

Homenaje a Alicia Seldes

Aplicaciones cuantitativas de la resonancia magnética nuclear

Gerardo Burton*

INTRODUCCIÓN

Cuando la mayoría de los químicos piensa en resonancia magnética nuclear (RMN), la asocia a la elucidación estructural y caracterización de moléculas. Esto es razonable, ya que la RMN es hoy en día la técnica espectroscópica más completa en términos de proveer información estructural, no solo en pequeñas moléculas sino también en macromoléculas complejas como las proteínas. Desde el desarrollo del primer espectrómetro en 1950, la metodología y el equipamiento utilizado han sufrido cambios importantes, dos hitos que cabe destacar son el uso del método de pulsos y transformación de Fourier que reemplazó al método de barrido (o de "onda continua") y la introducción de imanes superconductores en reemplazo de los electroimanes e imanes permanentes en ambos casos a partir de la década del 70. El método de pulsos trajo una mejora importantísima en la sensibilidad dando acceso a la RMN multinu-

clear, especialmente de ^{13}C pero también de ^{15}N , ^{17}O , ^{29}Si , ^{31}P y muchos otros que hoy en día son rutina en cualquier espectrómetro moderno. Los imanes superconductores permitieron romper la barrera impuesta por la saturación de los núcleos de hierro y alcanzar campos magnéticos cada vez más altos ganando en sensibilidad y resolución. Finalmente los avances en la electrónica y un entendimiento detallado a nivel mecánico del fenómeno nos ha dado una miríada de experimentos de RMN que exceden largamente a los simples espectros que se obtenían en los orígenes del método, con 2, 3 y hasta 4 dimensiones de frecuencia para asistir en la elucidación estructural, análisis conformacional y estudio de sistemas dinámicos. Paralelamente el potencial de la RMN ha sido reconocido en otras áreas, como por ejemplo su uso en la generación de imágenes para diagnóstico clínico, hoy ampliamente difundido.

A lo largo de esta historia, la esencia de cualquier experimento de RMN ha sido medir frecuencias de resonancia de los núcleos de interés con la mayor precisión posible y poder diferenciar frecuencias cercanas. La precisión de la medición y estabilidad de los espectrómetros modernos es asombrosa, 1

en 10^9 o mejor en mediciones que pueden durar hasta varios días, pudiendo distinguir con facilidad diferencias menores de 0,5 Hz en frecuencias absolutas de más de 5×10^8 Hz. Esta información además tiene un alto grado de reproducibilidad entre instrumentos distintos permitiendo la comparación directa de datos espectroscópicos obtenidos en laboratorios alrededor del mundo. En paralelo a esta información, todo aquel que utiliza y analiza espectros de RMN hace uso de la información cuantitativa también presente en los espectros que permite, a partir del área de cada señal determinar la cantidad relativa de núcleos que le dan origen. A pesar que los aspectos cuantitativos de la técnica son bien conocidos y rutinariamente utilizados desde los comienzos, su uso como metodología analítica cuantitativa alternativa es bastante más reciente. A esto han contribuido varios factores, entre los cuales el elevado costo de los espectrómetros de RMN jugó un papel importante. No menor ha sido sin embargo el uso intensivo que los químicos, especialmente los químicos orgánicos, han hecho de la RMN con fines de caracterización de moléculas que al no requerir una precisión importante en los aspectos cuantitativos, llevó a pensar que la metodología no era adecuada para esos fines.

* UMYMFOR (CONICET - UBA) y Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires - Pabellón 2, Ciudad Universitaria, C1428EHA Ciudad de Buenos Aires.

E-mail: burton@umy.fcen.uba.ar

PARTICULARIDADES DE LA R RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Si bien una descripción detallada de los principios de la resonancia magnética nuclear escapa a los fines de este trabajo, existen ciertos aspectos de la RMN que merecen ser destacados en comparación con otras espectroscopías tradicionalmente usadas en química analítica cuantitativa (para una introducción a los principios de la RMN ver [1]). Como en otras espectroscopías (UV-visible, IR), en RMN hay absorción de energía de la radiación electromagnética y esa absorción ocurre a frecuencias características relacionadas a la estructura de la molécula. Sin embargo, a diferencia de otras espectroscopías de absorción, el fenómeno de RMN solo se manifiesta en presencia de un campo magnético que diferencia energéticamente las posibles orientaciones del momento magnético de los núcleos. Las cantidades de energía involucradas son muy pequeñas y solo pueden medirse cuando el campo magnético es muy intenso; aun así con los imanes más poderosos disponibles actualmente, la radiación electromagnética corresponde a las ondas de radio con frecuencias por debajo del GHz.

El único requisito para que un núcleo sea observable por RMN es que presente un momento magnético no nulo, característica que se da cuando el spin nuclear es distinto de cero. Todos los elementos de la tabla periódica tienen al menos un isótopo que cumple este requisito, si bien en muchos casos la sensibilidad es baja o las señales son muy anchas dificultando la medición y restándole utilidad. La tabla 1 muestra los núcleos más usados en RMN así como algunas características de los mismos.

