia in eccesso

accumulata. Il completo riequilibrio è condizione necessaria per la continuazione dell'esperimento ed è detto "rilassamento".

Questi processi di rilassamento sono ascrivibili a due tipi: rilassamento spin-lattice e rilassamento spin-spin. Il primo descrive la perdita di energia dei nuclei nello stato eccitato di spin dovuta agli effetti dell'intorno molecolare del nucleo, detto appunto lattice. Questa perdita di energia di spin non dà luogo a radiazione di RF. Perché viene trasformata in energia termica con aumento dei moti molecolari (traslazioni o rotazioni).

Figura 15. Sequenza di impulsi per la misura di T_1

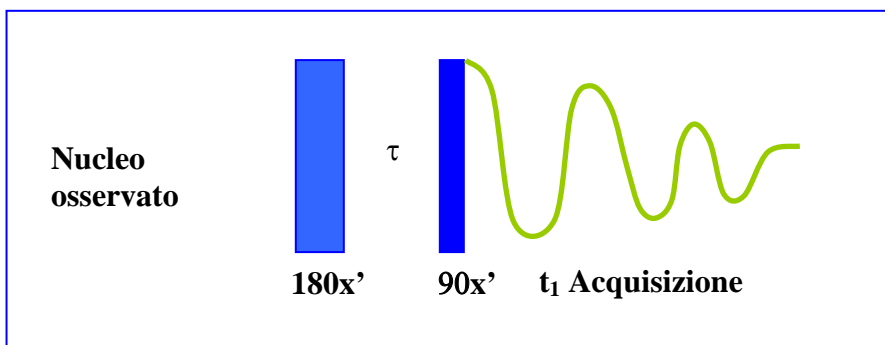


Fig. 16 Sequenza di impulsi per la misura di T_2

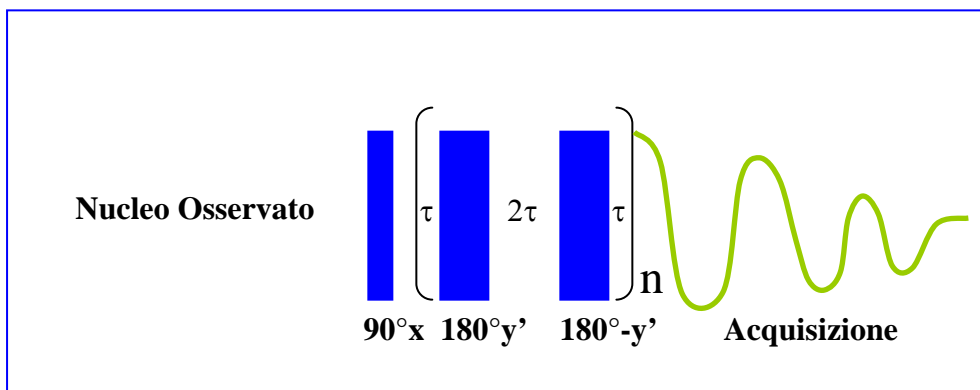
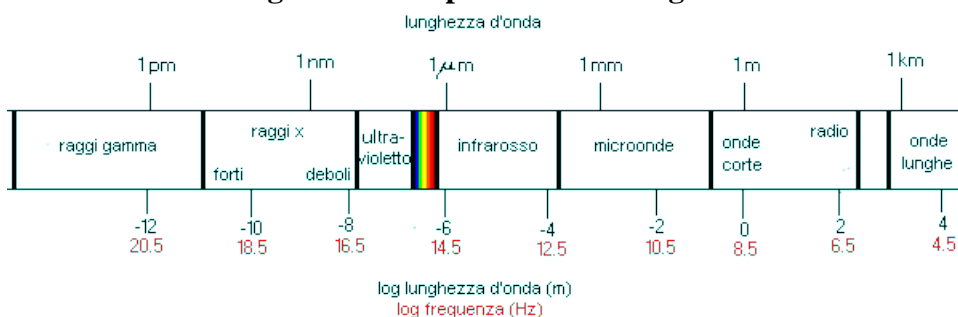


Figura 17. Lo spettro elettromagnetico.-



Le onde elettromagnetiche sono parte integrante dell'ambiente in cui viviamo. La luce visibile, i raggi X e i Raggi gamma ci giungono direttamente dal cosmo ad eccezione delle onde radio e quelle dei radar, per buona parte prodotte dall'uomo. Ciascuno di noi è costantemente avvolto in campi elettromagnetici ed il parametro con cui si valuta il rischio dell'esposizione è la frequenza, intesa naturalmente come energia. L'unità di misura delle onde elettromagnetiche è l'Hertz (Hz) che indica il numero delle oscillazioni al secondo. 1 KHz = 1000 oscillazioni al secondo, 1 MHz un milione di oscillazioni al secondo ed 1 GHz = un miliardo di oscillazioni al secondo.

Tabella 6. Molteplicità dei segnali ed intensità relativa dei picchi nell'accoppiamento spin-spin in funzione del numero di nuclei adiacenti e del loro numero quantico di spin.

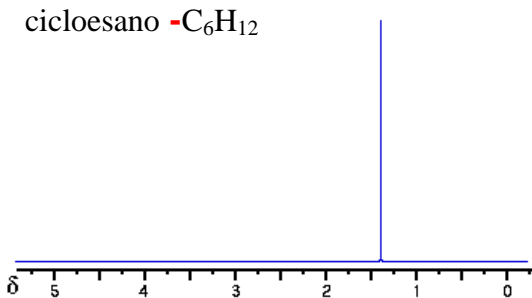
Numeri di nuclei vicini che si accoppiano con spin		Numero di righe (molteplicità del segnale)	Intensità relative ^a
I=1/2	I=1		
		1 (singoletto)	1
1		2 (doppietto)	1:1
2		3 (tripletto)	1:2:1
3		4 (quartetto)	1:3:3:1
4		5 (quintupletto)	1:4:6:4:1
5		6 (sestetto)	1:5:10:10:5:1
6		7 (settetto)	1:6:15:20:15:6:1
	0	1 (singoletto)	1
	1	3 (tripletto)	1:1:1
	2	5 (quintupletto)	1:2:3:2:1
	3	7 (settetto)	1:3:6:7:6:3:1

Alcuni esempi di molteplicità di segnali in sistemi di spin protonici esemplificativi sono mostrati in Tabella 6.

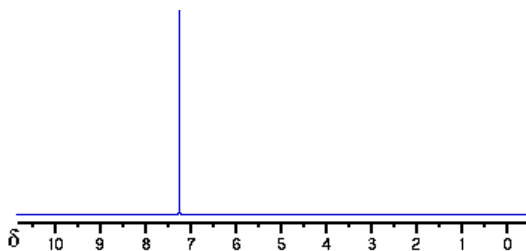
Tabella 7. Spettri ^1H e ^{13}C NMR di alcune molecole organiche disciolte in solventi deuterati

Molecola	Formula	Solvente	
cicloesano	C_6H_{12}	CDCl_3	1
benzene	C_6H_6	CDCl_3	2
toluene	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$	CDCl_3	3
Etil benzene	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_3$	CDCl_3	4
acetone	$\text{CH}_3(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$	CDCl_3	5
metil etil chetone	$\text{CH}_3(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$	CDCl_3	6
acqua	H_2O	D_2O	7
etanolo	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	CDCl_3	8
etanolo	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	D_2O	9
1-propanolo	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	CDCl_3	10
2-propanolo	$(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$	CDCl_3	11
t-butanolo	$(\text{CH}_3)_3\text{COH}$	CDCl_3	12
2-butanolo	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	CDCl_3	13
piridina	$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$	CDCl_3	14

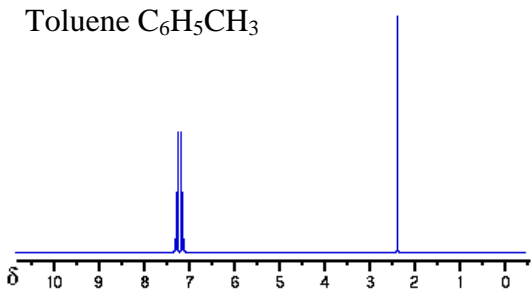
cicloesano - C_6H_{12}



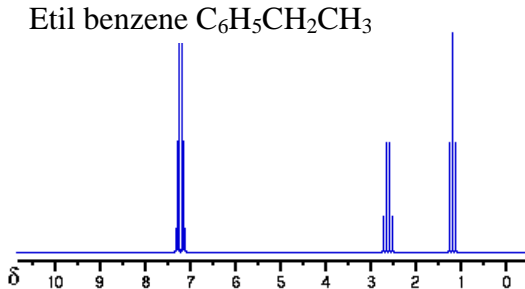
benzene C_6H_6



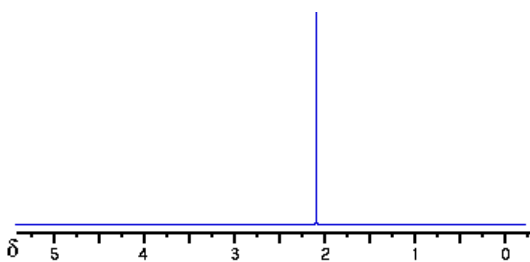
Toluene $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$



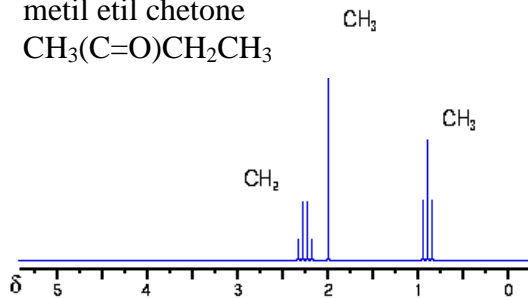
Etil benzene $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_3$



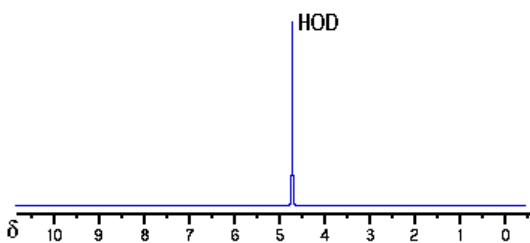
Acetone $\text{CH}_3(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$



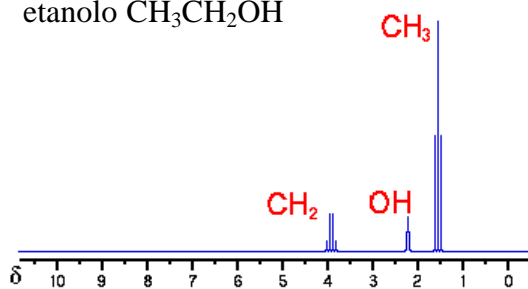
metil etil chetone
 $\text{CH}_3(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$



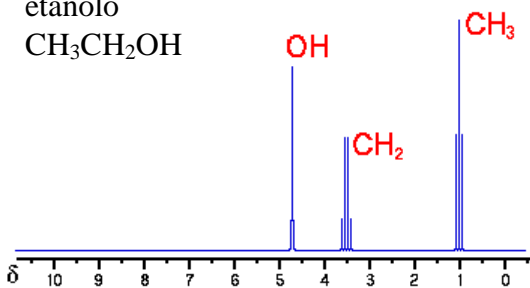
acqua H_2O



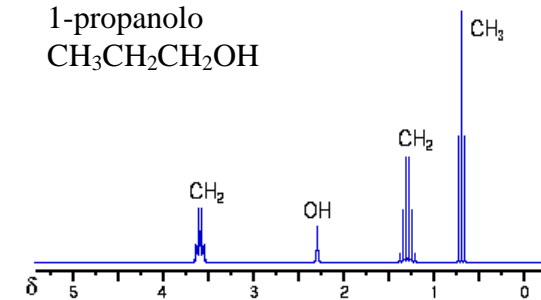
etanolo $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$



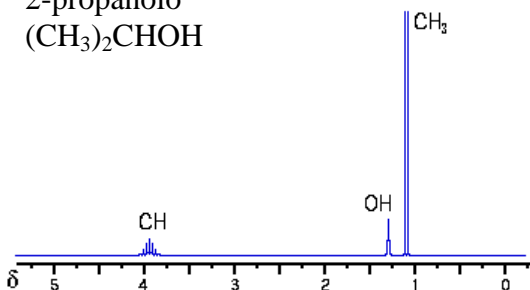
etanolo
 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$



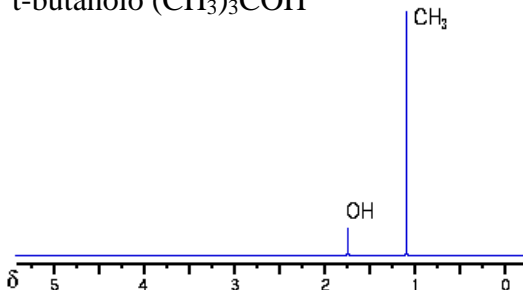
1-propanolo
 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$



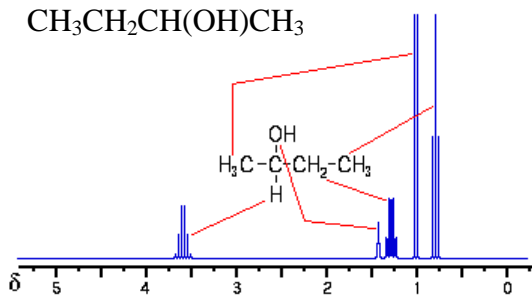
2-propanolo
 $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$



