

Buenas Prácticas en la Preparación de muestras para RMN

Estas prácticas son una guía útil para todos los que necesiten preparar una muestra para el estudio por RMN y en que la mejor preparación de la muestra se verá recompensada en tiempo de obtención del espectro y en la calidad del mismo.

1) Características de los Tubos

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

- Puesto que el objetivo del tubo de RMN es confinar la muestra líquida en un volumen perfectamente cilíndrico, los tubos deben tener unas dimensiones exactas (sin deformaciones, bordes rotos, etc.)
- Deben mantenerse limpios de partículas de polvo, grasa, etc.

Los factores que dictan que es un tubo de buena calidad son principalmente, la forma recta del tubo y que tan uniforme es el espesor de la pared.

Mientras que un tubo de RMN de calidad no garantiza un buen espectro, un tubo de RMN en mal estado siempre resultará en un "pobre" espectro.

Los espectros darán una línea base inadecuada y bandas laterales que no se pueden corregir con ajustes instrumentales. No importa cuánto tiempo o número de exploraciones le dé, un espectro obtenido con un tubo de mala calidad o roto tendrá problemas.

Consideraciones para la Limpieza de los tubos de RMN de alta resolución:

Es aconsejable lavar los tubos lo antes posible después de su uso. 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 los últimos restos orgánicos 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 puede ser hacer pasar una corriente de nitrógeno o de aire a través del tubo, con una pipeta, mientras se calienta suavemente durante varios minutos, o dejándolo bajo vacío durante algunas horas. Si la muestra va a ser disuelta en D₂O puede ser más conveniente dar el último lavado con agua destilada. Si es necesario secar los tubos en una estufa, es recomendable que se encuentren en posición horizontal para evitar deformaciones que puedan dañar el tubo. De igual forma, no es conveniente someter los tubos a altas temperaturas durante largos periodos de tiempo (no más de 100 °C durante una hora como máximo). Una temperatura inferior a 50 °C es adecuada para secar los tubos en una estufa durante periodos de tiempo más largos.

En 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 el ácido nítrico concentrado, en el 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. Sin embargo, no se deben usar agentes oxidantes que contengan metales paramagnéticos como el ácido crómico (esto es especialmente importante en experimentos de relajación o experimentos NOE). Tras el lavado con ácido es necesario realizar siempre un abundante enjuague del tubo para evitar la presencia de trazas de ácido.

Una técnica de limpieza muy efectiva, es la agitación en un baño de ultrasonido 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).

2) Características de los disolventes

Los espectrómetros utilizan un sistema de anclado (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 (normalmente 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 coste actual es: $\text{CDCl}_3 < \text{D}_2\text{O} < \text{acetona-}d_6 < \text{DMSO-}d_6 < \text{benceno-}d_6 < \text{metanol-}d_4$). En determinados casos concretos de muestras muy diluidas puede ser necesario la utilización de disolventes con un mayor nivel de deuteración que se pueden encontrar en el mercado, generalmente en viales sellados y con un grado de deuteración adecuado para este tipo de muestras.

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 el 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 e intensa.

Si se emplea cloroformo deuterado, se debe tener presente que este disolvente suele contener trazas de ácido que puede originar la descomposición de compuestos que son lábiles en condiciones ácidas.

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 2,2,-dimetil-2-silapenta-5 sulfónico (DSS).

Es muy importante señalar que la cantidad de compuesto que se necesita en el tubo de RMN es mucho menor de la que, generalmente, se puede añadir manualmente una vez preparada la muestra (una pequeña gota de TMS añadida al tubo de RMN puede ocasionar importantes problemas de línea base y de rango dinámico en el espectro), por ello, la referencia debe venir contenida en el disolvente empleado y no ser añadida sobre el tubo de RMN. No obstante, para la mayoría de los espectros de rutina se puede emplear la señal del disolvente protonado residual para la calibración del espectro, por lo que no es necesaria la adición de referencia alguna.

IMPORTANTE: Muchos de los disolventes deuterados que se emplean en RMN absorben rápidamente humedad del ambiente, lo que posteriormente se verá reflejado en los espectros con la aparición de una señal no deseada de agua, por lo que es importante mantener bien cerrados los frascos de estos disolventes mientras no estén usándose.

