



INSTRUCTIVO

Para la preparación de muestras para ser analizadas por Resonancia Magnética Nuclear

Preparado por: Sergio Alegría

INTRODUCCIÓN

Estas instrucciones están diseñadas para obtener el mejor rendimiento posible del espectrómetro AVANCE NEO de 400 MHz, disponible en este Laboratorio de RMN, garantizando, 1).- que las muestras enviadas por los usuarios están bien preparadas para el análisis por RMN o en su defecto, 2) que se proporcionen los datos necesarios para prepararlas en nuestro laboratorio.

1.-CONSIDERACIONES GENERALES

1.1 - Características de los tubos:

Los tubos que se emplean en RMN de alta resolución deben cumplir una serie de características importantes, entre las que resaltamos las siguientes:

- Deben tener un diámetro de 5 mm y especificar que son para equipos de 400 MHz (o superiores) y un largo mínimo de 7 pulgadas.
- Puesto que el objetivo del tubo de RMN es confinar la muestra líquida en un volumen perfectamente cilíndrico, los tubos deben estar en buenas condiciones (sin deformaciones, bordes rotos, etc.).
- Deben mantenerse limpios de partículas de polvo, grasa, etc.

1.2 - Consideraciones para la limpieza de los tubos de RMN de alta resolución:

Los tubos de RMN son material desechable, sin embargo se pueden reutilizar si mantienen sus especificaciones originales, lo cual se logra si se siguen los siguientes cuidados:

- Lavar los tubos lo antes posible después de su uso, especialmente si las muestras contienen compuestos metálicos.
- No deben emplearse abrasivos que puedan deteriorar las paredes del tubo. En la mayoría de los casos puede ser suficiente el enjuague del tubo con agua o con un disolvente orgánico adecuado.
- Se puede usar también alguna solución jabonosa y posteriormente enjuagar con abundante agua destilada y acetona.
- Suele ser frecuente dar un último lavado con acetona para eliminar residuos orgánicos y humedad que puedan quedar en el tubo. No obstante, puede llegar a ser bastante difícil obtener un tubo completamente libre de trazas de acetona. Un método muy efectivo es hacer pasar una corriente de nitrógeno o de aire seco a través del interior del tubo. Nunca se deben secar los tubos en estufas a alta temperatura.
- En el caso de que existan restos sólidos de muestras que han permanecido en el tubo durante mucho tiempo la limpieza puede ser algo más difícil. Algunos fabricantes



recomiendan usar en estos casos ácidos minerales como el ácido nítrico concentrado (o fumante en casos muy severos), en los que se puede sumergir el tubo que se desea limpiar entre 1 y 3 días. Este ácido puede oxidar muchos productos orgánicos y disolver las impurezas inorgánicas que pudieran estar presentes.

En casos complejos, la agitación en un baño de ultrasonidos con un disolvente apropiado puede ayudar notablemente a la eliminación de los residuos presentes en el tubo (en este caso se debe tener precaución de no establecer un contacto firme de los tubos en el baño, pues la vibración podría provocar la rotura de los mismos).

Sin embargo, no se deben usar agentes oxidantes que contengan metales paramagnéticos como el ácido crómico o mezcla sulfocrómica, (esto es especialmente importante en experimentos de relajación o experimentos NOE). Tras el lavado con ácido es necesario realizar siempre un copioso enjuague del tubo para evitar la presencia de trazas de ácido. Los tubos de RMN, que mantienen adheridas especies metálicas paramagnéticas, deben ser eliminados.

1.3 - Características de los disolventes:

Los espectrómetros utilizan un sistema de “lock” para mantener la estabilidad del campo magnético que emplea la resonancia del deuterio, por lo que es imprescindible la utilización de disolventes que contengan este isótopo (se necesita un mínimo de un 10% de disolvente deuterado). La mayoría de los disolventes orgánicos usuales se encuentran disponibles en forma deuterada para su utilización en RMN, aunque algunos de ellos pueden resultar extremadamente caros. Cuando se opta por un determinado disolvente, es recomendable considerar si existe una alternativa más económica que pudiera ser adecuada a la muestra que se pretende estudiar, el orden de precios actual es:

$\text{CDCl}_3 < \text{D}_2\text{O} < \text{acetona-}d_6 < \text{DMSO-}d_6 < \text{benceno-}d_6 < \text{metanol-}d_4$

Los disolventes que se emplean normalmente en este Laboratorio son de alta calidad en relación al nivel de deuteración, no obstante, en casos de muestras muy diluidas puede ser necesario la utilización de disolventes con un mayor nivel de deuteración y pureza. Estos se pueden encontrar en el mercado, generalmente en viales cerrados.

Un aspecto importante a tener en cuenta, sobre todo en el caso de muestras muy diluidas, es considerar la localización que en el espectro puede tener la señal correspondiente al disolvente protonado residual (excepto en el caso del CHCl_3 , en todos los demás debe ser un multiplete como consecuencia del acoplamiento con deuterio) que puede aparecer en zonas del espectro inconvenientes para el estudio de la muestra. Otra señal que debe considerarse es la correspondiente al agua que, generalmente, está presente en todos los disolventes y que en algunos casos puede dar lugar a una señal bastante ancha.