El tener que utilizar ondas de radio como fuente de radiación electromagnética, trae aparejado algunas particularidades experimentales que diferencian a los espectrómetros de RMN de un espectrofotómetro UV-

Tabla 1. Núcleos más usados en RMN (todos de spin 1/2)

Núcleo	Abundancia natural	Frecuencia de resonancia a 11,75 T	Información que brinda
¹³ C	1,07%	125,8 MHz	Permite "ver" el esqueleto de una molécula orgánica
¹ H	99,99%	500,1 MHz	Permite "ver" lo que rodea al esqueleto carbonado
³¹ P	100%	202,5 MHz	estructura de compuestos fosforados
¹⁹ F	100%	470,6 MHz	estructura de compuestos fluorados
²⁹ Si	4,69%	99,4 MHz	estructura de siliconas, etc.
¹⁵ N	0,36%	50,7 MHz	estructura de compuestos nitrogenados

visible o IR. En primer lugar debido a que la longitud de onda es en la escala de metros (habitualmente 0,5 a 5 m) no es posible enfocar o analizar las ondas de radio por métodos ópticos (lentes, redes de difracción, etc.); se deben usar antenas direccionales y circuitos electrónicos similares a los usados en transmisores y receptores de radio, televisión y telefonía celular. Por otra parte la eficiencia de la absorción por la muestra es muy baja y debe irradiarse con un exceso muy grande de energía de la cual se absorbe una fracción ínfima. Como consecuencia de estas características, no es posible medir un espectro de absorción "tradicional" y debe recurrirse a métodos más sofisticados para medir las frecuencias y la magnitud de la absorción. La RMN es considerablemente menos sensible que otras espectroscopías de absorción pero la sensibilidad aumenta al aumentar el campo magnético.

ASPECTOS CUANTITATIVOS

Continuando con la comparación con las espectroscopías de absorción, en éstas la intensidad de las bandas de absorción es proporcional a la cantidad de moléculas en el camino que atraviesa la radiación electromagnética. En UV-visible e IR ese número de moléculas está directamente relacionado con la concentración del analito (C) y la distancia recorrida por el haz de radiación al atravesar la muestra (d). En esas con-

diciones surge la conocida expresión para la absorbancia (A) dada por la ley de Beer-Lambert:

$$A = a \times d \times C$$

El coeficiente de proporcionalidad *a* (la absorptividad) es característico de cada banda pero no hay una relación sencilla ni fácilmente predecible entre las absorptividades de distintas bandas que deben ser determinadas experimentalmente. En RMN no es posible establecer el camino recorrido por la radiación electromagnética ya que ésta es enviada a la muestra desde distintas direcciones (generalmente hacia el interior de una antena de geometría cilíndrica). La intensidad de las bandas depende además de factores instrumentales (homogeneidad del campo magnético, sintonía), viscosidad, temperatura, solvente y presencia de impurezas paramagnéticas (incluido O₂). Es así que el coeficiente de proporcionalidad con la concentración tiene una pobre reproducibilidad y no tiene aplicación práctica.

Por otra parte, en RMN cada grupo de núcleos idénticos dará una señal de complejidad variable pero que puede ser asignada en forma inequívoca. El área de esa señal es directamente proporcional a la magnetización macroscópica de los núcleos que la producen, que no es más que la suma de los momentos magnéticos de los núcleos individuales. Como la magnitud del momento

magnético es una propiedad intrínseca del tipo de núcleo (^1H , ^{13}C , ^{31}P , etc.) en un espectro de RMN (por ejemplo de ^1H), las áreas de las señales dependerán solamente del número de núcleos que le dan origen. Existe entonces una relación sencilla y exacta entre las áreas de las distintas señales en un mismo espectro, dada por la cantidad relativa de núcleos que contribuyen a cada una de ellas. Un detalle muy importante a tener en cuenta es que estas áreas, al ser relativas, son independientes de la concentración y se corresponden exactamente con la *fracción molar* de cada grupo de núcleos idénticos en la muestra. La aplicación más simple de esto es la habitual integración a que se somete un espectro de RMN ^1H , donde la señal de un CH_3 tendrá un área 3 veces mayor que la de un CH y 1,5 veces la de un CH_2 . Sin embargo estas relaciones valen para todos los grupos de ^1H idénticos presentes en la muestra, independientemente de que pertenezcan o no a la misma molécula, lo cual nos lleva a una aplicación más general de la integración de un espectro RMN que, como se describe más abajo, permite mediante un cálculo sencillo obtener fracciones molares de los componentes de una mezcla.