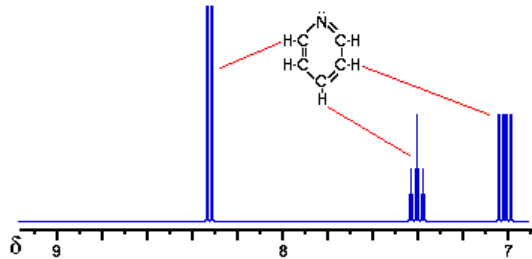
t-butanolo $(\text{CH}_3)_3\text{COH}$



2-butanolo
 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$

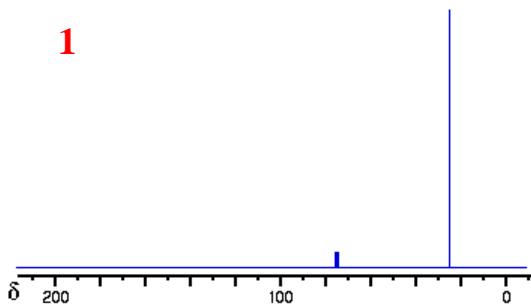


piridina $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$

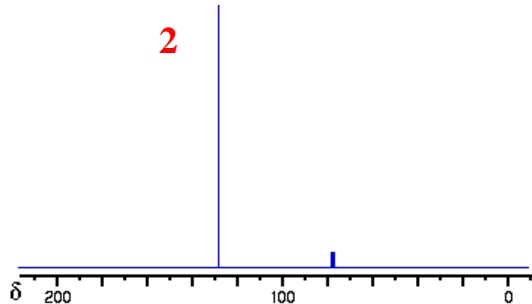


Spettri relativi al ^{13}C

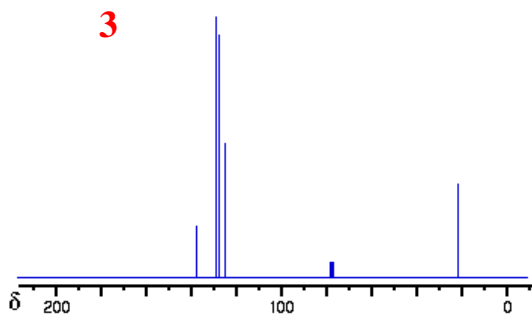
1



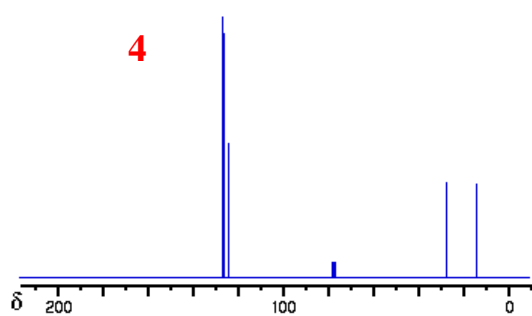
2



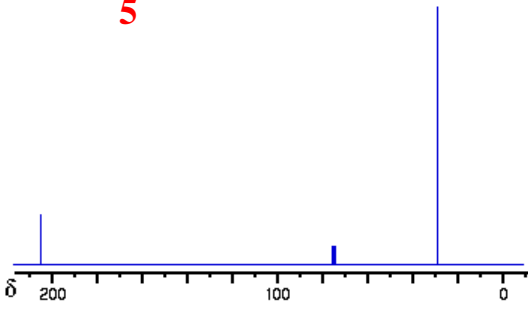
3



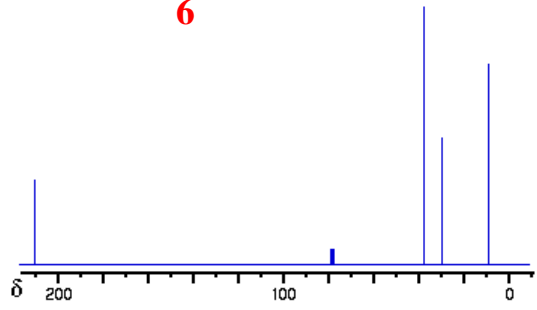
4



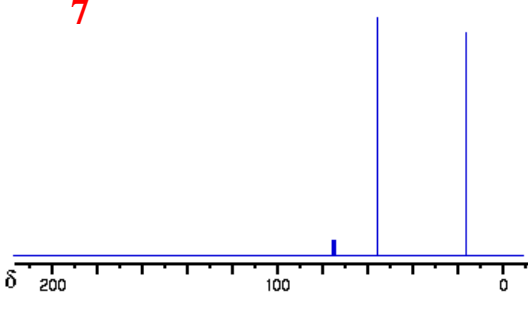
5



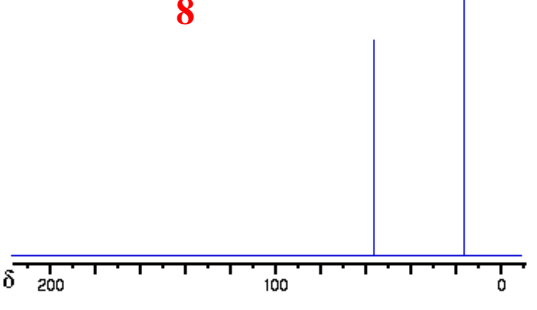
6



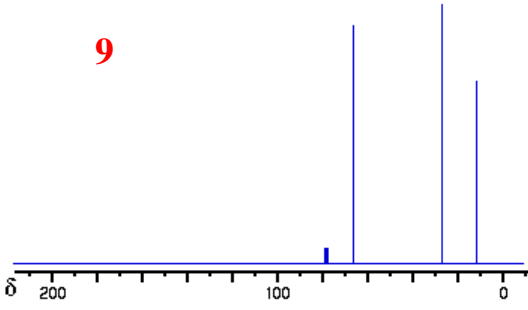
7



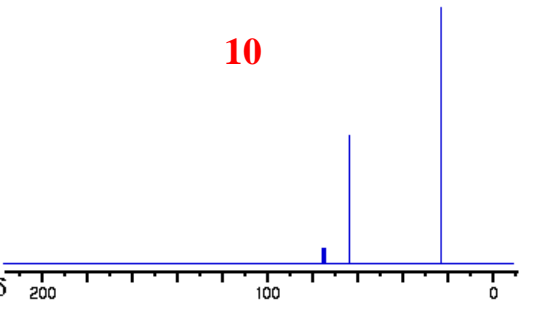
8



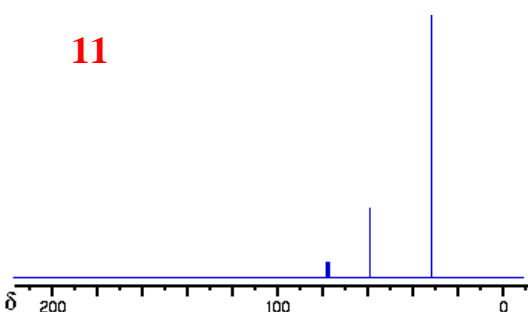
9



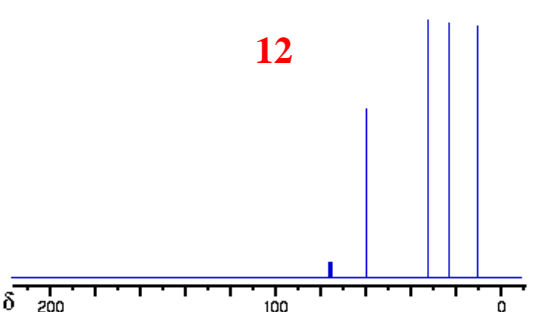
10



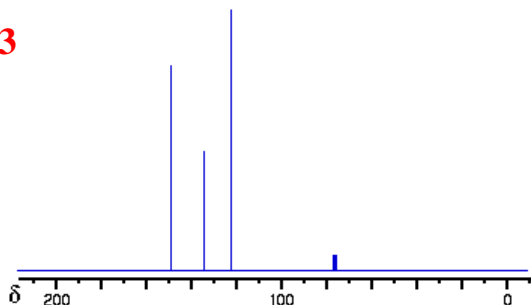
11



12



13



9. Frequenza di risonanza ed intensità di campo magnetico.-

Riferito ad un nucleo, sappiamo che il valore della velocità angolare ω_x è legato alla intensità di campo magnetico B_0 ed alla frequenza di risonanza di Larmor ν_x delle relazioni:

$$\omega_x(\text{rad/sec}) = 2\pi\nu_x = \gamma_x B_0$$

in cui B_0 è espresso in Gauss o in Tesla (Gauss = 10^{-4} Tesla) e la costante giromagnetica ν_x è espressa in (rad/sec. Gauss). Conoscendo la frequenza di Larmor ν_x per i nuclei ^1H e ^{13}C e le rispettive costanti giromagnetiche γ_x si può calcolare sia l'intensità di campo magnetico necessaria alla risonanza, e viceversa.

$$\nu_x = B_0 \gamma_x / 2\pi \quad \gamma_{\text{H}} = 26.75 \times 10^3 (\text{rad/sec.G})$$

$$\gamma_{\text{C}} = 6.73 \times 10^3 (\text{rad/sec.G})$$

Tabella 8. Campo magnetico e frequenze di lavoro ^1H e ^{13}C

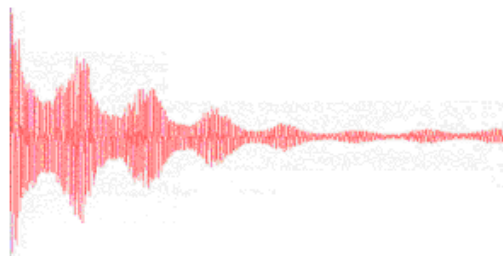
Intensità di Campo magnetico		ν_{H}	ν_{C}
Gauss	Tesla	MHz	MHz
14.1×10^3	1.41	60	15.1
47.0×10^3	4.70	200	50.3
93.9×10^3	9.39	400	100.6

Poichè nuclei diversi risuonano a frequenze diverse, significa che, come per i due nuclei ^1H e ^{13}C della tabella, anche altri atomi come il ^{31}P , ^{14}N , ^{19}F etc., risuoneranno a frequenze diverse. Ciò significa che il fascio d'onda radio che colpisce un atomo per ribaltarne di 90° , avrà sempre un valore di ν diverso a seconda del tipo di atomo. Ma anche atomi simili in ambienti diversi possono risuonare a frequenze diverse, come nel caso di un atomo di idrogeno legato ad un atomo di ossigeno ed un atomo di idrogeno legato ad un atomo di carbonio, fluoro o fosforo. Ma ciò accade anche quando gli atomi sono tutti simili in quanto subiscono l'azione degli elettroni che, essendo particelle cariche, creano uno schermo che si oppone al campo magnetico B_0 .

10. La Trasformata di Fourier di un segnale.

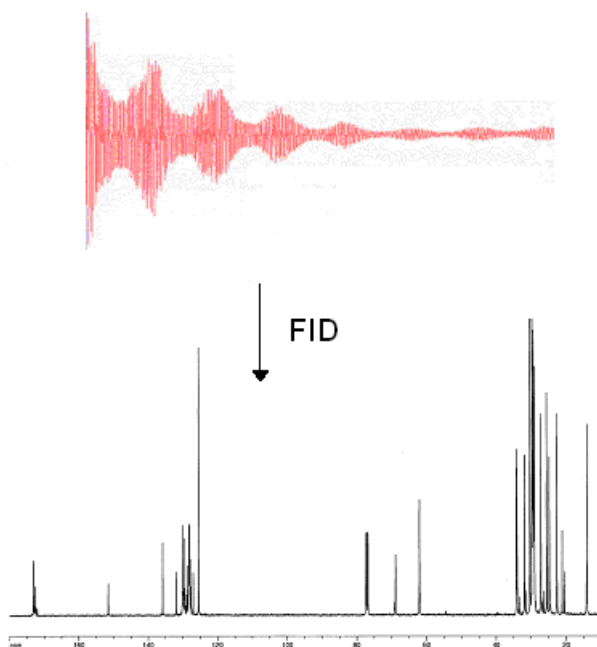
Il segnale che si osserva e che viene registrato nella memoria del computer dello strumento dopo ogni impulso si chiama FID, come precedentemente detto e mostrato in Figura 13, che per semplicità, mostra una sola linea di risonanza. Se si osservano più linee di risonanza nel FID vuol dire che esso è un interferogramma formato dall'involuppo di più sinusoidali, come mostra la Figura 18.

Figura 18. FID con più sinusoidi



Questi dati sono registrati come coppie di valori intensità/tempo: si dice che il FID esiste nel dominio dei tempi. Per passare ad una rappresentazione dei dati NMR più familiare, quella cioè di coppie di valori intensità/frequenza nel dominio delle frequenze, bisogna applicare ai dati contenuti nel FID l'operatore matematico di trasformata di Fourier, vedi fig. 19.

Figura 19 FID e spettro di un olio estratto da spigola



Si può affermare così che lo spettro NMR ed il FID sono in relazione tra loro attraverso la trasformazione di Fourier. L'applicazione pratica della tecnica FT è stata realizzata solo dotando gli spettrometri di computer dedicati, che potessero eseguire la trasformata a migliaia di punti (dati) in pochi minuti; pochi secondi con i moderni calcolatori. In un moderno strumento il computer controlla tutte le principali funzioni di acquisizione, trasformazione e trattamento dati, la durata e la fase degli impulsi, la stampa dei dati ed il disegno dello spettro finale. Alle caratteristiche del computer dedicato è legata la qualità di molte prestazioni di uno strumento: velocità, precisione, riproducibilità degli esperimenti, sensibilità, flessibilità nelle sequenze degli impulsi, etc. E' importante, quindi, conoscere in dettaglio gli aspetti numerici della spettroscopia FT-NMR per poter sfruttare le possibilità di questa tecnica e interpretare correttamente i limiti e gli eventuali errori di spettri ottenuti in FT. Nella figura 1 è riportato lo schema generale di uno spettrometro a trasformata di Fourier. Essendo il segnale NMR una variazione della corrente indotta nella bobina del ricevitore, quindi una grandezza analogica, essa deve essere trasformata in numeri, cioè in forma digitale. Questo lavoro è svolto dall'ADC (analog to digital converter) che rappresenta l'interfaccia tra il fenomeno fisico e la sua registrazione numerica.

Seguiamo ora passo dopo passo l'impulso che ha eccitato il nucleo sotto osservazione. L'ADC deve campionare un certo numero di volte il segnale elettrico generato nelle bobine del ricevitore durante la presenza del segnale, per definire la frequenza, l'intensità e la fase delle sinusoidali che compongono il FID. I dati numerici binari così ottenuti sono scritti in sequenza nelle *parole* della memoria di acquisizione del Computer. Nel tempo che il valore del segnale del FID decada a zero, l'ADC deve campionare un certo numero di volte per definirlo esattamente. Ciò dipende anche dall'ampiezza spettrale che si vuole osservare. Se la massima frequenza del nucleo in esame è N (chiamata anche frequenza di Niquist), l'ADC deve campionare il segnale $2 \times N$ volte, cioè due volte per ciclo, e cioè ogni $1/2N$ secondi:

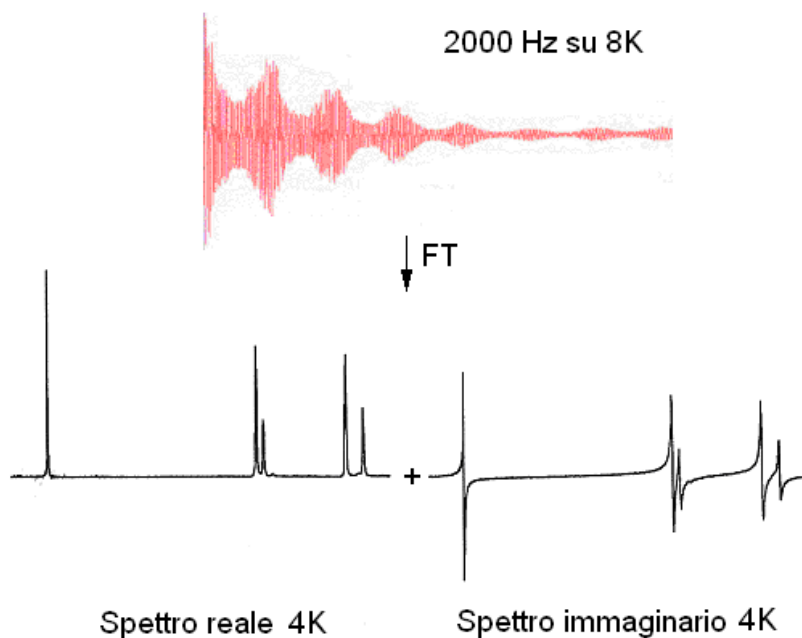
Campionatura (sec/punto) = $\frac{1}{2} \times N = 1/\text{veloc. di campionamento}$

Se si vuole, ad esempio, osservare al ^1H 2000 Hz (10 ppm a 200 MHz), l'ADC campiona 2×2000 volte il segnale, con una velocità di 4 KHz, cioè ogni 0.25 msec. La velocità di campionatura dell'ADC determina la massima larghezza spettrale osservabile su di un determinato strumento. Ad esempio, con una velocità massima di 9 KHz (0.1 msec/punto) si possono osservare solo 4500 Hz, che equivalgono su uno strumento a 80 MHz a circa 56 ppm per l'osservazione dell' ^1H e a 225 ppm per l'osservazione del ^{13}C (frequenza di osservazione: 20 MHz). Altro dato importante è la grandezza della memoria (espressa in numero di punti, parole o bytes) su cui i dati vengono registrati come numeri binari: dal numero di punti della memoria dipende la risoluzione digitale ottenibile nell'esperimento NMR ed il tempo speso a registrare i dati di un singolo transiente, il cosiddetto tempo di acquisizione A_t che nella sequenza di impulsi di figura 9 coincide con t_1 . La grandezza della memoria si esprime con potenza di 2, e si parla quindi di 1K (1024 bytes), 2K (2048), 4K (4096), 8K (8192), 16K

(16384) etc. Negli strumenti più grandi è normale avere a disposizione anche 64K di memoria per l'acquisizione di un FID, mentre negli strumenti più piccoli o meno recenti si possono trovare memorie di acquisizione di 4K e 8K. Se ad esempio disponiamo di 8192 punti di memoria (8K) e campioniamo ogni 0.25 msec, il tempo necessario per registrare un dato in ognuno degli 8192 punti sarà $8192 \times 0.25 \text{ msec.} = 2048 \text{ sec.}$ Se disponiamo di una memoria più grande, ad esempio 16K, il tempo di acquisizione sarà il doppio: $16384 \times 0.25 \text{ msec} = 4096 \text{ sec.}$ E' intuibile che se impieghiamo più tempo ad osservare un FID, dobbiamo riceverne anche come vantaggio una risoluzione digitale maggiore. La risoluzione digitale R_d è la massima risoluzione (in Hz) ottenibile sullo spettro dopo la trasformata di Fourier: la risoluzione reale dello spettro finale è di solito peggiore di quella digitale calcolata, perché entrano in gioco fattori di omogeneità, natura del campione e altri, che la diminuiscono. Se abbiamo registrato 2000 Hz in 8K, la risoluzione digitale sarà: $R_d = 2000 \text{ Hz}/8192 \text{ punti}/2 = 1/At = 0.488 \text{ Hz/punto}$

Gli 8192 punti della memoria sono stati divisi per due perché la trasformata di Fourier, trattando numeri complessi, dà come risultato sia lo spettro reale, quello che siamo abituati a vedere (in assorbimento), sia uno spettro immaginario in cui i picchi vengono rappresentati in maniera dispersiva (in dispersione)

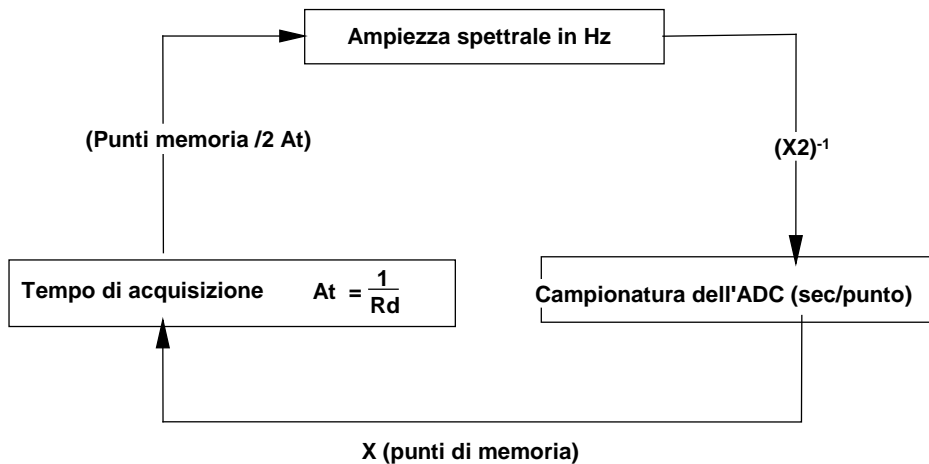
Figura 20 Spettro reale ed immaginario dopo FT



Risoluzione digitale dello spettro reale : $Rd \frac{2000Hz}{4096 \text{ punti}} = 0.488Hz / \text{ punto}$

Come si è visto, queste grandezze, ampiezza spettrale, campionatura, grandezza della memoria, risoluzione digitale, sono tutte interconnesse: variando una si variano anche tutte le altre, vedi figura 21.

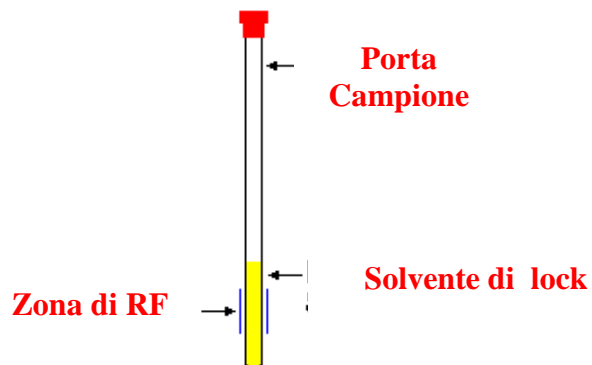
Figura 21. Schema di campionamento digitale



11. Esecuzione di uno spettro

Per poter eseguire un'analisi all' NMR è necessario sciogliere la sostanza in esame in un solvente deuterato, dopo di aver effettuato le opportune prove di solubilità. Il campione, di solito pochi milligrammi, a seconda dello spettrometro che si utilizza e del tipo di informazioni che si vuole ottenere, si scioglie in circa ml 0,5 di solvente. Le cuvette che si utilizzano sono normalmente da 5 mm esterno e possono essere di diverse qualità scelte in funzione del grado di accuratezza dell'esperimento.

Figura 22. Corvette



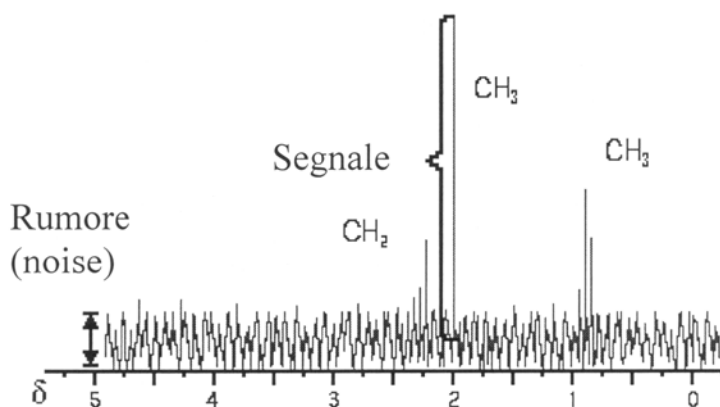
11.1 Rapporto segnale-rumore

Il maggiore vantaggio della tecnica FT è quello di ottenere spettri buoni anche da campioni fortemente diluiti e nella osservazione di nuclei poco abbondanti come il ^{13}C . Questo viene realizzato accumulando un certo numero di transienti, cioè ripetendo la sequenza di figura 10, finchè l'aspetto dello spettro non è soddisfacente cioè fino a che il rapporto S/N non è migliorato. Si può dimostrare che questo rapporto aumenta con la radice quadrata del numero dei transienti:

$$\frac{S}{N} = \frac{\text{segnale}}{\text{rumore}} = \text{cost} \sqrt{n}$$

Il rapporto segnale/rumore è intuitivamente l'altezza di un picco significativo dello spettro contro l'altezza del rumore di fondo; e viene citato spesso riferendosi ad uno spettro in particolare, o alle specifiche di uno strumento NMR per l'osservazione di un dato nucleo. Ciò permette di confrontare prestazioni di strumenti diversi, o probe diversi dello stesso strumento, o anche qualità di spettri dello stesso campione presi in condizioni sperimentali diversi. Il

Figura 23 Rapporto segnale/rumore



rapporto si calcola su di uno spettro disegnato; con un decimetro si misurano dalla linea di base media l'altezza del picco più alto e poi (amplificando il disegno dello spettro) l'ampiezza (picco/picco) del rumore su un campo più largo possibile. Quest'ultimo numero deve poi essere moltiplicato per 2,5 per trasformare l'ampiezza del rumore, letta una sola volta, nella deviazione standard della distribuzione delle ampiezze del rumore, in modo da simulare moltissime letture e rendere il dato statisticamente valido.

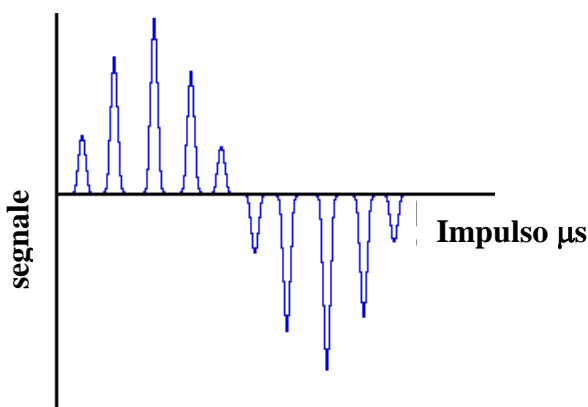
$$\frac{S}{N} = \frac{\text{picco}}{\text{rumore}} 2,5$$

11.2 Procedura per determinare l'impulso a 90°

Questa operazione semplice ma allo stesso tempo alquanto delicata, è necessaria per capire quale deve essere la durata dell'impulso per ottenere che il vettore magnetizzazione M_0 venga ribaltato, dalla sua posizione di equilibrio lungo xz sull'asse xy. In tali condizioni il nostro ipotetico ricevitore posto proprio lungo l'asse xy' riceverà il massimo segnale possibile.

La procedura (fig. 24), di determinazione dell'Impulso a 90° prevede l'esecuzione di una serie di spettri di una sostanza di riferimento, CHCl_3 , e la valutazione dell'intensità di un picco di riferimento.

Figura 24



Ad esempio si introduce un array di valori 5,10,15,20,25,30,35,40 e dopo trasformata di Fourier e lavorando in condizioni di AI (ovvero Absolute Intensity) si valuta l'andamento del segnale. Supponiamo di verificare che il segnale appaia più intenso ai valori 20 e 25 mentre a 15 e 30 ms appaia meno intenso: E' chiaro quindi che il massimo di intensità si troverà nell'intervallo 15 :- 30 ms .

Si ripete il procedimento utilizzando un array ad intervalli minimi ad esempio 15,17,19,21,23,25,27,30 e si valuta il valore a cui compare il segnale di intensità maggiore (ad esempio sia 21 μs). A questo punto si imposta un nuovo array, in un intervallo molto prossimo a 21 μs (a d es. 19,20,21,22,23,40,42, 44, 46) ed inserendo anche dei valori che dovrebbero corrispondere ad un PW pari 180°, a motivo che è molto più semplice valutare se un segnale non c'è nello spettro, rispetto a valutare tra segnali di intensità paragonabile quello più intenso. Pertanto ciò che si determina realmente è l'impulso a 180° che, diviso per 2 fornisce il valore di PW 90.

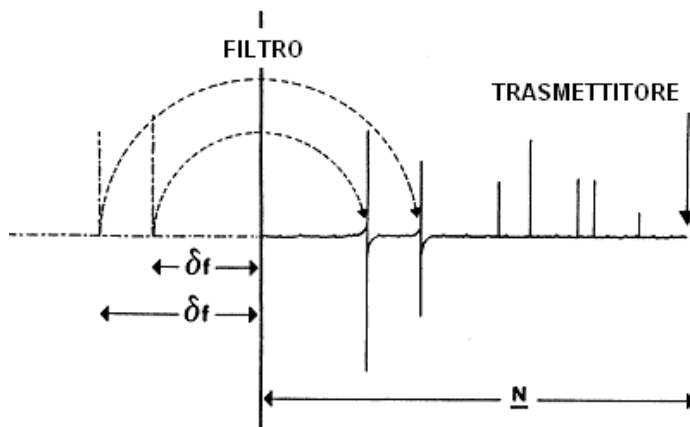
11.3 Larghezza spettrale e "folding".

Se si osserva in onda continua lo spettro di un composto con picchi compresi da 0.15 ppm, si può registrare ed osservare solo la zona tra 0 e 10 ppm, senza preoccuparsi dei picchi tra 10 e 15 ppm. Con uno strumento a trasformata di Fourier questo non è possibile perché i picchi fuori campo di frequente prescelto

sono comunque presenti nel campo osservato, sfasati però rispetto ai picchi reali. Questo perché l'impulso di RF eccita contemporaneamente tutte le frequenze fra 0 e la massima frequenza stabilita a causa del modo di digitizzazione delle frequenze; però una frequenza maggiore di n per la quantità δ_f ($v = \underline{N} + \delta_f$) sarà digitizzata anche come $v = \underline{N} + \delta_f$ e apparirà quindi nello spettro ripiegata attorno al valore massimo di frequenza \underline{N} .

Nella figura 25 è riportato un fold over in uno strumento a single side band, in cui il trasmettitore di radiofrequenza è posto all'estremità del campo da osservare.

Figura 25 Effetto Folding



Per ottenere uno spettro leggibile esente da picchi ripiegati bisogna tenere conto di tutto il campo delle frequenze possibili di quel dato composto e, di conseguenza, aggiustare l'ampiezza spettrale. Se uno spettro NMR registrato in onda continua contiene un picco molto più alto degli altri picchi presenti la registrazione può avvenire senza grandi problemi in quanto il picco troppo alto viene messo fuori scala ed il resto dello spettro amplificato a piacere. Ciò non causa né distorsione, né modifica il valore degli integrali dei picchi in scala. In FT NMR il problema è molto diverso perché se i valori del FID sono molto grandi per essere letti a causa di un segnale troppo intenso, questo influenzerà tutto lo spettro dato che ogni punto del FID contiene informazioni su tutte le frequenze dello spettro. Per capire come si può trattare questo problema, dobbiamo sapere come l'ADC trasforma i valori analogici della corrente in numeri digitali, e più precisamente quanti bit vengono usati dall'ADC. Per rappresentare questo voltaggio. Nei normali strumenti in FT, l'ADC ha a disposizione una parola di 12-16 bit: supponiamo ora che il segnale ricevuto sia sufficientemente alto da riempire quasi tutta la parola; in questo caso la grandezza massima leggibile del segnale (per una parola di 12 bit ad esempio) sarà $2^{11} - 1 = 2047$ (un bit della parola è riservato al segno \pm del numero) mentre la più piccola leggibile sarà uguale a 1. Questo rapporto, 2000:1, rappresenta il range dinamico di cui è capace un ADC a 12 bit. Notiamo che se esiste un valore massimo leggibile di circa 2000, il minimo valore non può essere più basso di 1, perché non importa quanti

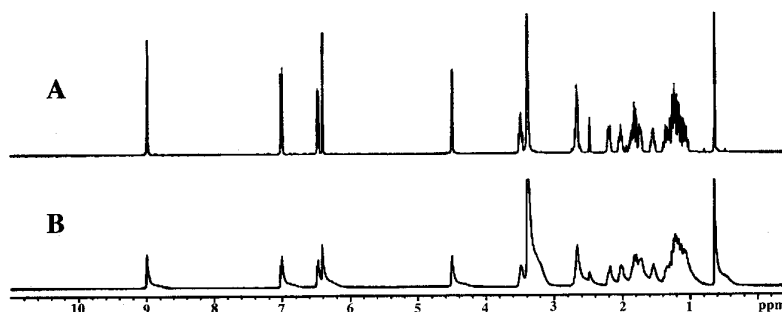
accumuli vengono fatti per quello spettro, un valore minore di 1 non sarà mai nemmeno digitizzato. Un ADC a 14 bit porta il range dinamico a $(2^{13}-1):1 = 8191:1$, con una notevole estensione della capacità di registrare segnali deboli in presenza di segnali molto grandi (si pensi a campioni biologici, spesso analizzati in H₂O) Se il voltaggio del ricevitore è troppo intenso per essere letto correttamente dall'ADC, si verificano le condizioni di "overflow" e il segnale così passato alla memoria del computer contiene delle distorsioni molto importanti su tutte le frequenze osservate e non solo per il picco che ha causato la lettura troppo alta: per evitare questo, si deve abbassare la sensibilità del ricevitore, o usare un impulso PW più breve, fino a che il voltaggio letto non saturi più i bit a disposizione dell'ADC.

Tabella 9 Proprietà chimico-fisiche e spettroscopiche dei principali solventi deuterati per NMR

Solvente	Peso Molecolare	D ₄ ²⁰ (g/mL)	Pf ^a	Pe ^a	δ _H (molt) ^b	δ _C (molt) ^b
Acido acetico-d ₄	64.078	1.12	17	118	11.53 (1) 2.03 (5)	178.4 (br)
Acetone-d ₆	64.117	0.87	-94	57	2.04 (5)	206.0 (13) 29.8 (7)
Acetonitrile-d ₃	44.071	0.84	-45	82	1.93 (5)	118.2 (br) 1.3 (7)
Benzene-d ₆	84.152	0.95	5	80	7.15 (br)	128.0 (3)
Tetracloruro di carbonio	153.81	1.59	-23	77		96.0 (1)
Cloroformio-d	120.384	1.50	-64	62	7.24 (1)	77.0 (3)
Cicloesano-d ₁₂	96.236	0.89	6	81	1.38 (br)	26.4 (5)
Ossido di deuterio	20.028	1.11	3.8	101.4	4.63 ^c , 4.67 (Na ₃ PO ₄)	
Diglime-d ₁₄	148.263	0.95	-68	162	3.49 (br) 3.40 (br) 3.22 (br)	70.7 (5) 70.0 (5) 57.7 (7)
Dimetilformamide-d ₇	80.138	1.04	-61	153	8.01 (br) 2.91 (5) 2.74 (5)	162.7 (3) 35.2 (7) 30.1 (7)
Dimetil-solfossido-d ₆	84.170	1.18	18	189	2.49 (5)	39.5 (7)
p-Diossano-d ₈	96.156	1.13	12	101	3.53 (m)	66.5 (5)
Alcol metilico-d ₄	36.067	0.89	-98	65	4.78 (1) 3.30 (5)	49.0 (7)
Cloruro di metilene -d ₂	86.945	1.35	-95	40	5.32 (3)	53.8 (5)
Nitrometano-d ₃	64.059	1.20	-29	101	4.33 (5)	62.8 (7)
Piridina-d ₅	84.133	1.05	-42	116	8.71 (br) 7.55 (br) 7.19 (br)	149.9 (3) 135.5 (3) 123.5 (3)
Tetraidrofurano-d ₈	80.157	0.99	-109	66	3.58 (br) 1.73 (br)	67.4 (5) 25.3 (br)
Toluene-d ₈	100.191	0.94	-95	111	7.09 (m) 7.00 (br) 6.98 (m) 2.09 (m)	137.5 (1) 128.9 (3) 128.0 (3) 125.2 (3) 20.4 (7)
Acido trifluoroacetico-d	115.030	1.50	-15	72	11.50 (1)	164.2 (4) 116.6 (4)

^a Punti di fusione ed ebollizione (°C) sono dei corrispondenti composti leggeri (ad esclusione dell'ossido di deuterio). ^b δ_H = chemical shift dei protoni residui; δ_C = ¹³C chemical shift (relativi al TMS). Molt = molteplicità del segnale (m = con struttura fine; br = senza struttura fine). ^c Il TMS è sostituito da (CH₃)₃Si(CH₂)₃SO₃Na (DSS), in quanto insolubile in acqua.

Figura 26. Spettro dell'estradiolo realizzato dopo l'ottimizzazione automatica delle shim (A) e prima della procedura (B).



12. Procedura di “shimming”

Il numero sempre crescente dei magneti di shim e la intrinseca difficoltà di una procedura tesa alla omogeneizzazione di un campo magnetico spesso di intensità superiore a 30.000 gauss (3T) fanno sì che il processo di shimming non possa basarsi su una scaletta di operazioni da eseguirsi meccanicamente magari da operatori inesperti senza pregiudicare concretamente la qualità degli spettri ottenibili. Pertanto ogni operatore sviluppa nel tempo una propria tecnica di shimming che non avrebbe senso riportare in forma più o meno riassunta in un testo di supporto alla formazione di operatori. Nonostante ciò sono individuabili e utilmente presentati alcuni elementi di base su cui si sviluppa qualsiasi operazione di shimming e che consistono nella continua verifica dell'effetto delle modifiche alle shim sull'aspetto dello spettro o sulle caratteristiche del segnale di lock.

Nel caso l'operatore segua un segnale NMR per la verifica della “bontà” dello shimming che sta eseguendo, il segnale da osservare può essere quello del deuterio del solvente deuterato (es. DMSO_{d5}) o di un altro nucleo attivo all'NMR che abbia un sufficiente rapporto S/N. Tale approccio è usato preferibilmente per gli aggiustamenti iniziali delle shim su campi magnetici mai raffinati o quando lo spettrometro non ha lock interno.

Seguire il processo di shimming attraverso il livello di lock è probabilmente il metodo più comune di aggiustamento della omogeneità. Il canale di lock non deve essere (neppure) parzialmente saturato con la radiofrequenza e la fase del segnale deve essere accuratamente aggiustata. E' necessario controllare la fase fino ad ottenere un massimo del segnale di lock, poiché una asimmetria del segnale può essere causata anche da un cattivo aggiustamento della fase e potrebbe essere erroneamente attribuito ad un cattivo posizionamento delle shim.

Altra difficoltà connessa all'utilizzo del segnale di lock quale indicatore della omogeneità di campo deriva dalle differenti sensibilità alle inomogeneità esibite dal nucleo generalmente utilizzato per il lock, ossia il deuterio, e dal

nucleo in esame per la realizzazione degli spettri. Ad esempio se il nucleo sotto osservazione è il protone allora la sensibilità del segnale di lock alle inomogeneità è 1/6 di quella del campione. A tutto ciò si aggiunge l'ulteriore complicazione derivante dal fatto che la risonanza del deuterio è più larga di quella del protone.

Come accennato alcune shim sono interattive quindi dopo aver ottimizzato la risposta (ad esempio del lock) variando una data shim è necessario adeguare le altre alla nuova condizione per la shim variata. Le interazioni tra le shim sono di due tipi, detti del primo e del secondo ordine. Le interazioni del I ordine presentano una reale minimizzazione della inomogeneità magnetica per iterata massimizzazione delle singole shim tra loro legate. Dopo che il set completo di shim è aggiustato, il "riaggiustamento" della prima shim del set porta ad un differente optimum. Successive interazioni portano a cambi sempre più piccoli sul riaggiustamento fino a quando nessun ulteriore variazione è osservata.

Un esempio di questa interazione del I ordine è quella tra Z1 e Z2. Se la Z1 è "corretta" fino ad un optimum di risposta, il successivo aggiustamento di Z2 determina per Z1 un nuovo optimum, che va ritrovato. Se il processo è ripetuto, l'ammontare dei cambi di Z1 e Z2 in ciascuna interazione decresce fino a che sono individuati i valori ottimali.

Le interazioni del II ordine presentano un'interdipendenza delle shim più complessa sono del tipo per cui successive ottimizzazioni alternate di shim non portano necessariamente alla migliore omogeneità. In genere l'interazione del II ordine consiste nel modificare una data shim e nel "riottimizzare" un intero set di shim. Se questo porta ad una migliore risposta allora si prosegue la variazione della prima shim nella direzione seguita e la procedura si ripete finché la risposta comincia a declinare. Se la risposta iniziale è peggiore, si tenta l'altra direzione.

Di seguito è riportata una procedura esemplificativa.

Primo passo: se lo spettrometro NMR è in uno stato di omogeneità sconosciuta oppure se è noto che possiede una scadente omogeneità, una semplice ottimizzazione di alcune shim è il primo passo nella sequenza di shimming; in alternativa si può richiamare da una memoria magnetica un set che precedentemente aveva dato buoni risultati. L'osservazione del segnale NMR è il metodo raccomandato per giudicare la risposta a questa operazione:

1. Far ruotare il campione (20-30 Hz) e aggiustare le Z1 e Z2 interattivamente per ottenere il segnale più alto possibile (processo del I ordine)
2. Fermare la rotazione e correggere X e Y per ottenere il segnale più alto (primo ordine)
3. Correggere X e ZX con lo stesso scopo (II ordine)
4. Correggere Y e ZY
5. Correggere XY e X2-Y2 (I ordine)

6. Se si osserva che notevoli variazioni di qualche shim portano un miglioramento della omogeneità allora le operazioni vanno ripetute dal punto 1)

Dopo la suddetta procedura lo strumento dovrebbe possibile “ottenere il lock”, e successivamente i due metodi descritti per valutare la omogeneità possono essere utilizzati nella seguente sequenza di operazioni.

12.1 Shim di spinning

La procedura di correzione delle shim di spinning dovrebbe essere condotta con il campione che ruota a più di 10 Hz. Bisogna fare attenzione ogni volta ad evitare vortici. Un vortice porta ad una ottimizzazione errata delle shim, e normalmente si ha che è Z2 la shim da modificare ulteriormente. Se si sta usando il segnale di lock per lo shimming, è necessario assicurarsi che il segnale di lock non sia parzialmente saturato dalla radiofrequenza e che la fase del lock sia corretta. La fase del lock va riesaminata ogni volta che si apporta una grossa variazione in una shim Z pari (Z2, Z4,...). Nell’aggiustare Z3, Z4, Z5 come descritto in seguito (stadi 2,3,4) è preferibile fare un grafico del livello di risposta. Se l’operatore procede abbastanza oltre la posizione di risposta massima dello shimming, allora il grafico rivela un’ampia curva. Il valore migliore per la shim può essere determinato anche variando lievemente la posizione del campione nello spinner. Con l’esperienza, la visualizzazione di tutta la procedura diventa un atto mentale automatico. Si è abbastanza sicuri che tutte le shim sono correttamente ottimizzate quando un’ampia curva regolare è ottenuta come risultato di questo processo.

1. Usare iterazioni del I ordine per ottimizzare Z1 e Z2
2. Usare iterazioni di set di shim (II ordine) Z3 . Nota la posizione e la risposta cambiare Z3 abbastanza da abbassare la risposta del 20-30%. Ripetere le operazioni del punto 1). Se la nuova posizione ha fornito una risposta migliore allora continuare nella stessa direzione. Se la nuova risposta è peggiore, tentare l’altra direzione di Z3.
3. Usare il processo del II ordine per ottimizzare Z4. Annotare la posizione di Z4 e la risposta. Cambiare Z4 abbastanza da abbassare la risposta del 30-40%. Ripetere lo stadio 1). Correggere Z3 per ottenere la risposta ottimale. Se Z3 cambia considerevolmente allora ripetere lo stadio 1). Se la risposta è peggiore allora tentare l’altra direzione.
4. Z5 è difficile da aggiustare per due ragioni. Primo, solo i probe con coil più lunghi forniscono significative variazioni di risposta con Z5 a causa della sua forte dipendenza dalla distanza. Secondo, nella sua correzione è più influenzata da Z1, Z2, Z3, Z4 che non da se stessa. La Z5 normalmente ha bisogno per essere aggiustato solo di un magnete con ampio “bore” e di tubicini ad ampio diametro. Per correggere Z5 annotare la sua posizione e la sua risposta. Cambiare Z5 abbastanza per abbassare la risposta del 30-50%. Ripetere lo stadio 1). Aggiustare Z3,

Z4 fino alla massima risposta e se variano di molto, ripetere 1) e ottimizzare Z3 e Z4. Se la nuova risposta,ottenuta dopo questa procedura, è migliore della prima, continuare nella stessa direzione.

12.2 Shim di non-spinning

Queste shim vanno corrette a campione fermo. Variare shim con componenti Z causa cambi nel set di shim di spinning. Se ognuna di queste shim cambia significativamente, allora la sequenza di spinning-shim va ripetuta dopo aver completato la sequenza non-spinning.

1. Variare X e Y interattivamente (processo del I ordine) per la massima risposta.
2. Variare ZX (II ordine). Annotare la posizione di ZX e la risposta. Cambiare ZX abbastanza da abbassare del 10%, la risposta e correggere X per la risposta massima. Se la nuova risposta è migliore continuare nella stessa direzione con ZX.
3. Ripetere lo stadio 2) usando per le Y e ZY.
4. Modificare XY usando il processo del I ordine per la massima risposta. Se XY o X2-Y2 cambiano significativamente allora ripetere gli stadi 2) e 3).
5. Usare il processo del II ordine per correggere Z2X. Annotare la posizione di Z2X e la risposta. Cambiare Z2X abbastanza da abbassare la risposta del 30%. Massimizzare la risposta con ZX e X. Se la nuova risposta è più grande di quella iniziale continuare con Z2X nella stessa direzione.
6. Ripetere lo stadio 5) usando Z2Y, ZY e Y.
7. Usare il processo del II ordine per aggiustare ZXY. Nota la posizione di ZXY e la risposta variare ZXY abbastanza da abbassare la risposta del 20%. Massimizzare la risposta con XY. Se la risposta è migliore continuare con ZXY nella stessa direzione.
8. Ripetere lo stadio 7) usando Z(X2-Y2) e X2-Y2.
9. Aggiustare X3 e X interattivamente per la massima risposta (I ordine).
10. Aggiustare Y3 e Y interattivamente.
11. Se i valori delle shim di non spinning sono cambiati significativamente, allora la sequenza per le shim di spinning va ripetuta. Se, dopo l'ottimizzazione, ci sono cambi significativi anche nel set di spinning ripetere anche il set di non spinning.
12. Dopo le sequenze di spinning e non spinning, lo strumento dovrebbe fornire per il protone valori molto inferiori a 0,5 Hz per la larghezza di riga, buona forma del segnale e spinning side bands (SSB) minime, di alcuni segnali di campioni di riferimento (generalmente ODCB).

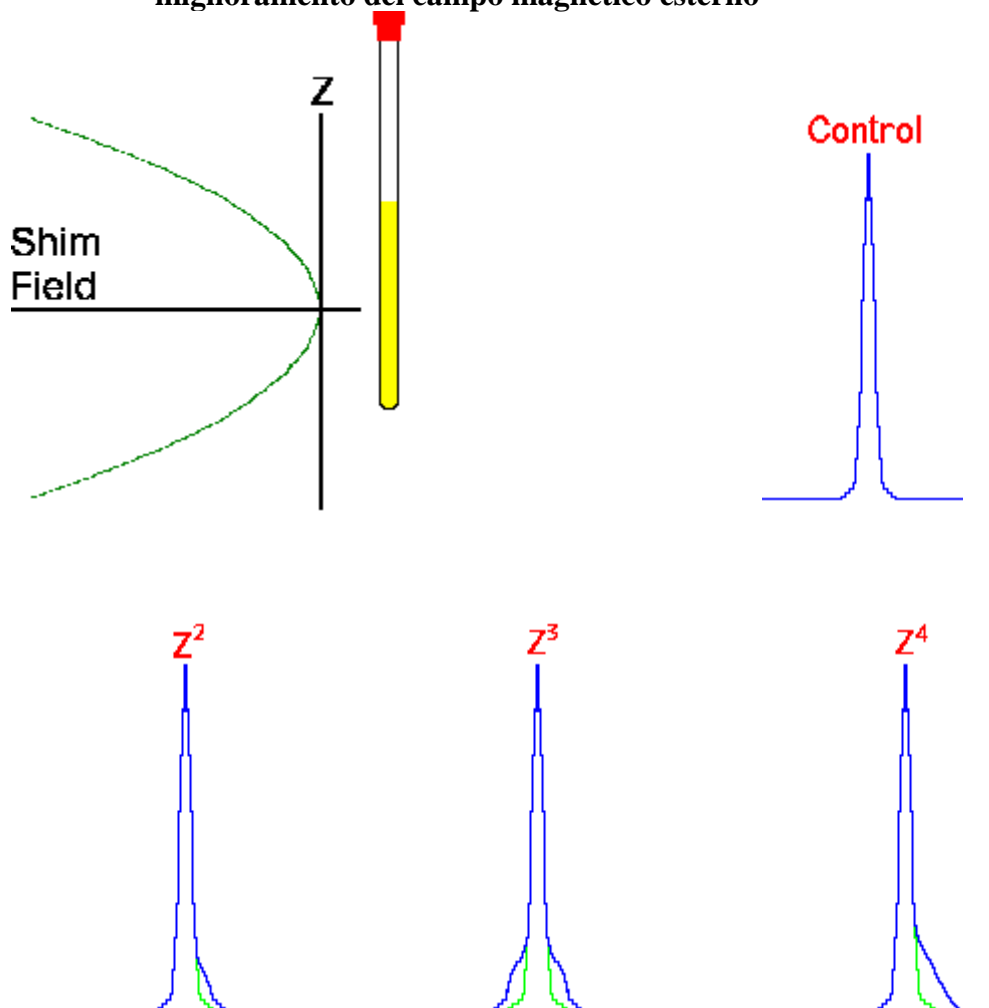
12.3 Shimming automatico

E' opportuno evidenziare, comunque, che negli spettrometri dell'ultima generazione, la procedura normale di shimming, come precedentemente descritta,

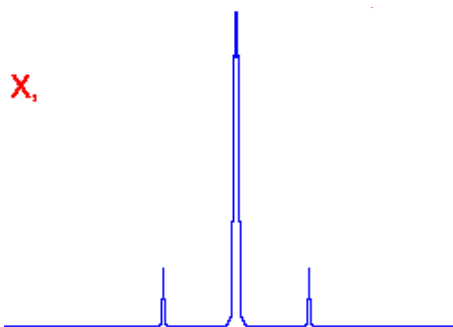
é affiancata da un'altra totalmente automatizzata. Una volta lanciato il programma di shimming automatico, compare sul monitor una curva che indica lo stato delle shim. Tale curva viene ottimizzata per successive iterazioni fino a raggiungere una variazione inferiore ad un valore prefissato.

Tuttavia, anche in strumenti meno recenti, erano inseriti programmi simili ma, avevano però la limitazione di modificare le shim solo in un range prossimo ai valori già impostati.

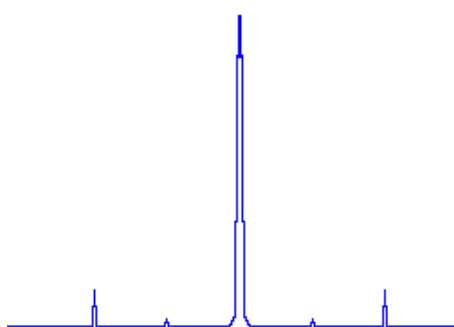
Figura 27. Grafici relativi alle più comuni variazioni delle shim per il miglioramento del campo magnetico esterno



SSB di primo ordine Y, ZX, ZY



SSB di secondo ordine XY, X^2-Y^2



13. Applicazioni della risonanza magnetica nucleare.-

13.1 Analisi degli alimenti

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) ha assunto una posizione di primo piano tra le metodiche strumentali impiegate nell'analisi e nella caratterizzazione degli alimenti. Oltre all'applicazione delle tecniche ^{13}C -NMR e ^1H -NMR a trasformata di Fourier ad alta risoluzione per l'analisi strutturale di componenti lipidici, di peptidi e proteine e di carboidrati direttamente in matrici alimentari complesse (oli, vino, miele, succhi di frutta, pane, formaggi), e alla determinazione dell'arricchimento isotopico naturale del deuterio (^2H -NMR) nei succhi di frutta e nelle bevande fermentate, riveste notevole interesse l'impiego di strumenti a basso campo per la misura di tempi di rilassamento nelle determinazioni quantitative di olio, grasso e acqua negli alimenti, nonché dello stato fisico dell'acqua ("libera" e "legata").

