

PASOS A SEGUIR PARA TRABAJAR EN UN LABORATORIO DEL INSTITUTO DE QUÍMICA MÉDICA

Para empezar a trabajar en un laboratorio de química se requiere mucha precaución ya que la gran mayoría de los reactivos y disolventes son tóxicos por lo que es importante conocer algunas normas básicas:

1. Siempre que se esté trabajando en un laboratorio hay que ponerse bata, guantes y gafas de seguridad.
2. Trabajar siempre que sea posible dentro de la vitrina para evitar la inhalación de vapores.
3. Anotar las reacciones y las incidencias en el cuaderno del laboratorio.

En el IQM se sintetizan moléculas que podrían presentar muy buena actividad terapéutica. Para sintetizar estas moléculas hay que tener en cuenta lo siguiente:

1. En primer lugar, conocer el procedimiento sintético para obtener el producto deseado. Si son reacciones descritas habrá que seguir el procedimiento publicado pero si son reacciones nuevas hay que hacer una búsqueda en bases de datos (Scifinder, Reaxys).
2. Una vez conocido el procedimiento hay que buscar los REACTIVOS Y EL DISOLVENTE. En cuanto a los reactivos, cada grupo tiene su propia colección de reactivos y generalmente su propia base de datos (Chembiofinder). En la base de datos se puede encontrar la disponibilidad del reactivo y su localización. Los reactivos están guardados a temperatura ambiente o en frío (nevera de cada grupo o cámara fría).
3. Si el grupo no dispone del reactivo hay que comprarlo en las casas comerciales. Se puede comprar directamente online, o bien, a través del almacén, en este último caso hay que rellenar un vale en el despacho de Manuela, la responsable del almacén. Ejemplo de compra on line: Queremos comprar un reactivo en Sigma Aldrich, se accede a la página de Sigma Aldrich donde te solicitan un usuario y contraseña (preguntar a tu investigador responsable) a continuación buscas el reactivo y lo compras (Figura 1). Hay que estar atentos y evitar que se cobren los gastos de envío, para ello hay que hacer un pedido mínimo (en torno a 50 €).

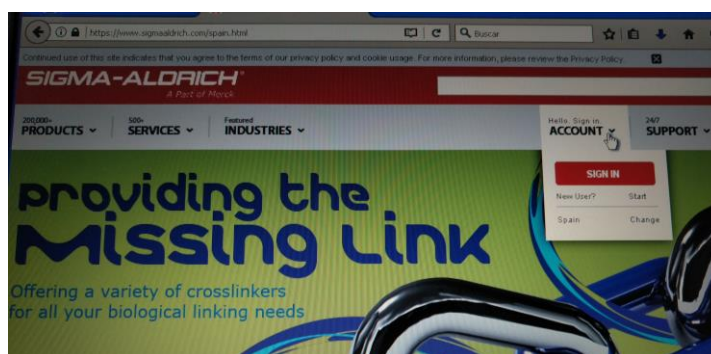


Figura 1. Sigma Aldrich

4. Cuando llega el reactivo hay que incluirlo en la base de datos del grupo especificando su localización.
5. En cuanto a los disolventes, algunos se compran directamente en el almacén (acetoniitrilo, acetato de etilo, tetrahidrofurano, metanol, etc) y otros se compran a través de las casas comerciales (ej. Sigma Aldrich, etc).
6. Los disolventes anhidros se compran en las casas comerciales o se secan en el laboratorio. Para ello se activa tamiz molecular de 4 ó 3 Å en la estufa (la que está al lado del hidrogenador) y una vez que el tamiz está enfriado a vacío (usando una bomba de vacío) se añade sobre el disolvente, se pone un septum y se deja varios días en reposo.
7. A continuación se selecciona una placa agitadora, un imán de agitación y un matraz acorde al volumen de reacción.
8. Los reactivos se pesan en las balanzas de precisión. Estas balanzas se encuentran al final de los pasillos del IQM. Una vez usada la balanza siempre se debe limpiar. La balanza de ultraprecisión sólo se usa cuando las cantidades son muy pequeñas. También disponemos de una balanza para pesar gran cantidad de producto.
9. Para seguir las reacciones por TLC el IQM dispone de 2 lámparas UV situadas en dos armarios del pasillo (una lámpara enfrente de la estufa grande y la otra al final del pasillo al lado del laboratorio 344).
10. Una vez concluida la reacción se lleva a cabo el procesado correspondiente y se procede a la purificación del producto deseado.
11. Para realizar dicha purificación se puede hacer una columna convencional, un biotage que es una purificación a media presión de forma automática o un cromatotrón.