ASPECTOS EXPERIMENTALES

Antes de pasar a los ejemplos de aplicación cabe dar algunas precisiones sobre los detalles experimentales a tener en cuenta al medir espectros para ser usados en determinaciones cuantitativas. Es común que en un espectro de RMN ^1H de un compuesto puro usado con fines estructurales, las áreas de las señales se desvíen hasta un 5-10% (o a veces más) del valor esperado. Como se sabe de antemano que las relaciones deben corresponder a números enteros (si una señal integra para 3,1 o 2,9 H sabemos que el valor correcto es 3) estos errores no afectan la interpretación y ésta es tal vez la causa principal que ha llevado a pensar que la

RMN es una técnica imprecisa desde el punto de vista cuantitativo. Esas desviaciones tienen varios orígenes:

Relajación incompleta de algunos núcleos:

En el método de pulsos suelen medirse varios espectros sucesivos (aplicando un pulso de radiofrecuencia y midiendo la señal resultante como amplitud en función del tiempo) que se suman para mejorar la relación señal/ruido del espectro y eliminar imperfecciones instrumentales. El espectro como una gráfica de amplitud vs frecuencia se obtiene por una transformación de Fourier de esa suma. Estrictamente, entre mediciones debe esperarse el tiempo suficiente para que el sistema vuelva al equilibrio, ese proceso sigue una recuperación asintótica exponencial caracterizada por el tiempo de relajación spin-red T_1 . Luego de aplicar un pulso de radiofrecuencia, se debe esperar 5 veces T_1 para recuperar el 99,5% de la magnetización original del sistema. Como el valor de T_1 es función del entorno de cada grupo de núcleos, puede ocurrir que para un determinado intervalo entre mediciones algunos núcleos recuperen su magnetización de equilibrio y otros lo hagan parcialmente, dando lugar a desviaciones en los valores de integración relativa (que es proporcional a la magnitud de la magnetización de cada tipo de núcleo). La solución a este problema es sencilla, deben medirse los tiempos de relajación de los núcleos involucrados (un experimento sencillo de realizar) y asegurarse que el intervalo entre mediciones sea mayor que 5 veces (o mejor 9 veces) el T_1 más largo. Como esto representa un incremento notable en los tiempos de medición, no es una práctica habitual en los espectros medidos con fines de elucidación de estructura.

Efecto Overhauser Nuclear: Este se da en núcleos distintos de ^1H cuando se miden espectros con irradiación simultánea de los ^1H . La irradiación simultánea o "desacoplamiento" de los ^1H es una práctica habitual

al medir espectros de otros núcleos ya que los simplifica. En RMN ^{13}C por ejemplo, se obtiene en estas condiciones una única señal por cada carbono de la molécula; sin embargo el área de esas señales puede tener variaciones de hasta un 200% por transferencia de polarización magnética desde los ^1H , un efecto muy útil para aumentar la sensibilidad pero desastroso si se busca información cuantitativa, que ha llevado a la presunción errónea que los espectros de RMN ^{13}C no pueden integrarse. Si se va a utilizar un espectro de RMN ^{13}C o ^{31}P en forma cuantitativa sólo debe eliminarse el efecto Overhauser nuclear (NOE), para lo cual existen secuencias de medición especiales que son estándar en cualquier espectrómetro moderno.

Relación señal/ruido pobre: Una línea de base con un alto nivel de ruido contribuye a imprecisiones en la integración de las señales, esto puede solucionarse fácilmente ya sea aumentando la cantidad de muestra (muestra más concentrada) y/o aumentando el número de espectros N sumados (la relación señal/ruido aumenta en forma proporcional a \sqrt{N}). Este factor es particularmente importante en núcleos poco abundantes y poco sensibles como ^{13}C .

Imperfecciones en la línea de base: Estas están asociadas a factores instrumentales como problemas de sintonía en la sonda del equipo, vibración mecánica de la sonda o tubos de muestra defectuosos. Imperfecciones en la forma de las líneas (que deberían ser Lorentzianas) suelen deberse a inhomogeneidad del campo magnético. Solucionados esos factores, las imperfecciones remanentes en general pueden corregirse con el software de procesamiento.

Baja resolución digital: Este es un factor a tener en cuenta en espectros de RMN de núcleos que tienen un ancho espectral grande como ^{13}C , ^{31}P y ^{15}N , donde luego de la digitalización las señales pueden quedar

definidas por muy pocos puntos. Esto produce alejamiento de la forma natural (Lorenziana) de las señales y desviaciones en el área. Nuevamente este problema puede solucionarse fácilmente, incrementando el tamaño de la tabla de datos de modo de tener una resolución digital adecuada.

Errores en la integración: La forma natural de las líneas de un espectro RMN corresponde a la función de Lorenz (líneas Lorenzianas), tienen el máximo en la frecuencia de resonancia y luego caen hacia los lados en forma asintótica. Este acercamiento asintótico a la línea de base, introduce un error en la integración que es tanto mayor cuanto mayor es el ancho a media altura de la línea. Este factor pasa a ser despreciable si se tienen líneas estrechas (preferentemente menos de 2-3 Hz de ancho a media altura)

Una descripción detallada de aspectos instrumentales y de operación a tener en cuenta y su efecto en los espectros, puede encontrarse en [2].

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR VS. CROMATOGRAFÍA DE GASES Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

Si cada componente de una mezcla diera una única señal en el espectro RMN, ese espectro se parecería a primera vista a un cromatograma obtenido por cromatografía de gases (CG) o cromatografía líquida (HPLC). Esto es bastante común por ejemplo, en el caso de espectros de RMN ^{31}P de pesticidas fosforados donde habitualmente cada componente contiene un único átomo de fósforo (o dos equivalentes) (Figura 1). Existen sin embargo varias diferencias a considerar que se resumen a continuación. En primer lugar la posición de las señales en el espectro está dada por el desplazamiento químico del núcleo directamente relacionado a la estructura de la molécula, es decir

que esa posición contiene información estructural precisa que puede ser comparada directamente con datos de literatura (por la elevada reproducibilidad que tiene el desplazamiento químico) y correlacionada con

En segundo lugar el factor de respuesta de los detectores usados en CG o HPLC varía de un analito a otro. Ese factor solo puede determinarse experimentalmente utilizando estándares certificados (de pureza conoci-

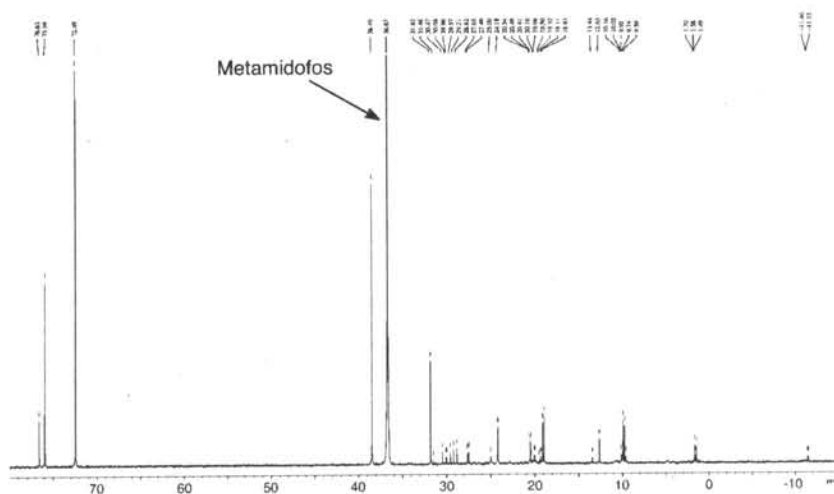


Figura 1. Espectro de RMN ^{31}P de metamidofos (*O,S*-dimetil fosforoamidotoato) técnico. La señal a 36,7 ppm corresponde a metamidofos (escala vertical multiplicada $\times 10$ para visualizar señales menores). Se observan resueltas, señales de más de 30 impurezas con fracciones molares que van de 0,05 a 0,002.

los espectros de RMN ^1H y ^{13}C . El dato equivalente en un cromatograma, el tiempo de retención, depende de numerosos factores (flujos, presiones, estado de la columna, etc) y no tiene una correlación directa con la estructura más allá de relaciones de polaridad o volatilidad; difícilmente alguien identificaría un compuesto por encontrar que tiene el mismo tiempo de retención que el descripto varios años atrás por un laboratorio a miles de kilómetros de distancia. La identificación inequívoca del analito que origina cada pico en CG o HPLC requiere utilizar como detector un espectrómetro de masa y cuando esto no es suficiente, hacer la cromatografía en escala preparativa de modo de aislar el componente responsable de cada pico e identificarlo luego mediante ... RMN. Debe tenerse siempre presente que la simple comparación de tiempos de retención con un estándar en idénticas condiciones no garantiza la identidad.

da) de los componentes en cuestión. En el espectro de RMN sabemos que el factor de respuesta depende sólo del número de núcleos, dato disponible una vez identificado el componente, con lo cual no se requiere un estándar de referencia.

Finalmente si se busca realizar una cuantificación absoluta, por ejemplo para determinar pureza o el contenido de un activo o una impureza en un producto técnico, en el caso de CG o HPLC nuevamente se requiere un estándar certificado de cada analito. En RMN también se necesita un estándar de referencia, pero en este caso la cuantificación se hace respecto a los núcleos sin importar en que molécula se encuentran, ya que la respuesta relativa (área de la señal) es independiente de ésta. En consecuencia en RMN la sustancia usada como referencia y el analito no tienen que ser la misma, sólo deben contener el mismo tipo

de núcleos (^1H , ^{13}C , ^{31}P , etc.). Esto permite usar un único estándar de referencia (diferente de los componentes de la muestra) que se agrega a la muestra previo a la medición del espectro. ¿Que requisitos debe cumplir este estándar de referencia? En primer lugar, como ya se mencionó, contener al menos un núcleo igual a uno de la muestra, ser soluble en el mismo solvente, no dar señales que se superpongan con las de la muestra o de las impurezas, preferentemente dar una única señal en el espectro RMN y obtenerse comercialmente con alto grado de pureza y título confiable. Otras características deseables son ser estable, no volátil y preferentemente sólida. La tabla 2 muestra algunos estándares de referencia que pueden utilizarse en RMN cuantitativo. De estos la dimetilsulfona es uno de los más utilizados y ha sido propuesta como estándar de referencia universal [7]. El procedimien-

mún en RMN ^1H o ^{13}C , cada analito da varias señales? En ese caso desde el punto de vista del análisis cuantitativo se debe seleccionar la señal más sencilla (idealmente un singulete) y mejor resuelta de cada analito. Además debe asegurarse por todos los medios posibles que la señal seleccionada no esté superpuesta a la de otro analito; usualmente esto puede hacerse por espectroscopía de correlación en 2 dimensiones donde los ^{13}C pueden correlacionarse con ^1H a 1, 2 o 3 enlaces, la posibilidad que simultáneamente el ^{13}C y esos ^1H se superpongan exactamente en dos compuestos diferentes es muy baja. Por último el disponer de varias señales del analito permite utilizar más de una en el cálculo y disminuir el error de la determinación. Por supuesto cuanto más complejo es el espectro de RMN más posibilidades de superposición existen y también más posibilidades que alguna impure-

bitualmente citado como QNMR por "Quantitative Nuclear Magnetic Resonance") [3-7], algunas ya se han incorporado a farmacopeas o han sido adoptados por la Organización Mundial de la Salud por ejemplo para el análisis de pesticidas. Se presentan a continuación tres ejemplos representativos todos ellos llevados a cabo en el laboratorio del autor.