13.2 Analisi degli oli e dei grassi.

La spettroscopia del ^{13}C viene largamente applicata allo studio degli acidi grassi e dei trigliceridi. Essa è inoltre utilizzata nell'analisi della qualità degli oli di oliva ed è in via di sperimentazione nell'analisi di altri grassi alimentari quali il burro e lo strutto. Nelle Figure 1 e 2 (con relative Tabelle) sono riportati gli spettri ^1H e ^{13}C NMR di un olio vergine di oliva con le assegnazioni delle risonanze più significative. Dallo spettro ^{13}C -NMR, ottenuto sul campione tal quale in cloroformio deuterato è possibile ottenere simultaneamente una serie di informazioni sulla natura dell'olio. In particolare, dalla misura delle intensità delle risonanze si può ricavare il rapporto tra catene alifatiche sature, monoinsature e poliinsature, il rapporto tra acidi grassi *cis* e *trans*, la quantità (espressa in frazioni molari) di trigliceridi, monogliceridi e digliceridi, il rapporto 1,2/1,3 digliceridi ed il rapporto tra acidi grassi liberi ed esterificati. Il rapporto tra acidi grassi mono e poliinsaturi (oleico/linoleico) consente di discriminare gli oli di oliva dagli oli di semi ad alto contenuto di grassi poliinsaturi. Anche la presenza di grassi rettificati ad alta temperatura o neutralizzati può essere individuata rilevando le risonanze degli acidi grassi *trans* ed una elevata quota di gliceridi parziali rispetto all'acidità del grasso.

Figura 28 Spettro $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) di un olio vergine di oliva. I segnali indicati sono assegnati in Tabella 10.

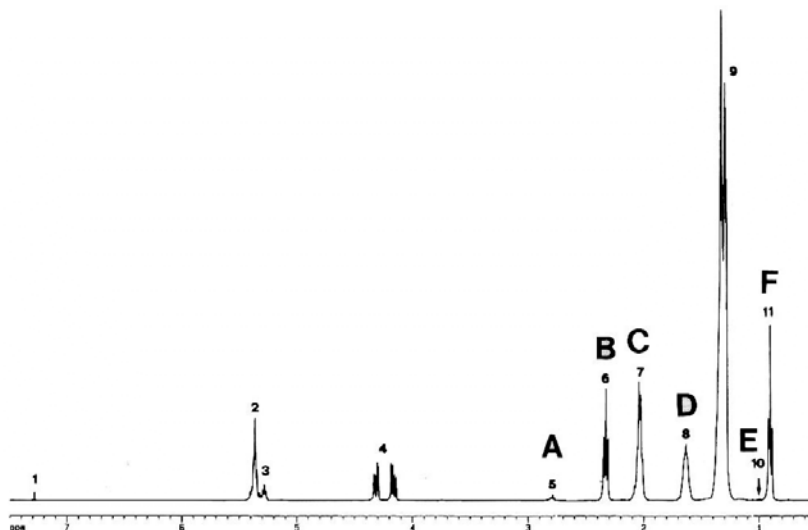


Tabella 10. Chemical shift (δ) e assegnazione della principali risonanze nello spettro $^1\text{H-NMR}$ dell'olio vergine di oliva in Figura 28.

Picco	δ (ppm)	Protone	Composto
1	7.26	CHCl_3	cloroformio (solv.)
2	5.29	$\text{CH}=\text{CH}$	tutti gli acidi insaturi
3	5.15	CH-O-CO-R	glicerolo (triacilgliceroli)
4	4.19	$\text{CH}_2\text{-O-CO-R}$	glicerolo (triacilgliceroli)
5 (A)	2.76	$\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}$	linoleil e linolenil
6 (B)	2.2	$\text{CH}_2\text{-COOH}$	tutte le catene aciliche
7 (C)	2.02	$\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}$	tutti gli acidi insaturi
8 (D)	1.6	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	tutte le catene aciliche
9	1.2	$(\text{CH}_2)_n$	tutte le catene aciliche
10 (E)	0.95	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$	pinolenil
11 (F)	0.85	$\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{-CH}_3$	tutte le catene aciliche tranne linolenil

Figura 29. Tipico spettro ^{13}C -NMR di un olio extra-vergine di oliva. Le risonanze indicate sono assegnate in Tabella 11.

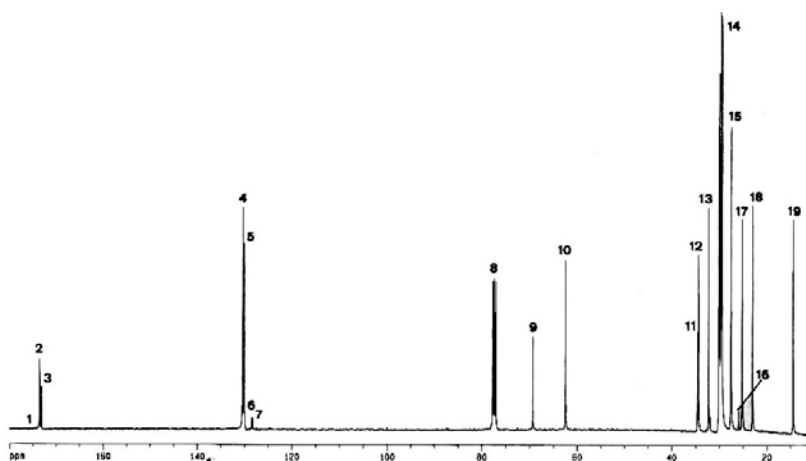


Tabella 11 Chemical shift e assegnazione delle principali risonanze nello spettro ^{13}C -NMR di un olio vergine di oliva (Figura 29).

Picco	δ (ppm)	Carbonio	Composto
1	174-176	C1	acidi grassi liberi
2	173.26	C1, <i>sn</i> -1,3	triacilgliceroli
3	172.81	C1, <i>sn</i> -2	triacilgliceroli
4	129.98	C10	oleil
5	129.67	C9	oleil
6	128.06	C10	linoleil
7	127.86	C12	linoleil
8	77.01	CDCl_3	(solvente)
9	68.92	CH-O-, <i>sn</i> -2	triacilgliceroli
10	62.18	CH ₂ -O-, <i>sn</i> -1,3	triacilgliceroli
11	34.18	C2, <i>sn</i> -2	tutte le catene aciliche
12	34.02	C2, <i>sn</i> -1,3	tutte le catene aciliche
13	31.88	ω 3	acidi saturi
14	29.1-29.8	(CH ₂) _n	tutte le catene aciliche
15	27.16	allilico: C8-C11 oleil, C8-C14 linoleil	
16	25.81	dialilico: C11 linoleil, C11-C14 linolenil	
17	24.84	C3	tutte le catene aciliche
18	22.65	ω 2	tutte le catene aciliche
19	14.15	ω 1 (-CH ₃)	tutte le catene aciliche

13.3 Analisi ^2H -NMR delle bevande fermentate

Il metodo NMR proposto da Martin *et al.* per la ricerca dello zuccheraggio e per l'individuazione dell'origine geografica dei vini è ormai accettato tra le metodiche ufficiali a livello europeo. Il metodo si basa sulla determinazione NMR del deuterio sulle varie posizioni dell'alcool etilico. Infatti il deuterio sostituisce l'idrogeno (arricchimento isotopico naturale) in uno dei tre siti molecolari possibili: $\text{CH}_2\text{D}-\text{CH}_2-\text{OH}$ (sito I), $\text{CH}_3-\text{CHD}-\text{OH}$ (sito II), $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{OD}$ (sito III). La quantità relativa di deuterio presente nel sito I (espressa come rapporto isotopico D/H) è caratteristica della specie vegetale, ed il suo dosaggio permette di individuare aggiunte di zucchero o alcol di origine diversa (canna, mais, barbabietola, ecc.). L'arricchimento isotopico del sito II è apparso invece maggiormente correlato ai fattori climatici e pedologici, ed è legato probabilmente alla disponibilità di acqua nel corso della biosintesi degli zuccheri.

La determinazione NMR del deuterio presente nei siti I e II e del rapporto R tra i due valori (D/H) I e (D/H) II permette di evidenziare:

- a) zuccheri di natura diversa;
- b) annacquamento;
- c) presenza di uve o mosti di diversa origine geografica (a tal fine è tuttavia necessario riferire i dati a quelli ottenuti su di un campione testimone della stessa annata e di sicura provenienza)

L'analisi D-NMR dell'arricchimento isotopico naturale è stata applicata anche ad altre bevande fermentate e ai distillati alcolici, nonché all'autenticazione dei succhi d'arancia e di frutta.

13.4 Tomografia a risonanza di spin nucleare.-

Questa metodica di esame, moderna ed assolutamente indolore, offre al campo medico vantaggi enormi a beneficio dei pazienti. Essa produce immagini, in sezione dell'interno del corpo, nitide e chiare, che consentono di trarre importanti indicazioni diagnostiche. Le parti molli in particolare vengono riprodotte con tale ricchezza di contrasto da risultare visibili con una chiarezza finora mai ottenuta con altre tecniche. Inoltre è possibile acquisire immagini su ogni piano necessario: trasversale, longitudinale o obliquo attraverso il corpo, con una risoluzione tale da riuscire a catturare particolari di dimensioni molto al di sotto del mm..

La complessità e la laboriosità della tomografia NMR si compensano con i suoi vantaggi; attualmente è senz'altro il migliore tra i procedimenti di imaging diagnostico per il sistema nervoso centrale (cervello e midollo spinale). Senza contare il grande vantaggio di non utilizzare radiazioni ionizzanti che invece sono presenti nella radiologia con i raggi X. L'assenza di queste radiazioni nocive permette di ripetere l'esame in qualsiasi momento, anche su bambini in tenera età e donne in stato interessante dal quarto mese di gravidanza.

Figura 30. Tomografo NMR per ricerche cliniche



13.5. Analisi di sostanze solide e/o semisolide

L'NMR è una tecnica che, oltre ad analizzare molecole in soluzione, può essere utilizzata anche per lo studio di campioni solidi e semisolidi.

Un campione allo stato solido, in presenza di un campo magnetico, è caratterizzato da segnali molto larghi dovuti alla presenza di interazioni dipolari, interazioni che in campioni in soluzione sono mediate dalla mobilità delle molecole. Per studiare campioni solidi è quindi necessario eliminare queste interazioni mediante la tecnica MAS, cioè la veloce rotazione del campione che viene posto ad un angolo (detto MAGICO) di circa 54° dal campo magnetico principale.

Per i campioni solidi è necessario generalmente aumentare la sensibilità e ridurre i tempi sperimentali mediante la tecnica di Cross Polarizzazione.

In questo caso, la tecnica si chiama **CP-MAS** e richiede amplificatori ad alta potenza (fino a 1kWatt)

Allo stato solido si studiano principalmente nuclei quali ^{13}C , ^2H , ^{31}P , ^{29}Si , nonché nuclei quadrupolari quali ^{27}Al , ^{23}Na etc.

Le applicazioni allo stato solido vanno dalla chimica organica alla chimica inorganica, dalla fisica alla biofisica e biochimica, dagli idrocarburi alla chimica del suolo.

Recentemente mediante la tecnica MAS sono stati analizzati anche campioni semisolidi (quali alimenti, tessuti biologici, cellule, resine, gel etc). In questo caso la tecnica viene definita MAS ad alta risoluzione o **HR-MAS**.

Figura 31. Interno di un probe con angolo magico e visione dell'insieme di uno spettrometro



14. Prevenzione e Sicurezza

14.1 Evoluzione ed osservazione.-

Negli anni passati l'Università "Federico II" ha formato, con appositi corsi, un cospicuo numero di tecnici ed amministrativi con l'obiettivo di ridurre il rischio di incidenti ed infortuni e di proteggere le persone e l'ambiente, attraverso la conoscenza dei potenziali rischi connessi al luogo di lavoro. Questo opuscolo, più specialistico rispetto ad altri, ha lo scopo di dare solo delle indicazioni di massima, senza pretendere di esaurire l'ampio e complesso argomento, sui potenziali rischi connessi alla frequentazione di laboratori in cui sono installati spettrometri di risonanza magnetica nucleare.

La normativa che consente l'uso degli spettrometri di RMN appare in Italia a metà degli anni ottanta e riguarda prevalentemente i tomografi per diagnostica medica (D.M. 29/11/85). Le apparecchiature vengono incluse nell'elenco dei presidi medici e sono assoggettate ad autorizzazione per quanto riguarda il commercio, l'installazione e l'uso, da parte del ministero della Sanità che richiede le seguenti indicazioni:

- a) tipologia dell'apparecchiatura
- b) descrizione del sito di installazione
- c) descrizione dei sistemi di schermatura sia del campo magnetico che della radiofrequenza
- d) descrizione della pianta planimetrica dei locali destinati alla apparecchiatura, alla strumentazione di controllo, alla preparazione del paziente, nonché alla descrizione dei limiti delle diverse aree di accesso controllato
- e) elenco di esperti in tecnologia della risonanza magnetica nucleare corredato, per ciascuno, di documentazione che dimostri specifica competenza (curricula, pubblicazioni, etc.).

Nel 1991 il nuovo decreto (DM: 2/8/91) é più circostanziato per quanto riguarda gli standard di sicurezza riferiti al paziente ed all'operatore e fissa i criteri che prevedono dettagliate prescrizioni protezionistiche, tabelle, fac-simili di domande per eventuali controindicazioni e responsabilità per le varie professionalità coinvolte, nonché requisiti tecnici, idoneità edilizia e controllo di sicurezza per le apparecchiature come sotto riportato:

- a) disponibilità delle altre strumentazioni diagnostiche richieste
- b) prestazioni tecniche minime dell'impianto
- c) idoneità edilizia delle installazioni fisse
- d) zone ad accesso controllato e zone di rispetto
- e) segnaletica
- f) sito di installazione dell'apparecchiatura
- g) locale del magnete
- h) altri locali del sito

- i) locali ed aree adiacenti il sito RMN
- j) dispositivi di sicurezza
- k) idoneità di approntamento delle installazioni mobili
- l) controlli di sicurezza, elenco degli esperti e dei responsabili della sicurezza

L'evoluzione e la diffusa utilizzazione di questa metodica chimico fisica ha portato con il D.M. 3/8/93 ad un riaggiustamento del precedente decreto del 1991 secondo i seguenti criteri:

- a) per le apparecchiature di gruppo A (art. 3, con campi statici < 2 T) è richiesta una autorizzazione regionale
 - b) per quelle settoriali, cosiddette dedicate (art. 2, con campo statico $< 0,5$ T) non è richiesta alcuna autorizzazione
 - c) specifiche indicazioni e limiti di esposizione per i campi elettromagnetici a radiofrequenza e per i campi magnetici variabili – norme delle indicazioni riportate agli allegati 1 e 4 del D.M. 2/8/91 – riportati negli allegati A e B del decreto. L'ultimo aggiornamento, in ordine di tempo, della normativa è quello relativo al DPR 542 dell'8/8/94 che disciplina il regime di autorizzazione per le apparecchiature soggette ad autorizzazione Regionale (fino a 2 T), o Ministeriale (oltre 2 T)
- la definizione delle apparecchiature settoriali non soggette ad autorizzazione
 - la collocazione organizzativo-funzionale delle apparecchiature (adeguamento alla programmazione ed integrazione con strutture specialistiche radiodiagnostiche)
 - la determinazione degli standard di sicurezza (allegati 1 e 4 del D.M. 2/8/91)
 - la definizione degli organi di vigilanza e dei procedimenti di controllo (organi territoriali delle USL, Ministero della Sanità, ISS, ISPELS)
 - la abrogazione di norme (parti del D.M. 29/11/85, D.M. 2/8/91 e D.M. 3/8/93)

Nessuna cenno, quindi, alle apparecchiature utilizzate per la ricerca scientifica, i cui campi magnetici, specie quelli dell'ultima generazione, superano la soglia dei 20 Tesla.

14.2. Rischi derivanti dall'uso dei gas criogenici

L'uso dei gas criogenici (azoto ed elio liquidi) può costituire, se non vengono adottati opportuni provvedimenti, un rischio che può essere così valutato.

Proprietà dei gas criogenici

- a) nocivi per la salute
- b) inodori
- c) ininfiammabili

- d) non tossici
- e) l'elio è più leggero dell'aria
- f) entrambi, evaporando, diffondono vapori freddi nell'ambiente
- g) i vapori di azoto vanno rapidamente verso il pavimento
- h) i vapori di elio si accumulano invece verso il soffitto
- i) a temperatura ambiente l'He liquido produce circa 750 litri di elio gas
- j) a temperatura ambiente l'N₂ liquido produce circa 700 litri di azoto gas

14.2. Danni associati ai gas criogenici

- a) *danni da gelo* (schizzi sulla pelle provocano ustioni; gli occhi sono particolarmente vulnerabili)
- b) *soffocamento* (concentrazione di O₂ nell'aria < 17-18% non è sufficiente alla respirazione umana)
- c) *condensazione* dell'ossigeno, in fase di rabbocco di elio liquido, può rappresentare un serio rischio di incendio.

La perfetta sicurezza dell'impianto dovrebbe prevedere il controllo costante della concentrazione di O₂ nell'aria in quanto, l'ossigeno è il solo gas che mantiene la vita e la sua concentrazione normale è circa il 21% della miscela d'aria, la cui composizione è 78% di azoto, 21% di ossigeno e 1% di argon. Di questi, solo l'ossigeno viene utilizzato fisiologicamente per la respirazione. È obbligatorio la disponibilità di adeguate protezioni (guanti, maschera per il viso e per gli occhi, scarpe di sicurezza non magnetiche) per coloro che sono addetti ai rabbocchi di gas criogenici. Inoltre, porte antipanico che diano direttamente all'esterno sono raccomandate per consentire una veloce evacuazione in caso di quench di magneti.

14.4. Considerazioni generali

Poiché i sensi umani non rilevano la ipoossigenazione, un individuo che respira atmosfera contenente percentuali basse di ossigeno, generalmente non si accorge del pericolo. L'insorgere di sintomi come sonnolenza, affaticamento, perdita di coordinazione, errori di valutazione e confusione possono essere mascherati da uno stato di "euforia" che induce un falso senso di sicurezza e di benessere. In generale lo stato di anoossia può portare ad una attenuazione di attenzione, ad una deformazione del giudizio ed in tempi veramente brevi a lesioni del cervello. Con una concentrazione di ossigeno del 12%, perdita di conoscenza e decesso sopravvengono senza alcun preavviso o sensazione di allarme.

14.5. Primo soccorso

In caso di infortunio per esposizione al freddo dei gas:

- a) lavare le parti colpite con abbondante acqua tiepida
- b) non esporre a calore diretto

Nel caso di sintomi di congelamento, lesioni e danni agli occhi, trasportare subito l'infortunato al pronto soccorso, curando di proteggere le parti colpite con un indumento soffice, asciutto e pulito. Mantenere il paziente al caldo ed in riposo, evitando di somministrare bevande alcoliche.

In caso di asfissia:

- a) l'infortunato deve essere trasportato in un ambiente ad atmosfera normale
- b) il personale che interviene in soccorso in un ambiente con scarsità di O₂ deve munirsi di autorespiratore od, in mancanza di mezzi, agire velocemente in apnea
- c) nel caso di arresto respiratorio è indispensabile praticare la respirazione artificiale e chiamare subito un medico.

14.6. Quench e boil-off

- a) il *quench* è provocato dal riscaldamento della bobina superconduttrice immersa in elio liquido all'interno del magnete
- b) i normali superconduttori hanno una fisiologica perdita di gas che si accumula nell'ambiente (boil-off)
- c) durante il quench si possono sviluppare repentinamente migliaia di litri di gas a pressione atmosferica
- d) un quench si verifica quando l'elio liquido non ricopre sufficientemente la bobina o quando essa stessa, per malfunzionamento, produce calore dovuto all'effetto Jaule.

Sia il quench che il boil-off richiedono un adeguato monitoraggio della concentrazione di O₂ nell'aria nonché il ricambio normale di 10 ricambi/ora e di 20 ricambi/ora in condizione di aspirazione forzata nel locale dello spettrometro. E' di obbligo quindi il condizionamento ed un sistema di evacuazione dei criogeni.

14.7. Vibrazioni e rumore

Il rumore prodotto dalle apparecchiature non deve superare la soglia di pressione acustica di picco (Lp) superiore a 140 dB riferita a 20 µPa in qualunque area accessibile.

14.8. Norme di sicurezza per le persone che hanno accesso ai siti di spettrometri NMR

- a) Il campo magnetico statico può interagire con bersagli paramagnetici, ferromagnetici e diamagnetici.
- b) Il campo magnetico variabile con il cuore e con il cervello ed, in generale, con tutti i tessuti conduttori,
- c) mentre le onde elettromagnetiche interagiscono con le molecole polari (acqua dei tessuti). Per tali motivi l'accesso ai locali degli spettrometri è interdetto a:
 - donne in stato di gravidanza

- portatori di pacemaker
- portatori di neurostimolatori
- portatori di protesi metalliche in materiale ferromagnetico
- portatori di qualsiasi altro dispositivo endocorporeo ad attivazione magnetica od elettrica.

E' obbligatorio depositare negli appositi armadietti, prima di accedere ai locali dei magneti:

orologi, schede telefoniche e carte magnetiche di qualsiasi genere (che verrebbero diversamente disattivate), chiavi, monete, spille, fibbie, in materiale ferromagnetico e telefoni portatili.

14.9 Rischi da onde a RF

Un Cabinet di un moderno spettrometro è immune da emissioni/interferenze esterne. Le frequenze degli spettrometri di ricerca, a differenza di quelli medicali, possono essere molto elevate (in quelli commerciali fino a 900 MHz) Ma di potenza relativamente modesta. Il cabinet, che è sede anche dell'amplificatore, con la sua struttura di acciaio inox e con le chiusure protette da guarnizioni a rete, non consente fuori uscita di radiazioni. I cavi interni sono completamente schermati, e raggiungono l'esterno attraverso opportune vie sul pannello posteriore.e consentono al segnale di radiofrequenza di essere irradiato dalla bobina trasmittente nella zona del battente in cui è disciolto il campione in esame, vedi fig. 21. Le frequenze degli spettrometri in commercio normalmente comprese da 200/900 MHz hanno potenze effettive dell'ordine di 200/300 Watt e 0,3/1 KW negli strumenti per solidi sono irradiate con treni d'onda di pochi ms schermate e localizzate . Ciò fa che il rischio per gli addetti sia praticamente nullo. Facendo un paragone con le radiazioni in un normale telefono cellulare, anch'esso operante a 900 MHz tra quelli più comuni ma di potenza molto più modesta (250 mW/2 W a seconda della distanza dalla cella di trasmissione) il rischio può esserci relativamente all'uso prolungato ed al fatto che le onde sono irradiate nelle immediate vicinanze del cranio coinvolgendo sia il cervello che l'apparato oculare. Entrambi queste parti corporee sono molto sensibili alle radiazioni che inducono in essi in essi un aumento della temperatura così come avviene nei comuni forni a microonde funzionanti però con potenze ben diverse ma con frequenze molto vicine a quelle degli spettrometri (0,8/2,4 GHz) . I danni provocati da eccessi di energia sono sempre dietro l'angolo: troppa luce abbaglia e può bruciare la retina, i raggi UV abbronzano ma alla lunga possono provocare il cancro alla pelle, un laser di appena 2 mW guardato dierttamente può provocare la cecità mentre si può guardare una lampadina da 50W senza alcun problema.

Tabella 12. Volumi per la messa a freddo iniziale e per i e rabbocchi di mantenimento di elio in litri .

Magnete/diametro	Rifornimento iniziale	Rabbocco
200/54	200	150
200/54 LH235	300	300
200/54 LH365	300	300
200/89	300	200
300/54	200	150
300/54 LH235	300	300
300/54 LH365	300	300
300/89	300	200
400/54,400/89	300	300
400/54 LH365	300	300
400/89	300	300
500/51	400	300
500/89	1000	600
600/51	1000	600
750/51	2000	1200
800/63	3000	1000

Tabella 13: Intensità di campo in prossimità di spettrometri

Magnete		Distanza assiale dalla linea centrale del magnete in metri			Distanza radiale dalla linea centrale del magnete in metri		
MHz/mm	Tesla	5-gauss	10-gauss	25-gauss	5-gauss	10-gauss	25-gauss
200/54	4.69	1.75	1.45	1.05	1.50	1.20	0.90
200/89	4.69	2.65	2.05	1.49	2.00	1.60	1.15
300/54	7.04	2.20	1.75	1.26	1.70	1.30	0.97
300/89	7.04	2.75	2.20	1.63	2.20	1.75	1.26
400/54	9.39	2.80	2.24	1.65	2.20	1.76	1.29
400/89	9.39	3.80	3.00	2.21	3.05	2.40	1.74
500/51	11.74	3.50	2.70	2.00	2.75	2.20	1.60
500/51 AS	11.74	1.85	1.4	1.30	0.90		
500/89	11.74	4.50	3.55	2.60	3.55	2.80	2.10
600/51	14.09	4.00	3.17	2.34	3.17	2.52	1.86

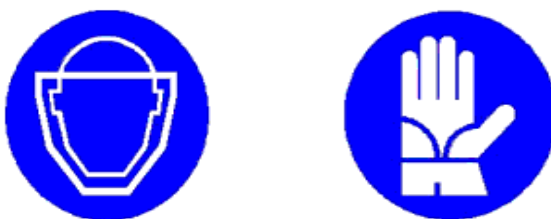
Figura 32. Segnalazioni di pericolo



Figura 33. Segnalazioni di divieto

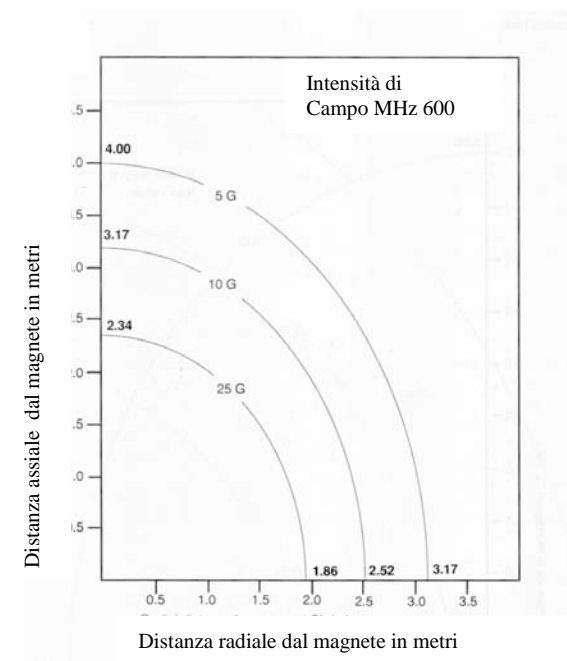
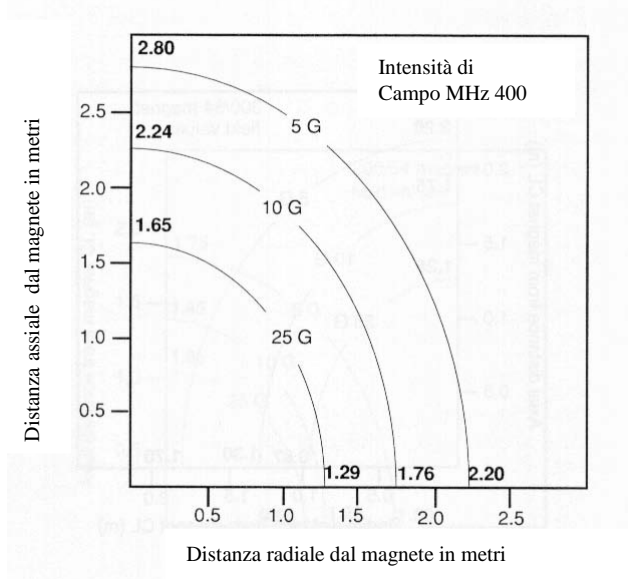


Figura 34. Segnalazioni di obbligo durante il rabbocco di criogeni



14.10. Linee isomagnetiche in prossimità di uno spettrometro NMR

Figura 35. Linee isomagnetiche: Valori di campo magnetico in prossimità di spettrometri di varia potenza (400-800 MHz)



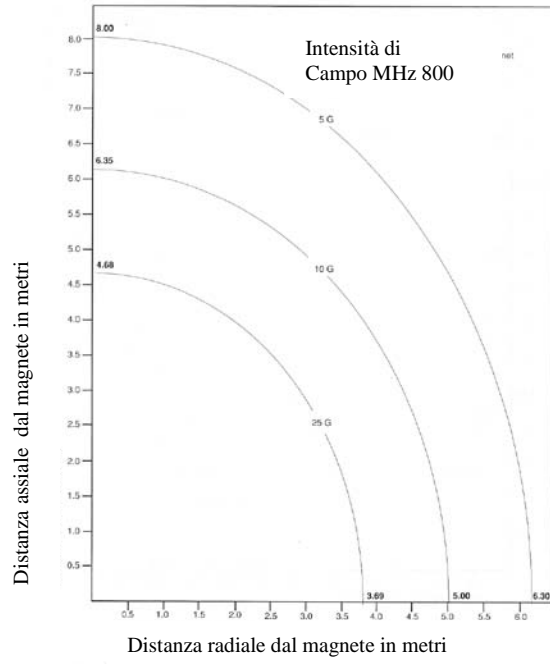


Figura 36. Schematizzazione sintetica di un sistema computerizzato di uno spettrometro e di uno spettrometro con cryoprobe

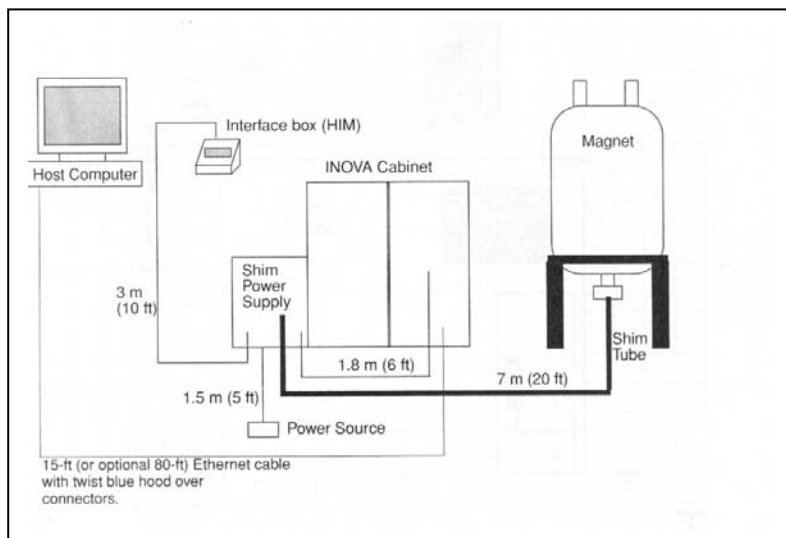


Figura 37. Spazio minimo per uno spettrometro INOVA da 600 MHz

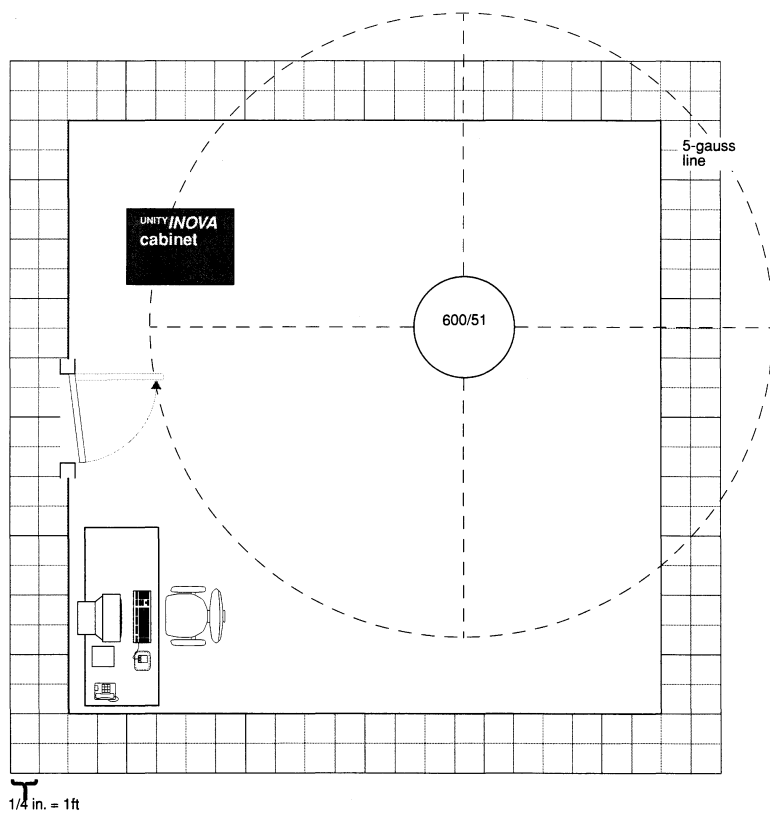


Figura 38. Due spettrometri ad alto campo dell'ultima generazione



15. ELENCO DEI SIMBOLI

Symbol	Definition	
Å	Angstrom (10^{-10} meters)	
B_0	Static magnetic field	Campo magnetico statico
B_1	The radio frequency magnetic field	Campo di radiofrequenza
C	Contrast	Contrasto
C	Electrical eapacitance	Capacità elettrica
COSY	2-D correlated spectroscopy	Spettroscopia di correlazione 2D
CW	Continuous wave	Onda continua
D	Deuterium	Deuterio
D	Diffusion coefficient	Coefficiente di diffusione
δ	Chemical shift	Spostamento chimico
δ	Magnetic field gradient pulse	Gradiente di campo magnetico (PW)
Δ	Magnetic field gradient pulse separation	
E	Energy	Energia
f	Frequency	Frequenza
FID	Free induction decay	Decadimento libero dell'induzione
FT	Fourier transform	Trasformata di Fourier
G_i	Magnetic field gradient in the i direction	
γ	Gyromagnetic ratio	Rapporto giromagnetico
h	Planck's constant	Costante di Planck
H	Hydrogen	Idrogeno
IFT	Inverse Fourier transform	Trasformata di Fourier inversa
IM	Imaginary part of a complex number	Parte immaginaria di un numero complesso
J	Joule	
J	Spin-spin coupling constant	Costante di accoppiamento di spin
k	Boltzman constant	Costante di Boltzman
k	kilo (10^3)	
k	Proportionality constant	Costante di proporzionalità
K	Kelvin temperature	Temperatura in kelvin
L	Electrical Inductance	Induttanza elettrica
m	milli (10^{-3})	
M	mega (10^6)	
μ	micro (10^{-6})	
M_0	Equilibrium magnetization	Equilibrio di magnetizzazione
M_x	X component of magnetization	Componente X della magnetizzazione

$M_{X'}$	X' component of magnetization	Componente X' della magnetizzazione
M_Y	Y component of magnetization	Componente Y della magnetizzazione
$M_{Y'}$	Y' component of magnetization	Componente Y' della magnetizzazione
M_Z	Z component of magnetization	Componente Z della magnetizzazione
M_{XY}	Transverse component of magnetization	Componente trasversale della magnetizzazione
MRI	Magnetic resonance imaging	Risonanza magnetica per immagine
ν	Resonance frequency in Hertz	Frequenza in Hertz
N	Number of averages	
N^+	Spin population in low energy state	Popolazione di spin a basso livello en.
N^-	Spin population in high energy state	
NMR	Nuclear magnetic resonance	
ω	Resonance frequency in radians per second	
Ω	Ohm, impedance	Impedenza in Ohm
π	3.14159...	
ϕ	Phase angle	Angolo di fase
ppm	Parts per million	Parte per milione
R_1	Spin-lattice relaxation rate	Velocità di rilassamento spin-reticolo
RE	Real part of a complex number	Parte reale di un numero complesso
RF	Radio frequency	Radiofrequenza
s	Second	Secondo
σ	Chemical shielding constant	Costante di schermo
SAR	Specific absorption rate	
Sinc	$\text{Sin}(x)/x$	
SNR	Signal-to-noise ratio	Rapporto segnale/rumore
T	Temperature	Temperatura
T	Tesla	Tesla
T_1	Spin-lattice relaxation time	Tempo di rilassamento spin-reticolo
T_2	Spin-spin relaxation time	
T_2^*	T_2 star	T_2 asteriscato
$T_{2\text{inhomo}}$	Inhomogeneous T_2	
Θ	Rotation angle	Angolo di rotazione
TE	Echo Time	
TI	Inversion Time	
TR	Repetition Time	
X	X axis in laboratory coordinate system	
X'	Rotating frame X axis	
Y	Y axis in laboratory coordinate system	

Y'	Rotating frame Y axis	
Z	Z axis in laboratory coordinate system	
1-D	One-dimensional	Monodimensionale
2-D	Two-dimensional	Bidimensionale

Prefazione.-

Richard Ernst vincitore del premio Nobel per la chimica nel 1991 nella sua “Nobel Lecture” affermava che il mondo degli spin nucleari è un vero paradiso non solo per fisici teorici sperimentali, ma anche per chimici, biologi e più recentemente per medici. Per i fisici il campo della risonanza magnetica nucleare consente di formulare semplici esperimenti che dimostrano i concetti fondamentali della quanto meccanica e della statistica, mentre per altri scienziati, permette fondamentali esperimenti per osservare le proprietà strutturali delle molecole, i loro comportamenti dinamici, le loro interazioni a livello biologico e molecolare.

Molti esperimenti chiave nel corso degli anni sono stati onorati dalla concessione di prestigiosi premi Nobel per la fisica e per la chimica. Nel 1944 Isidor I. Rabi fu premiato per i suoi famosi esperimenti sui fasci molecolari; Edward Purcell e Felix Bloch nel 1952 furono insigniti della prestigiosa onorificenza per aver illustrati i primi classici esperimenti di NMR; nel 1966 ad Alfred Kasler fu assegnato il premio per i suoi schemi di rilevazione ottica. Altri premi Nobel per la fisica sono stati associati in qualche modo alle risonanze magnetiche come John Van Vleck per avere sviluppata la teoria del dia e del paramagnetismo, come Nicolaas Bloembergen per i suoi studi sulla teoria del rilassamento, come Karl Alex Muller per aver fornito contributi fondamentali alla risonanza paramagnetica elettronica, come Norman F. Ramsey che è responsabile della teoria di base del chemical shift e dei J-coupling ed, infine, come Hans G. Dehmelt per avere sviluppato la risonanza quadrupolare.

Nel campo della chimica oltre Richard Ernst premiato per aver sviluppato le tecniche NMR multidimensionali, un altro Nobel Laureate recentissimo è Kurt Vuthrich (2002) per avere con grande successo utilizzato nuove tecniche NMR nello studio delle strutture tridimensionali delle proteine in soluzione.

Si può, con grande soddisfazione, affermare che la risonanza magnetica nucleare non è affascinante solo per la sua bellezza teorica e concettuale ma, soprattutto, per la sua straordinaria utilità.

Livio Paolillo

Postfazione.-

Ad un certo punto, per ragioni personali, si avverte il bisogno di scrivere: una poesia, una canzone o più semplicemente l'esperienza di un salto di vita lavorativa che dura da circa quarant'anni, come nel mio caso.

La stesura di questo volumetto, rivolto principalmente a coloro che si avvicinano per la prima volta alla spettroscopia NMR, è stata possibile grazie all'aiuto di Gaspare, di Lucia, di Alessandro e di Silvana. Sono grato al prof. Lorenzo Mangoni per avermi data la possibilità di acquisire esperienza su spettrometri NMR ad onda continua, negli anni sessanta, durante la sua direzione dell'allora "Istituto di chimica organica" e, successivamente su spettrometri più avanzati presso il Centro di Metodologie Chimico Fisiche, in cui era installato uno spettrometro Bruker 270 MHz, attualmente in disuso, ma in bella mostra all'ingresso del CIMCF.

Il Centro fu fondato su proposta della prof. Lucilla Salerno, del prof. Lorenzo Mangoni, e degli amici Livio e Pierandrea ai quali devo, e non solo io, un particolare ringraziamento per ciò che mi hanno insegnato e per la fiducia sempre accordatami, illimitatamente, anche ora nelle mie veste di Direttore del CIMCF.

Italo Giudicianni