Si se emplea cloroformo deuterado, se debe tener presente que puede contener residuos que originen la descomposición de compuestos que sean lábiles en condiciones ácidas. Asegúrese que este solvente contenga sustancias estabilizadoras.

En los espectrómetros modernos los espectros están calibrados desde el núcleo de deuterio y se puede emplear la señal del disolvente protonado residual para



confirmar esta calibración, o la señal de resonancia del solvente deuterado en espectros de carbono ^{13}C , por lo que no es necesaria la adición de referencia alguna (J. Org. Chem.1997, 62, 7512-7515)

En el caso de estudios que requieran una determinación exacta de los valores de desplazamiento químico, es necesario la adición de una referencia interna (en algunos casos se puede usar también una referencia externa con un capilar sellado conteniendo la sustancia de referencia). Las referencias que normalmente se emplean son:

Muestras orgánicas: Tetrametilsilano (TMS).

Muestras acuosas: Sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)-propano sulfónico (DSS).

2.- PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La mayoría de los disolventes comerciales contienen impurezas volátiles que pueden originar problemas en la escala de cantidades de muestra empleadas en RMN de alta resolución. La presencia de señales intensas entre 0.5 y 1.5 ppm puede ser debida a hidrocarburos que tienen este origen. Por otro lado, señales en torno a 0.1 ppm pueden indicar la presencia de grasa de silicona (proveniente de las juntas del material de vidrio empleado en la obtención de la muestra o en la purificación de los disolventes). Por ello, es recomendable emplear en la purificación de las muestras disolventes destilados, evitar en lo posible la grasa de vacío y, en aquellos casos en los que sea posible, cristalizar la muestra. En el caso de compuestos cristalinos es conveniente pulverizar la muestra y someterla a vacío para eliminar los restos de disolvente atrapados en los cristales.

Una vez disuelta la muestra en el disolvente deuterado es necesario filtrarla antes de introducirla en el tubo de RMN para eliminar cualquier partícula sólida que pudiera quedar en suspensión. La presencia de partículas sólidas en suspensión distorsiona considerablemente la homogeneidad del campo porque la susceptibilidad magnética de la partícula es diferente a la de la disolución de la muestra, por ello, la ausencia de partículas en suspensión es una condición indispensable para la obtención de espectros de alta calidad.

Otro aspecto importante, y a veces no muy tenido en cuenta, es el volumen de muestra que se introduce en el tubo. La altura ideal de muestra en el tubo es de unas tres veces el espacio activo de la bobina de radiofrecuencias de la sonda (ver fig. 1). Esto hace que el volumen ideal sea de unos 0.6-0.7 ml (para los tubos de 5 mm que se emplean en nuestro espectrómetro). No obstante se puede llegar a usar hasta un mínimo de 0.5 ml en espectros de rutina. Volúmenes más pequeños de muestra (ver fig. 1) pueden dar lugar a importantes problemas en la homogeneización del campo ("shimming") algo que puede resultar en formas de líneas muy distorsionadas que originan una disminución importante de la relación señal/ruido, dificultando notablemente la obtención de los espectros y reduciendo la calidad de los mismos.

Si se prepara una muestra muy concentrada para la obtención de un espectro de ^{13}C , se debe tener presente que el espectro de ^1H puede presentar señales mucho más anchas que las que se obtendrían para una muestra más diluida (aumento de la viscosidad,



posibilidad de asociaciones, etc.), por lo que si se requiere una mayor resolución, debería prepararse una muestra más diluida para el espectro de protones.

Finalmente, la muestra debe encontrarse perfectamente identificada con un código (es aconsejable no utilizar códigos excesivamente largos). Si se utilizan etiquetas adhesivas para la identificación del tubo se debe procurar que estas no sean muy grandes y que se dispongan de manera que mantengan en lo posible la simetría del tubo de RMN.

3.- INFORMACIÓN NECESARIA PARA LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS POR EL LABORATORIO DE RMN

3.1.- CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA:

- ESTADO: Sólido o líquido.
- PUREZA: Puro o mezcla
- SOLUBILIDAD: Muy soluble, soluble o poco soluble

Normalmente las pruebas de solubilidad se realizan con solventes técnicos o para análisis, estos pueden contener pequeñas cantidades de etanol u otra sustancia para estabilizarlo, esto cambia la solubilidad de los solutos en estos solventes.

Las pruebas de solubilidad deben hacerse con solventes de alta pureza, para que la solubilidad sea aplicable al usar solventes deuterados.

3.2.- TIPO DE ANALISIS SOLICITADO

RMN-¹H, COSY H-H, NOESY H-H

Para obtener un buen espectro, se requiere como mínimo una concentración de 4,0 mg/mL de muestra.

RMN-¹³C{¹H}, HMQC, HSQC, HMBC, OTROS NUCLEOS, ETC

Para obtener buenos espectros en estos experimentos en un tiempo máximo de 1 o 2 horas, se necesita una muestra mucho más concentrada, mínimo 20 mg/mL, para obtener información significativa del análisis.

3.3.- NOTA: CUALQUIER SITUACION ESPECIAL, EN CUANTO A LA MUESTRA Y LOS EXPERIMENTOS SOLICITADOS, SE DEBE CONVERSAR CON EL PERSONAL DEL LABORATORIO DE RMN, PARA DEFINIR LAS CONDICIONES PARA REALIZAR LOS EXPERIMENTOS.