Determinación de grado de etoxilación de alcohol láurico: Una de las aplicaciones más simples se refiere a determinar el contenido promedio de unidades oxietileno en un alcohol láurico polietoxilado, comunmente usado como emulsionante en la industria cosmética y como base de tensoactivos (previa sulfatación) [8]. Debe tenerse en cuenta que habitualmente este tipo de compuestos son una mezcla obtenida por reacción del alcohol con óxido de etileno, y contiene una distribución de moléculas con distinto grado de etoxilación. El análisis por métodos cromatográficos (CG, HPLC) suele ser complejo ya que requiere disponer de los distintos patrones de referencia no siempre disponibles. La Figura 2 muestra el espectro RMN ^1H a 200 MHz y la asignación de las señales. En este caso no es necesario la resolución completa de todas las señales y alcanza con dividir las en dos grupos: las señales de metilenos unidos a oxígenos que se encuentran entre 3,4 y 3,8 ppm (área total A_{OX}) y las señales de los metilenos y el metilo de la cadena de hidrocarburo no unidos directamente a oxígeno entre 0,8 y 1,6 ppm (área total A_{HC}). El número de unidades de oxietileno (n) promedio puede obtenerse fácilmente a partir de la siguiente ecuación:

$$n = 5,75(A_{\text{OX}}/A_{\text{HC}}) - 0,5$$

De la misma forma puede obtenerse un peso molecular promedio. Si hubiera posibilidad que la porción del alcohol fuera en realidad una mezcla de alcoholes de distinto largo de cadena, aún es posible calcular tanto el

Tabla 2. Estándares de referencia aptos para RMN cuantitativo.

Estándar	Núcleos	Soluble en
dimetilsulfona	^1H , ^{13}C	agua, solventes orgánicos
acetato de sodio anhidro	^1H , ^{13}C	agua
fosfato de sodio dodecahidrato	^{31}P	agua
trifenilfosfato	^{31}P	solventes orgánicos
trifluoroacetato de etilo	^{19}F	solventes orgánicos
ortosilicato de etilo	^{29}Si	solventes orgánicos

to es extremadamente simple, se pesan cantidades de muestra y estándar calculadas para que den señales de área comparable en el espectro RMN, se mide el espectro y se determinan las áreas relativas. Conociendo el número de moles de estándar agregado puede calcularse en forma inmediata el número de moles del analito y a partir de éste la masa de analito presente en la muestra.

Al comienzo de esta sección se tomó como ejemplo una mezcla donde cada componente daba una única señal en el espectro RMN. ¿Que ocurriría si, como es el caso más co-

za pase desapercibida, tal como ocurre en un cromatograma que presenta una zona con varios picos muy próximos. La solución aquí es usar un espectrómetro de campo magnético mayor para lograr más dispersión de las señales o cambiar de núcleo (^{13}C o ^{31}P tienen mayor dispersión de desplazamiento químico y menor posibilidad de superposición).

EJEMPLOS DE APLICACIÓN

Existen en la literatura numerosos ejemplos de aplicaciones cuantitativas de la RMN (ha-

grado de oxietilación (n) como el número de carbonos promedio de los alcoholes (o el peso molecular medio) usando como referencia la integración de la señal a 3,44 ppm (el CH₂ vecino al OH) que corresponde exactamente a 2 H. En ese caso sería conveniente medir el espectro a un campo mayor (por ejemplo a 500 MHz) de modo de lograr una mejor resolución de esa señal y una integración más precisa.

en forma muy sencilla por RMN ¹H, el contenido de hidroquinona y otros aditivos relativo al cianoacrilato. En el caso de la hidroquinona y debido a la baja proporción en que se encuentra es conveniente para reducir el error, referir la integración relativa a uno de los satélites de ¹³C de la señal del cianoacrilato cuya área corresponde al 0,535% (5350 ppm) de esta última. Cabe recordar que el 1,12% de las moléculas con-

Este método ha sido validado en el rango de 30 a 1000 ppm [4]. En el espectro de la Figura 3a pueden verse además las señales correspondientes a un poli(acrilato-metacrilato) de metilo que también puede cuantificarse en forma similar [8]. Surge aquí una de las grandes ventajas de la RMN frente a los métodos cromatográficos tradicionales, todos los componentes son visibles en el mismo espectro no siendo necesario buscar condiciones específicas para cada uno (como puede ocurrir en CG o HPLC para compuestos con propiedades físicas muy diferentes). Más aun, componentes desconocidos pueden en algunos casos ser identificados ya que el espectro provee información estructural.

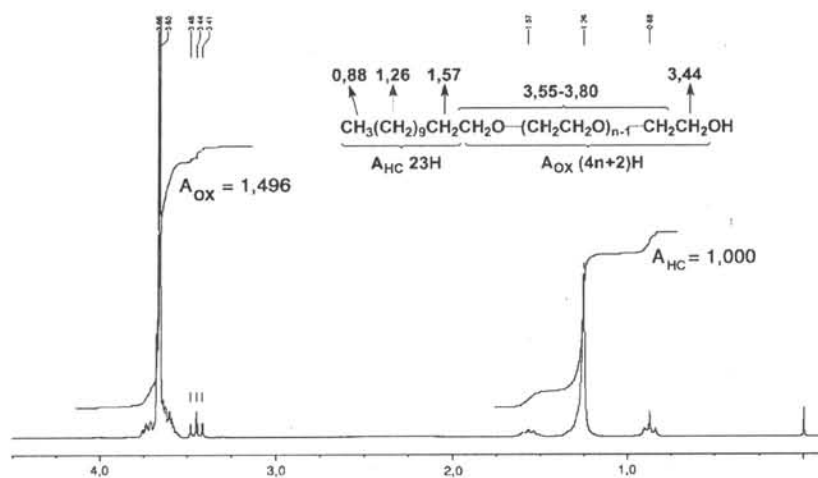


Figura 2. Espectro RMN ¹H 200 MHz de polioxietileno 8 lauril éter. La relación de áreas corresponde a 8,1 unidades de oxietileno ($n = 8,1$)

Contenido de aditivos en cianoacrilatos: Los adhesivos basados en cianoacrilato de etilo son muy utilizados no sólo para adherir objetos sino también para cerrar cortes y heridas. Normalmente estos adhesivos contienen entre 100 y 1000 ppm de hidroquinona como estabilizante y poli(acrilato) de alquilo para mejorar las propiedades físicas (flexibilidad, adhesividad, etc.) luego de la polimerización. Debido a la facilidad con que polimerizan, resulta muy poco recomendable analizar estos productos por métodos cromatográficos como HPLC o CG. Aprovechando que los cianoacrilatos son estables por varias horas en solución de deuteriocloroformo seco, es posible analizar

tienen ¹³C en vez de ¹²C en una determinada posición y en ellas los ¹H unidos a ese ¹³C aparecen acoplados; en el caso del cianoacrilato cada uno de los H olefinicos da un singlete correspondiente al 98,93% que contiene ¹²C en esa posición y un pequeño doblete centrado al mismo desplazamiento químico ($J_{HC} \approx 160$ Hz) que corresponde al 1,07% que contiene ¹³C. En la Figura 3a se muestra el espectro RMN ¹H 500 MHz de un cianoacrilato comercial y en la Figura 3b se muestra la zona de H olefinicos usada para la determinación. En la expresión final debe tenerse en cuenta que la señal de la hidroquinona corresponde a 4 H mientras que cada satélite es 0,535% de 1 H:

Determinación de pureza y contenido de impurezas en muestras de glifosato: El glifosato (*N*-(fosfonometil)glicina) es un herbicida ampliamente utilizado en los cultivos de soja de todo el mundo. Tradicionalmente la pureza y el contenido de las principales impurezas conocidas, se determina por HPLC utilizando columnas de intercambio iónico. El método es costoso, requiere largos tiempos de estabilización de columnas y equipo y se debe disponer de un estándar certificado de glifosato para calibración. El análisis de las impurezas es más complejo aún, ya que no existe un método de detección "universal" para todas ellas (con lo cual algunas pueden pasar inadvertidas si no se las busca específicamente) y el perfil de impurezas puede variar dependiendo del origen ya que se utilizan al menos cuatro métodos de síntesis diferentes. También se debe disponer de estándares certificados de las impurezas, algunos de los cuales no están disponibles comercialmente o el título declarado es dudoso.

Siendo el glifosato una molécula sencilla que presenta solo dos señales en el espectro de RMN ¹H y una en el espectro RMN ³¹P, resulta especialmente apta para su análisis cuantitativo por RMN [9]. La Figura 4a pre-

$$\text{ppm_de_hidroquinona} = \frac{5350 \times \text{Area}_{\text{hidroq}} \times \text{PM}_{\text{hidroq}}}{2 \times (\text{Area}_{\text{sateliteH}_1} + \text{Area}_{\text{sateliteH}_2}) \times \text{PM}_{\text{cianoacrilato}}}$$

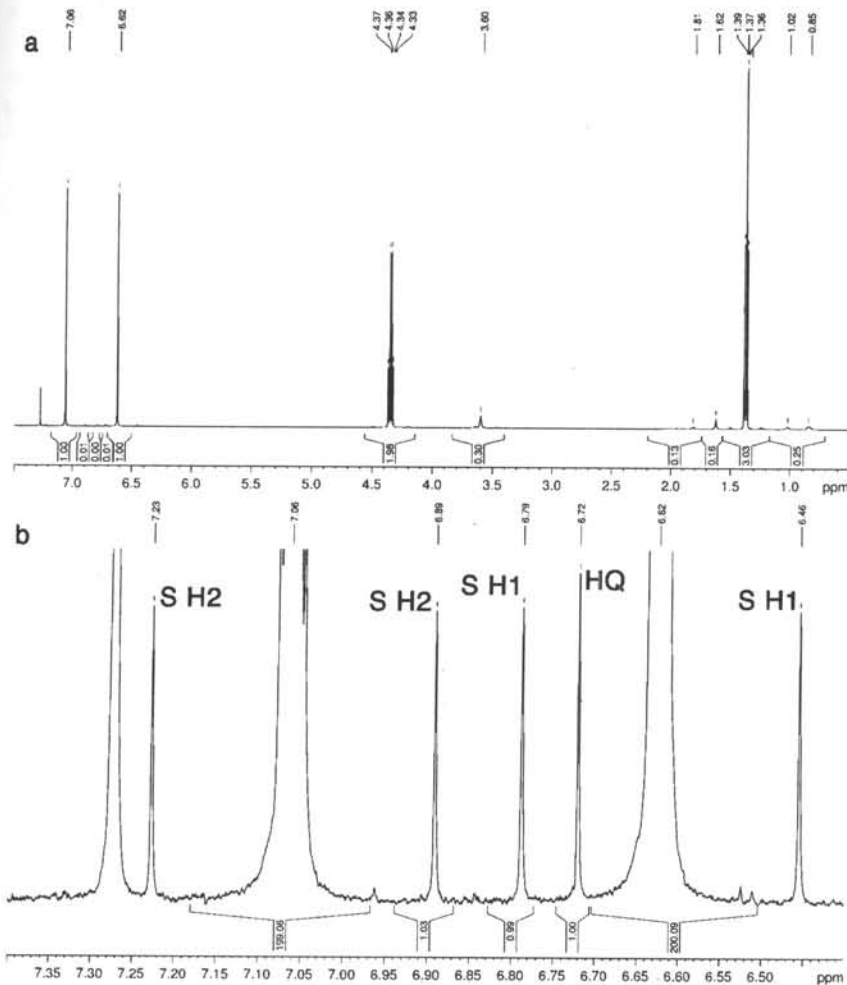


Figura 3. a. Espectro RMN ¹H 500 MHz de un adhesivo de cianoacrilato de etilo. b. Ampliación de la zona olefínica, S H1: satélite de H1, S H2: satélite de H2, HQ: hidroquinona

senta el espectro de un glifosato técnico en solución de óxido de deuterio/piridina-d₅ 7:1 con agregado de acetato de sodio como

que en una mezcla equimolar la relación de áreas sería 3:2):

$$\% \text{ de glifosato} = \frac{3 \times \text{Area}_{\text{glifosato}} \times PM_{\text{glifosato}} \times \text{masa}_{\text{acetato}}}{2 \times \text{Area}_{\text{acetato}} \times PM_{\text{acetato}} \times \text{masa}_{\text{muestra}}} \times 100$$

estándar de referencia. El contenido de glifosato puede obtenerse en forma sencilla de la integración relativa de las señales de acetato (singulete a 1,64 ppm) y del metileno α al carbonilo del analito (singulete a 3,5 ppm) teniendo en cuenta que corresponden a 3 y 2 H respectivamente (es decir

La Figura 4b, muestra una ampliación de una zona del espectro anterior con la identificación de algunas impurezas. El contenido de cualquiera de ellas surge en forma inmediata con la simple medición del área y aplicación de la ecuación anterior (cambiando el peso molecular y el número de H de la

señal considerada según corresponda). A partir del espectro de RMN ¹H y del espectro de RMN ³¹P (con fosfato trisódico como estándar de referencia) pueden identificarse y cuantificarse impurezas comunes como ácido iminodiacético (IDA), ácido fosfometiliminodiacético (PMIDA) y su N-óxido, N-metilglifosato (NMG), glicina (GLI), glifosina, ácido hidroximetilfosfónico (HMPA), ácido aminometilfosfónico (AMPA), ácido metilaminometilfosfónico (MAMPA) y ácido iminodi(metilfosfónico) (IMPA) con límites de detección entre 0,01 y 0,05% según el caso [8]. Un detalle importante es que no existen impurezas "invisibles" o "transparentes" (salvo aquellas que no contengan ¹H ni ³¹P en este caso) ni de bajo o exagerado factor de respuesta como puede ocurrir en HPLC o CG, todas son detectables con la misma sensibilidad, bajo el mismo conjunto estándar de condiciones experimentales y todas pueden ser analizadas con precisión sin contar con estándares de referencia certificados de las mismas.

CONCLUSIONES

La resonancia magnética nuclear cuantitativa es una técnica poderosa y confiable que supera a los métodos cromatográficos tradicionales en muchos aspectos. Al igual que estos últimos, no es un método perfecto y no puede resolver todos los problemas, pero es una alternativa especialmente útil para el caso de impurezas inesperadas, cuando no se dispone de estándares de referencia o cuando se deben certificar estándares nuevos. La mayor desventaja de la RMN es la baja sensibilidad, que requiere trabajar con cantidades relativamente grandes de muestra (típicamente 50 a 100 mg por determinación) y por supuesto el costo elevado del equipamiento y de su mantenimiento.

