

RMN Preparación muestras

En RMN la preparación de las muestras tiene una gran influencia en la calidad de los espectros. Las muestras no deben contener disolventes u otros contaminantes ajenos al producto a estudiar que puedan suponer una interferencia.

Cantidad de 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, se indican las sensibilidades relativas en algunos los equipos disponibles.

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	0.0009mg/ml 6 uM	0.002 mg/ml 12 uM	0.009 61 uM
^{13}C relación de sensibilidad	> 5	1.6	2.7	1.5	1
^{13}C para una muestra 28 mM, se requiere:	-----	1 h	15 minutos	1 h y 5 minutos	2 h y 30 minutos

*Límite de detección determinado con una muestra de mentol en CDCl_3 , nt=1024, AT=3s, D1=1.

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 la necesaria para obtener un protón con 8-32 acumulaciones. Con estas concentraciones el Cosy se puede obtener en sólo unos minutos.

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, reduciendo la sensibilidad en la muestra.

Disolventes

En la preparación de las muestras para RMN deben utilizarse disolventes deuterados. De este modo se evita la interferencia de las señales de los protones del disolvente (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 afectar a la muestra. Disolventes, como el D_2O o el CD_3OD pueden producir el intercambio

de 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 es contraproducente, debido a la creación de gradientes de temperatura en la muestra. Sí se dispone de una cantidad muy limitada de muestra, una alternativa es utilizar tubos especiales con reducción de volumen o los denominados shigemi (Figura-1)



Figura-1



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

Como referencia en CDCl_3 se utiliza el TMS. Para el D_2O , 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).

Figura-2

Tabla-II

Solvent	δH ppm	δ (HOD) ppm	δC ppm	MeltingPoint/ $^{\circ}\text{C}$	BoilingPoint/ $^{\circ}\text{C}$
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

Tubos

La calidad de los tubos debe estar en relación al campo y prestaciones del equipo utilizado. 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. La rotura de un tubo en la sonda puede comportar una reparación de miles de euros y la inactividad del equipo durante semanas. Previamente a la introducción en el imán se debe limpiar el exterior del tubo, utilizando en caso necesario un papel impregnado con isopropanol. Para más información sobre el cuidado de los tubos ver una nota anterior (NA-31 Tubos-selección y cuidado)

Spinners y ajuste de la posición

Introducir con cuidado el tubo en el spinner, sin forzarlo y realizando un pequeño giro. 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 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.

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-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, ni afectar al spinner.

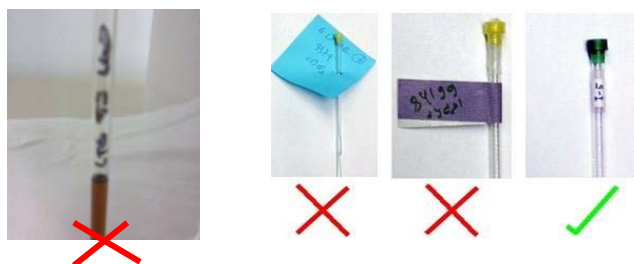


Figura-5