

RMN Preparación muestras

La preparación de las muestras tiene una gran importancia en la calidad de los espectros de RMN. Las muestras no deben contener disolventes u otros contaminantes ajenos al producto o productos a estudiar

Muestra

Para espectros de ^1H y ^{19}F es suficiente con 1-10 mg de producto. En el caso de compuestos de peso molecular elevado o mezclas de varios productos, será necesario utilizar más cantidad de muestra. Para la realización de los espectros de ^{13}C , debido a su menor sensibilidad, se precisa una mayor cantidad de muestra (entre 20 a 70 mg). En el caso del ^{31}P la concentración puede ser algo menor que la del ^{13}C . Debe tenerse en cuenta que la utilización de soluciones muy concentradas pueda dar problemas, si la viscosidad es alta.

En la mayoría de los experimentos de 2D tanto sean homo, como heteronucleares. es suficiente con 15-30 mg, En el Cosy, se puede utilizarse menos muestra.

Disolventes

En la preparación de las muestras deben utilizarse disolventes deuterados. Necesarios tanto, para evitar las señales del disolvente en los espectros de protón (unas 10.000 veces intensas que las del producto), como para poder disponer de la señal de deuterio que permita corregir la inestabilidad del campo magnético y optimizar la homogeneidad. Si es imprescindible, puede utilizarse disolvente no deuterado, circunstancia que debe tenerse presente en la elección del experimento y condiciones.

En la elección de disolvente, debe tenerse en cuenta la solubilidad del producto, el coste del disolvente y también sus características. Algunos disolventes, como D_2O , CD_3OD , etc., pueden producir en la muestra un intercambio de ^1H por ^2H . También debe tener en consideración la viscosidad del disolvente (DMSO) y los efectos sobre el desplazamiento químico (piridina, benceno, etc.).

El volumen utilizado será de 1-0.7 ml (altura aproximada de 5 cm). La utilización de menos de 0.7 ml puede ocasionar problemas con el ajuste de homogeneidad. En los equipos Bruker es posible utilizar algo menos de disolvente (altura en el tubo \approx 4 cm). La utilización de un volumen superior al recomendado puede ocasionar problemas debido a gradientes de temperatura en la muestra. En el caso de disponer de una cantidad muy limitada de muestra es posible utilizar tubos especiales con reducción de volumen o los denominados shigemi

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

Como referencia en los espectros en CDCl_3 se utiliza el TMS. También es posible referenciar en base a las señales del disolvente, por ejemplo en ^1H el CDCl_3 residual a δ 7.26 ppm y en ^{13}C y se utiliza el triplete (acoplamiento C- ^2H) a δ 77.0 ppm. En el caso del D_2O , la referencia utilizada es el TSP

Previa a la realización de experimentos de temperatura variable, es necesario



comprobar el punto de fusión y de ebullición del disolvente.

Solvent	δ H ppm	δ (HOD) ppm	δ C 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, puede utilizarse un poco de algodón en un gotero. 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 de los equipos utilizados, para 300 y 400 MHz se recomienda una calidad equivalente a los Wilmad 507-PP (8") En la tabla se indican las calidades y referencias de los tubos en función del equipo. La utilización de tubos desechables está desaconsejada para los equipos de más de 250 MHz. La rotura de un tubo en la sonda puede comportar una reparación de miles de euros y una inactividad de semanas en el equipo.

Campo magnético	Wilmad	Norell	New Era
600 MHz	535-PP/528-PP	509-UP	NE-UP5
500 MHz	528-PP/527-PP	508-UP	NE-HP5

La longitud del tubo de RMN nunca debe ser inferior a 17 cm, ni debe estar roto o tener grietas. El tapón debe cerrar perfectamente el tubo, en el caso de disolventes como el CDCL₂ y CDCL₃ se puede utilizar un poco de parafilm para reducir la evaporación.

Los tubos de RMN deben estar limpios y secos. Es recomendable lavar los tubos nuevos antes de utilizarlos.

Mantener la muestra en el tubo durante días puede favorecer el ataque del mismo. El lavado de los tubos debe hacerse con disolventes y/o agua-jabón. La utilización de ácidos concentrados puede atacar el material del vidrio. Para secar los tubos recurrir preferentemente una corriente de

nitrógeno seco, no utilizar un horno o estufa. Una vez secos deben guardarse en posición horizontal para prevenir deformaciones.

Lavar los tapones con disolventes (no utilizar acetona) pueden ocasionar contaminaciones en las muestras. Los tapones deben remplazarse frecuentemente ya que su coste es muy pequeño y son una frecuente fuente de contaminación.

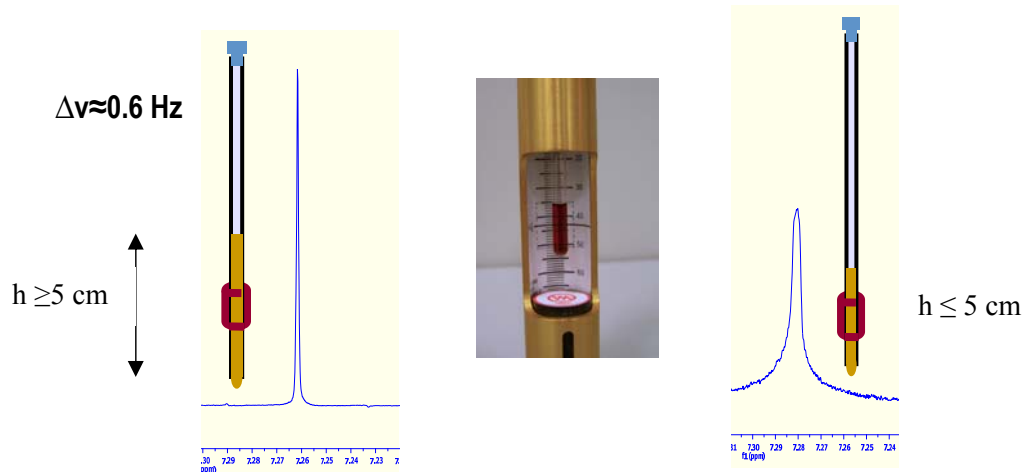
Antes de poner el tubo en el imán, limpiar el exterior, en caso necesario utilizar un papel impregnado con isopropanol

Spinners y ajuste de la posición

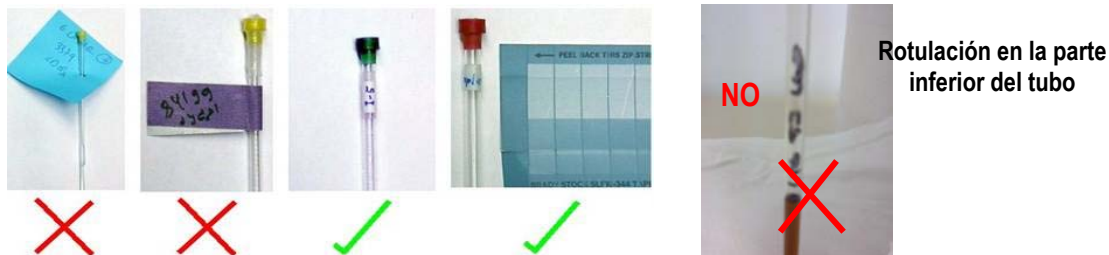
Al poner la muestra en el imán o en el cambiador, nunca sujetarla por el spinner y menos por la parte marcada (señales para el tacómetro)

Utilizar el medidor para ajustar la altura del tubo. Centrar la posición en relación a la zona del imán (en el caso de que el volumen no sea suficiente). Comprobar que el tubo queda bien sujeto en el spinner y que no puede desplazarse al ponerlo en el imán.

La utilización de volúmenes muy pequeños (altura menor a 4 cm) impide el ajuste de homogeneidad y ocasiona problemas con la forma de línea de las señales.



Los tubos deben estar etiquetados o rotulados. En el caso de utilizar etiquetas se debe asegurarse que estas no pueden desprenderse dentro del imán. Una alternativa es utilizar un poco de celo para ayudar la escritura con el rotulador no se borre con facilidad



Referencias

- Undecalogo-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](#)