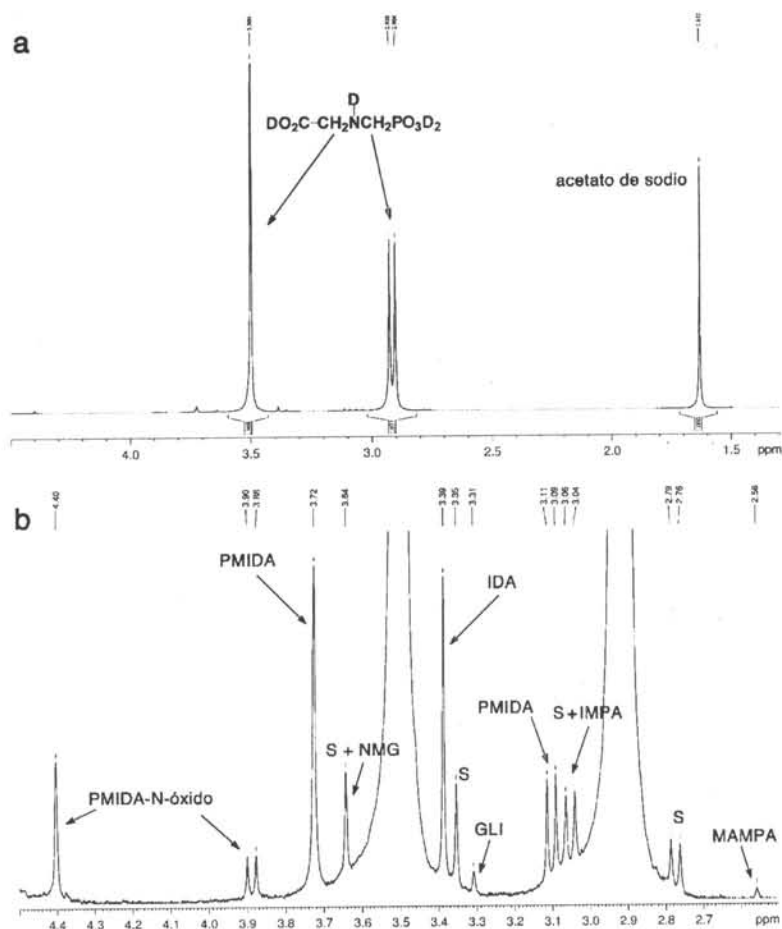


Figura 4. a. Espectro RMN ^1H 500 MHz de glifosato (en óxido de deuterio/piridina- d_5 7:1) con acetato de sodio como estándar de referencia; los H intercambiables se han reemplazado por deuterio del solvente (D). b. Ampliación de la zona 2.5-4.5 ppm y asignación de señales de impurezas; S: satélite de ^{13}C , otras abreviaturas ver texto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] P. J. Hore, *Resonancia magnética nuclear*, Colección: Manuales de Química - Eudeba, Editorial Universitaria de Buenos Aires, Buenos Aires, 2000.
- [2] M. L. Martin, J. -J. Delpuech, G. J. Martin, *Practical NMR Spectroscopy*, Heyden & Son Ltd., Londres 1980
- [3] G. F. Pauli, *Phytochem. Anal.*, **2001**, *12*, 28-42.
- [4] U. Holzgrabe, B. W. K. Diehl, I. Wawer, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1998**, *17*, 557-616.
- [5] R. J. Wells, J. M. Hook, T. S. Al-Deen, D. B. Hibbert, *J. Agric. Food. Chem.*, **2002**, *50*, 3366-3374.
- [6] R. J. Wells, J. Cheung, **2001**, *The Chemistry Preprint Server* CPS:analchem/0103002
- [7] R. J. Wells, J. Cheung, J. Hook, *Accred. Qual. Assur.*, **2004**, *9*, 450-456.
- [8] Método desarrollado en UMYMFOR (CONICET-UBA) no publicado previamente.
- [9] T. S. Al-Deen, D. B. Hibbert, J. M. Hook, R. J. Wells, *Anal. Chim. Acta*, **2002**, *474*, 125-135.

Homenaje a la Dra. Norma Nudelman

ESTIMADOS SOCIOS DE LA AQU Y COLEGAS

Nos es muy grato comunicarles que la Dra. Norma Nudelman, reconocida investigadora en el campo de la Química Orgánica y Miembro Titular de la Comisión Directiva de la Asociación Química Argentina, ha sido homenajeada con una publicación conmemo-

rativa por el *Journal of Physical Organic Chemistry*, vol.19, issue 12 (2006), donde se publican los trabajos más relevantes de la CLAFCO-8.

Este tributo es un reconocimiento a su prolífica trayectoria y a sus importantes contribuciones al conocimiento en el campo de la Físicoquímica Orgánica.

Este reconocimiento internacional a la Dra. Nudelman distingue a la ciencia argentina y latinoamericana y enorgullece especialmente a los más 1000 socios con que cuenta la AQU en la actualidad, muchos de los cuales son jóvenes investigadores y profesionales activos, para los que la trayectoria de la Dra. Nudelman constituye un claro ejemplo a seguir.