

RMN Preparación muestras

En RMN la preparación de las muestras tiene una gran importancia en la calidad de los espectros. Las muestras no deben contener disolventes u otros contaminantes ajenos al producto a estudiar ya que pueden interferir con sus señales.

Muestra

Para un compuesto puro, completamente soluble a temperatura ambiente y con un peso molecular inferior a 500 unidades, las concentraciones recomendadas para los equipos de 400 MHz en automático son:

- Espectros protón 1D y Fluor 1-5 mg (3-15 mM), espectro adquirido en menos de 1 minuto con 8-32 acumulaciones.
- En los espectros de ^{13}C , el rango de concentraciones recomendado es de 30-80 mM.

El límite de detección y la sensibilidad dependen de la intensidad del campo magnético y también de las características de la sonda. En la Tabla I, se indican las sensibilidades relativas en los distintos equipos disponibles en relación a la sensibilidad de los equipos de 400.

Tabla-I

	B800/B600US Crioprobe	B600	B400 Crioprobe	VNMRS 500	M400
^1H relación de sensibilidad	31	3.4	4.7	3.3	1
^1H Limite detección*	¿?	0.002mg/ml 12 uM	0.002mg/ml 6 uM	0.002 mg/ml 12 uM	¿?
^{13}C relación de sensibilidad	> 5	1.8	2.7	1.5	1
^{13}C para una muestra 28 mM, se requiere:	-----	57 minutos	15 minutos	1 h y 5 minutos	3 h

*Límite de detección determinado con una muestra de mentol en CDCl_3 , $n_t=1024$, $AT=3s$, $D1=1$. Con la concentración de 12 uM se obtienen relaciones SN en el multiplete a 3,4 ppm (1H) de 17:1 para el VNMRS500 y B600 y de 35:1 para el B400. Un factor limitante es la calidad del disolvente deuterado utilizado.

Intrínsecamente la sensibilidad del ^{19}F es aproximadamente 0.8 veces la del protón. En el caso del ^{31}P con concentraciones menores que las de ^{13}C , se pueden obtener espectros con rapidez (30-15 minutos en el B600 o en el B400-crio).

La mayoría de los experimentos básicos de 2D, homo y heteronucleares, se pueden realizar con concentraciones similares a las utilizadas para obtener un protón con 8-32 acumulaciones. Con estas concentraciones el Cosy se puede obtener en sólo unos minutos. Los experimentos NOESY y ROESY es más conveniente efectuarlos en modo manual, por la baja sensibilidad y la necesidad de un buen ajuste de las condiciones del equipo, es.

Disolventes

En la preparación de las muestras para RMN deben utilizarse disolventes deuterados. De este modo se evitan las señales de los protones del disolvente en los espectros de protón (unas 10.000 veces intensas

que las del producto). Disponer de la señal de deuterio permite corregir la inestabilidad del campo magnético y optimizar la homogeneidad. Si es necesario utilizar disolvente no deuterado, esta circunstancia debe tenerse presente en la elección del experimento y condiciones.

En la selección de disolvente, debe considerarse la solubilidad del producto, el coste del disolvente y cómo puede afectarse la muestra. Disolventes, como el D₂O o el CD₃OD pueden producir el intercambio algunos protones de la muestra por deuterio. También, debe tenerse en consideración la viscosidad del disolvente (DMSO) y los efectos sobre el desplazamiento químico (piridina, benceno, etc.).

En los equipos de 400 MHz el volumen adecuado es de unos 0.7 ml (altura aproximada de 5 cm). La utilización de menos de 0.6 ml puede ocasionar problemas con el ajuste de homogeneidad. Utilizar un volumen superior al recomendado puede ocasionar problemas, debido a la creación de gradientes de temperatura en la muestra. Si se dispone de una cantidad muy limitada de muestra, es posible utilizar tubos especiales con reducción de volumen o los denominados shigemi (Figura-1)



Figura-1



Figura-2

Los disolventes susceptibles de absorber humedad deben manipularse bajo la lámpara de infrarrojos y almacenarse en un desecador.

Como referencia en CDCl₃ se utiliza el TMS. Para el D₂O, la referencia más frecuente es el TSP. Una alternativa es utilizar la señal residual del disolvente.

Previa a la realización de experimentos de temperatura variable, es necesario comprobar el punto de fusión y de ebullición del disolvente (Tabla II).

Tabla-II

Solvent	δH ppm	δ (HOD) ppm	δC ppm	MeltingPoint/°C	BoilingPoint/°C
Acetone-d ₆	2.05	2.0	206.7, 29.9	-94	57
Acetonitrile-d ₃	1.94	2.1	118.7, 1.4	-45	82
Benzene-d ₆	7.16	0.4	128.4	5	80
Chloroform-d ₁	7.26	1.5	77.0	-64	62
Deuterium oxide-d ₂	4.80	4.8	-	3.8	101
Dichloromethane-d ₂	5.32	1.5	54.0	-95	40
N,N-dimethyl formamide-d ₇	8.03, 2.92, 2.75	3.5	163.2, 34.9, 29.8	-61	153
Dimethylsulfoxide-d ₆	2.49	3.3	39.5	18	189
Methanol-d ₄	4.87, 3.31	4.9	49.2	-98	65
Pyridine-d ₅	8.74, 7.58, 7.22	5.0	150.4, 135.9, 123.9	-42	116
Tetrahydrofuran-d ₈	3.58, 1.73	2.4	67.6, 25.4	-109	66
Toluene-d ₈	7.09, 7.00, 6.98, 2.09	0.4	137.9, 129.2, 128.3, 125.5, 20.4	-95	111

En el artículo de H. E. Gottlieb et al., "NMR Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities", *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7512, puede encontrarse información sobre las impurezas más usuales en los disolventes utilizados en RMN

Si se observan restos de producto sin disolver las muestras deben filtrarse. El sólido en suspensión degrada la homogeneidad y la forma de línea de las señales.

Tubos

La calidad de los tubos debe estar en relación al campo y prestaciones del equipo utilizado, para los equipos de 400 MHz se recomienda una calidad equivalente a los Wilmad 507-PP (de 8"). En tabla III se indican las calidades y referencias de los tubos en función del equipo.

Tabla-III

Campo magnético	Wilmad	Norell	New Era
600 MHz	535-PP/528-PP	509-UP-8	NE-SP-5-8
500 MHz	528-PP/527-PP	508-UP-8	NE-UP-5-8
400-500 MHz (rutina)	507-PP	507-HP-8	NE-HP-5-8

En el equipo de 400 MHz con criosonda, **nunca deben utilizarse tubos con el fondo plano.**

Para experimentos con supresión de agua o disolvente, se recomiendan tubos con una calidad equivalente a la referencia 528 o 538 de Wilmad.

La longitud del tubo de RMN nunca debe ser inferior a 17 cm, ni estar roto o agrietado. El tapón debe cerrar perfectamente. Con disolventes como el CD_2CL_2 y $CDCL_3$ se puede utilizar un poco de parafilm para asegurar el cierre y reducir la evaporación.

La rotura de un tubo en la sonda puede comportar una reparación de miles de euros y la inactividad del equipo durante semanas.

Mantener la muestra en el tubo durante días hace más difícil limpiarlo. El lavado de los tubos debe iniciarse con el disolvente utilizado para disolver la muestra y terminar con varios enjuagues con acetona. Los disolventes utilizados en la limpieza deben ser de calidad HPLC. La utilización de ácidos concentrados puede atacar el material del vidrio. Del mismo modo no es recomendable utilizar escobillas o nada que pueda rayar el tubo. Es recomendable lavar los tubos nuevos previamente ya que pueden contener restos de grasas utilizadas en el proceso de fabricación. No recurrir nunca a la mezcla crómica para lavar los tubos, ya que es muy difícil eliminar los restos de paramagnéticos.

Para secar los tubos recurrir preferentemente a una corriente de nitrógeno seco, no utilizar un horno o estufa a temperaturas elevadas. Una vez secos deben guardarse en posición horizontal para prevenir deformaciones.

Los tapones deben remplazarse frecuentemente ya que su coste es muy pequeño y son una frecuente fuente de contaminación. Antes de poner el tubo en el imán limpiar el exterior, utilizando en caso necesario un papel impregnado con isopropanol

Spinners y ajuste de la posición

Introducir con cuidado el tubo en el spinner, sin forzarlo y realizando un pequeño giro del tubo. Si se aprecia resistencia, comprobar que el spinner no está obstruido y el anillo de goma de la parte superior está en buen estado. Retirar los spinners defectuosos y avisar a los técnicos de la Unitat.

Utilizar el medidor para ajustar la altura del tubo. Centrar la posición en relación a la zona de la bobina del imán. Comprobar que el tubo queda bien sujeto en el spinner y que no puede desplazarse cuando el cambiador lo coloque en el imán.

Al poner la muestra en el imán o en la bandeja del cambiador, nunca sujetarla por la parte marcada del spinner (señales para el tacómetro). No tocar la parte inferior del tubo, para evitar la transferencia de la grasa de las manos.

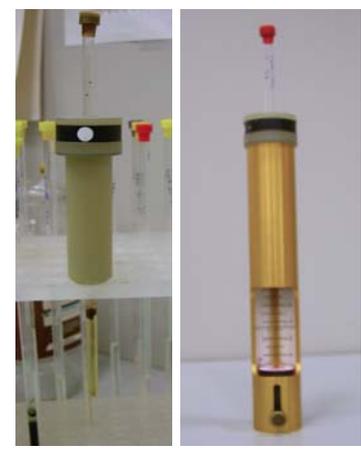


Figura-3

La utilización de un volumen inferior al recomendado impide ajuste de homogeneidad y ocasiona problemas con la forma de línea de las señales, tal como se puede apreciar en la figura 3.



Figura-4

Todos los tubos utilizados en los equipos de 400 en automático deben estar etiquetados o rotulados. En el caso de utilizar etiquetas se debe asegurarse que no se pueden desprenderse dentro del imán. Una alternativa es utilizar un poco de celo para que la escritura con el rotulador no se borre con facilidad

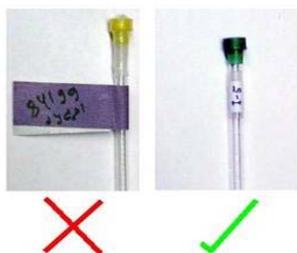


Figura-5

Referencias

- Decálogo-cambiador (web de la Unitat de RMN)

Información sobre tubos y referencias de Wilmad

- [NMR-001: NMR Tube Specifications and Quality](#)
- [NMR-002: Sample Devices and Magnetic Susceptibility](#)
- [NMR-003: Pressure Performance of NMR & EPR Sample Tubes](#)
- [NMR-010: Proper Cleaning Procedures for NMR Sample Tubes](#)
- [NMR-011: Reference Standards Quality in NMR Spectroscopy](#)
- [NMR-012: Si-29 and B-11 NMR Spectroscopy and Tube Selection](#)