11.1. COLUMNA CONVENCIONAL

Se elige la columna en función de la cantidad y R_f del producto y de sus impurezas. A más cantidad de producto a purificar más diámetro de columna.

La columna se coloca verticalmente sujeta por dos pinzas, se le introduce un trozo de algodón, luego un poco de arena, por último gel de sílice (cantidad suficiente para la separación). El producto a purificar se siembra disuelto en la mínima cantidad de un disolvente poco polar (por ejemplo, diclorometano). Si el compuesto a purificar no fuera soluble en diclorometano, éste se puede disolver en un disolvente polar, por ejemplo metanol, y añadir gel de sílice para formar una "cabeza de columna" que se siembra sobre la gel de sílice. En ambos casos se añade un poco más de arena para evitar que se estropee el frente de la columna cuando se añade el disolvente (Figura 2).



Figura 2. Columna convencional

Una vez montada la columna se prepara la mezcla de eluyentes y se comienza la elución en gradiente, empezando siempre por el menos polar y aumentando la polaridad gradualmente hasta que va saliendo el producto deseado, junto con las impurezas, que se recoge en tubos. Los tubos se chequean por TLC, se seleccionan las fracciones puras y se evapora el disolvente en el rotavapor.

11.2. BIOTAGE

Sistema de separación automática a media presión (Figura 3). El equipo se puede usar en condiciones de fase normal o reversa aunque es preferible usarlo en fase reversa para que no se disuelva la sílice de los caratuchos. Fundamentalmente se usa en condiciones de fase reversa. Los pasos a seguir son los siguientes:

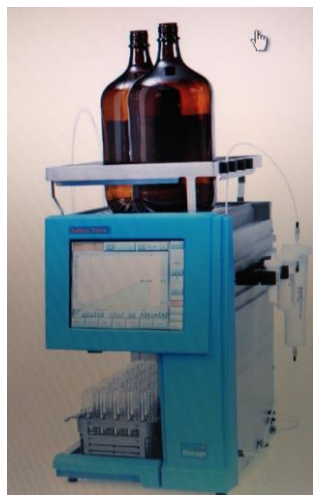


Figura 3. Biotage

Seleccionar la columna adecuada en función de la cantidad de compuesto a purificar y colocarla en el lugar correspondiente en función de su diámetro. En el equipo se van eligiendo los siguientes parámetros.

SOLVENTS

Seleccionar los disolventes a utilizar y poner las cantidades en mL.

PRIME

Compactar la columna, para ello se pasa el 100% del disolvente más apolar (3 volúmenes de columna).

METHOD, FROM TLC (PREPARACIÓN DEL GRADIENTE)

Cuando se trabaja en fase normal, el equipo estima un gradiente en base a los R_f de las impurezas y del producto final. Para mejorar la separación es aconsejable introducir tramos de isocrático empleando los comandos EDIT y ADD.

PARAMETERS (PESTAÑA DE ARRIBA)

Se introduce el nombre de la muestra, la cantidad de disolvente que se quiere recoger en cada tubo, como se desea que se efectúe la recogida de las fracciones (en Z o S) y por último el tipo de rack.

LONGITUD DE ONDA (UV) (PESTAÑA DE ARRIBA)

Selección de la longitud de onda de trabajo que se establece en función del producto. A la longitud de onda elegida no deben absorber los disolventes.

RUN

El método se inicia pulsando "Run". A continuación se seleccionan los Racks A, B, C y D, en función de los Racks rellenos y se inicia el gradiente.

EDIT

A medida que se va trabajando es posible cambiar el método elegido o añadir Racks, en caso de que nos hayamos quedado "cortos" y aún no haya salido el compuesto deseado, mediante el comando EDIT.

STOP Y PAUSE

Parar o pausar el método.

RESULTS

Ver los resultados del biotage.

11.3. CROMATOTRÓN

La purificación consiste en sembrar el producto a purificar en la placa giratoria disuelto en la mínima cantidad de disolvente.

Para ello se pone a rotar la placa giratoria y se introduce el líquido (con pipeta) por la cánula de la tapa. La mezcla de disolventes se prepara en un erlenmeyer y se administra con una única bomba en la que se selecciona el flujo de bombeo. Debido a la fuerza centrífuga y el gradiente de disolventes se van separando las distintas manchas.

Las manchas recorren toda la placa giratoria de forma circular y cuando han recorrido el 80 % de la placa se comienza a recoger el disolvente que sale del cromatotrón en tubos, los cuales se chequean por TLC.

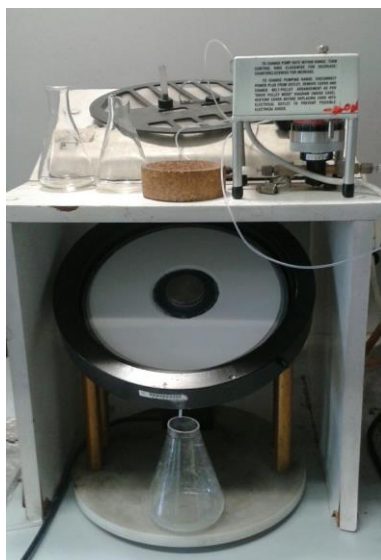


Figura 4. Cromatotrón

Se pueden preparar placas de 1 mm y de 2 mm de espesor en función de la cantidad de producto a purificar y hay que ajustar el flujo de la bomba en función del espesor de la placa.

Con las placas de 1mm se puede purificar de 8 a 100 mg de producto y con las placas de 2 mm hasta un máximo de 400 mg. Estas placas se preparan con una cantidad exacta de agua y de sílice especial de cromatotrón que está recogido en el libro de instrucciones.

La mezcla formada se echa sobre un plato giratorio (placa) y se deja secar durante unos días. Después se tiene que lijar con unas lijas especiales (hay lijas de 1 mm y de 2 mm y una última lija denominada F que se pasa siempre al final, independientemente del espesor de la placa).

Estas placas son reutilizables, cuando se termina la purificación se lavan con metanol, acetato de etilo y por último hexano y se dejan secar al aire.

ROTAVAPOR CONECTADO A BOMBA DE MEMBRANA

El rotavapor de bomba de membrana nunca se debe usar para rotar reacciones con medios ácidos (Figura 5). Este tipo de rotavapor se usa para evaporar disolventes con punto de ebullición bajo-medio mientras que para eliminar los disolventes de punto de ebullición alto se debe emplear un rotavapor conectado a una bomba de aceite.

Para usar el rotavapor conectado a bomba de membrana se deben seguir los siguientes pasos:

Se enciende el interruptor de la bomba. Se selecciona la presión de trabajo con el comando **Set vacuum**. El valor seleccionado dependerá del disolvente a usar. En todos los laboratorios hay unas tablas en las que se recogen dichos valores. Una vez seleccionado la presión deseada se da al botón **Start**. El rotavapor se pone a girar y se enciende simultáneamente la placa calefactora (lo ideal es rellenar el baño del rotavapor con agua destilada). Una vez rotado el disolvente se presiona el botón **Stop** hasta que se libere todo el vacío.

El disolvente evaporado condensa en el balón de la bomba de vacío, gracias al agua que circula por el refrigerante. Dicho disolvente se tiene que eliminar en el bidón de residuos correspondiente. En todos los laboratorios hay dos bidones de residuos líquidos, Halogenados y NO Halogenados. Cuando los bidones están llenos se bajan al almacén y se suben otros bidones vacíos.

De vez en cuando se tienen que cambiar las gomas de vacío del rotavapor porque con el uso se van deteriorando.



Figura 5. Rotavapor

12. Una vez aislado el producto deseado se lleva a cabo su caracterización. El centro cuenta con varios equipos de RMN (Brucker-300, Varian-300, Mercury-400, Varian-400 y Varian-500). Estos equipos se seleccionan en función del experimento y de las cantidades de producto. Hay que rellenar las fichas correspondientes para que se lleven a cabo los experimentos. Las muestras se preparan disueltas en un disolvente deuterado en los tubos de resonancia.
13. El IQM también dispone de un laboratorio de análisis donde se pueden realizar HPLC-MS, HPLC y HPLC-MS semipreparativo (Figura 6). Se requiere rellenar las fichas correspondientes para que se lleven a cabo los experimentos correspondientes. Las muestras se preparan disueltas en el disolvente adecuado en los viales de masas correspondientes.



Figura 6. Equipo de HPLC-MS

14. Llegados a este punto, ya disponemos del producto deseado, pero tenemos todo el material sucio. Para la limpieza del material disponemos de dos lavavajillas que están situados cercanos a los aseos. Para la correcta limpieza del material se usa un jabón especial de lavavajillas que es muy agresivo (cuidado con el contacto con la piel y ojos porque es muy irritante).
15. El detergente se compra a granel a través de las casas comerciales y se encuentra en el armario del fondo del pasillo justo debajo de la estufa (al lado del hidrogenador).
16. El material húmedo y limpio que se saca del lavavajillas se mete en estufa en las cestas correspondientes. Prestar especial atención al material de plástico o teflón que no se pueden meter en la estufa (embudos de decantación, tapones, etc)
17. El material seco de la estufa se recoge al día siguiente usando unos guantes especiales y una vez que el material ya no está caliente se guarda en los cajones y armarios correspondientes.