3) 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 silicona 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. La cantidad que se recomienda para obtener un espectro de hidrógeno (^1H) y de carbono (^{13}C) de rápida obtención (16 exploraciones para ^1H) y 64 exploraciones para carbono (^{13}C)) puede ser entre (10 a 20) mg de muestra sólida y entre (10-20) microlitros de muestra líquida en un volumen de 0,65 mL, que equivalen a una altura en el tubo de 5 cm.

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 muy 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 nuestros espectrómetros) que equivale aproximadamente 5 cm de altura. 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 homogenización del campo (“shimming”) algo que puede resultar en formas de líneas muy distorsionadas que originan una disminución importante en la relación señal/ruido, dificultando notablemente la obtención de los espectros y reduciendo la calidad de los mismos. En casos extremos de muestras de las que se dispone de cantidades extremadamente pequeñas, puede ser recomendable hacer uso de tubos especiales que se pueden encontrar en el mercado. Volúmenes mayores a los especificados también pueden dificultar la homogenización del campo magnético, además de conllevar un gasto excesivo e innecesario del disolvente deuterado.

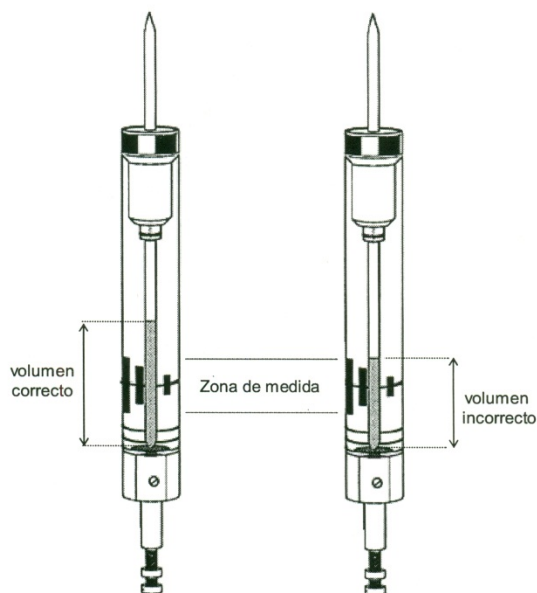


Fig. 1. Esquema de una muestra insertada en el medidor del espectrómetro, mostrando un volumen correcto de muestra y otro incorrecto.

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 obtendrán para una muestra más diluida (aumento de la viscosidad, posibilidad de asociaciones, etc.), por lo que sí se requiere una mayor resolución, debería prepararse una muestra más diluida para el espectro de hidrógeno.

Es aconsejable que durante el proceso de preparación de la muestra, la parte inferior del tubo sea manipulada lo mínimo posible, por ser ésta la parte del tubo que debe mantenerse más limpia (incluso en el mayor de los cuidados, las manos suelen ser bastante "sucias" desde el punto de vista de la RMN). En el proceso de limpieza del tubo es, por tanto, conveniente limpiar adecuadamente con un paño suave y humedecido con isopropanol esta parte del tubo y posteriormente tratar de manipularlo, siempre que sea posible, por la parte superior del mismo.

Finalmente, la muestra debe encontrarse perfectamente identificada con la clave correspondiente (es aconsejable no utilizar claves excesivamente largas). Si se utilizan etiquetas adhesivas para la identificación del tubo se debe procurar que se puedan desprender fácilmente del tubo antes de introducirlas en el magneto.

Información adicional

<http://www.wilmad-labglass.com>, página web de la compañía Wilman en la que se pueden encontrar fotografías y documentos interesantes relacionados con las características de los tubos, disolventes, accesorios, etc. de RMN.

<http://www.umich.edu/~techserv/nmr/nmrTubes.html>. Página web perteneciente a la Universidad de Michigan en la que se especifican algunas recomendaciones importantes para los tubos de RMN.

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/z271993?lang=es®ion=MX>. Página web de la compañía Sigma-Aldrich en la que se pueden encontrar las características de los tubos y los accesorios que se pueden usar en RMN: