



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

INSTRUCCIÓN
TÉCNICA ESPECÍFICA

IE16-12-SOLI

PREPARACIÓN DE MUESTRAS
PARA RMN DE SÓLIDOS Y HRMAS

Página 1 de 17
Nº Revisión: 1
21/03/2025



**Centro de
Instrumentación
Científica**

PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA RMN DE SÓLIDOS Y HRMAS

 UNIVERSIDAD DE GRANADA	INSTRUCCIÓN TÉCNICA ESPECÍFICA	IE16-12-SOLI	Página 2 de 17 N° Revisión: 1 21/03/2025	 Centro de Instrumentación Científica
	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA RMN DE SÓLIDOS Y HRMAS			

INDICE

1. OBJETO

2. ALCANCE

3. DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA

4. DEFINICIONES

5. DESARROLLO

5.1. Introducción.

5.2. Rotores y accesorios

5.2.1. Para RMN de sólidos.

5.2.2. Para HRMAS.

5.2.3. Compra de rotors y accesorios

5.3. Preparación de la muestra para RMN de sólidos.

5.4. Preparación de la muestra para HRMAS.

5.4.1. Sistema 1

5.4.2. Sistema 2

5.4.3. Sistema 3

5.5. Limpieza de los rotors.

6. ANEXOS

6.1. Información adicional sobre preparación de muestras en RMN de sólidos

6.2. Información adicional sobre preparación de muestras en HRMAS

 UNIVERSIDAD DE GRANADA	INSTRUCCIÓN TÉCNICA ESPECÍFICA	IE16-12-SOLI	Página 3 de 17 N° Revisión: 1 21/03/2025	 Centro de Instrumentación Científica
	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA RMN DE SÓLIDOS Y HRMAS			

1. OBJETO.

Describir la metodología para preparar correctamente muestras que se analicen mediante Resonancia Magnética Nuclear de sólidos y HRMAS en el espectrómetro de 600 MHz Bruker Avance Neo.

2. ALCANCE.

Este procedimiento está dirigido a los usuarios de la Unidad de RMN del CIC.

3. DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA.

- Manual: Assembly Instructions for Disposable HRMAS insert
- Manual: Instruction Sheet for MAS Rotor 12ul and 50 ul
- Página web de Bruker

4. DEFINICIONES.

HRMAS	Combinación de técnicas de RMN en estado sólido y líquido que permite obtener espectros con una resolución similar a la de la espectroscopia en estado líquido pero sobre materiales semisólidos intactos y no manipulados.
MAS Rotor	Cilindro de material resistente, normalmente zirconia, que se utiliza para introducir la muestra en los experimentos de RMN de sólidos y HRMAS. Existen rotores con diferentes volúmenes y diámetros.
Acoplamiento dipolar	Interacción directa entre dos núcleos con espín distinto de cero. Son observables en estado sólido. La magnitud de este acoplamiento es proporcional a la tercera potencia inversa de la distancia entre los núcleos y al producto de sus relaciones giromagnéticas.
Acoplamiento cuadrupolar	Interacción directa entre dos núcleos con espín mayor a 1/2. Sólo se ven en estado sólido. Suelen ser una fuente de problemas y su resolución es difícil
Anisotropía	Propiedad general de la materia según la cual cualidades como elasticidad, temperatura, conductividad, velocidad de propagación de la luz, etc., varían según la dirección en que son examinadas. Algo anisótropo podrá presentar diferentes características según la dirección

5. DESARROLLO.

5.1. Introducción.

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de sólidos es una técnica no destructiva y una de las más potentes para llevar a cabo análisis cualitativos y cuantitativos de materiales sólidos por la gran variedad de

 UNIVERSIDAD DE GRANADA	INSTRUCCIÓN TÉCNICA ESPECÍFICA	IE16-12-SOLI	Página 4 de 17 N° Revisión: 1 21/03/2025	 Centro de Instrumentación Científica
	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA RMN DE SÓLIDOS Y HRMAS			

información que ofrece. Sin embargo, comparada con otras técnicas espectroscópicas, esta técnica se caracteriza por su baja sensibilidad, requiriendo grandes cantidades de muestra a analizar.

En RMN de sólidos, un sistema de espines nucleares en presencia de un campo magnético estático es capaz de absorber energía de radiofrecuencia (RF) cuando se irradia con una fuente de RF. Debido a la escasa movilidad de los átomos y moléculas, los espectros que se obtienen muestran señales anchas como consecuencia de las distintas orientaciones de spines en el espacio. Además, cada núcleo se ve afectado, dependiendo de la orientación relativa de la molécula, por su distribución electrónica, el campo magnético externo y por los campos creados en núcleos cercanos. Las principales interacciones responsables del ensanchamiento de las señales son la anisotropía del desplazamiento químico, los acoplamientos dipolares (homo y heteronucleares) y el acoplamiento cuadrupolar.

Por otro lado, para obtener espectros de RMN de alta resolución con muestras viscosas o semisólidas, se utiliza una sonda especial llamada HRMAS. Esta sonda es ideal para analizar la composición química de productos de alimentación (queso, chocolate y otras emulsiones), realizar el perfil metabólico de tejidos ex-vivo o extractos, estudiar polímeros viscosos de alto peso molecular, analizar ácidos grasos y grasas en semillas, etc.

Ambas técnicas se basan en girar la muestra en el ángulo mágico (MAS, Magic Angle Spinning) a gran velocidad (sobre 20000 y 5000 rpm para RMN de sólidos y HRMAS, respectivamente) para promediar a cero el mayor número de interacciones descritas anteriormente y mejorar así la resolución de los espectros de forma considerable. En el caso de la técnica de HRMAS, la resolución espectral es mejor que en RMN de sólidos y muy próxima a la de RMN de muestras líquidas.

La unidad de RMN del CIC desde 2020 dispone de una sonda para sólidos y otra sonda para HRMAS, ambas diseñadas para el espectrómetro de 600 MHz. Las sondas tienen la capacidad de inserción e expulsión automática de muestras.

5.2. Rotores y accesorios.

Un rotor para RMN de sólidos o HRMAS es un cilindro de material resistente, normalmente zirconia, que se utiliza para introducir la muestra. Son el equivalente al tubo de vidrio para RMN de líquidos. Existen rotores con diferentes volúmenes y diámetros tanto interno como externo.

5.2.1. Para RMN de sólidos.

Los rotores que se deben usar para la sonda de sólidos de la Unidad de RMN del CIC deben tener un diámetro exterior de 3,2 mm. Con este diámetro, Bruker ofrece tres rotores:

- Rotor regular o de volumen reducido cuya capacidad es de 30 µl aproximadamente (H12135)-
- Rotor regular con fondo grueso (HZ13706) y un volumen activo de 14 µl con el inserto HZ13618.
- Rotor delgado de 45 µl (HZ16916). El grosor de la pared de este rotor es menor al de los anteriores, por eso es el de mayor capacidad.

Dado que el rotor gira dentro de la sonda a gran velocidad, se debe cerrar herméticamente con un tapón a presión (cap) para que la muestra en polvo no se salga. El cap está disponible en tres materiales: Kel-F, zirconia y vespel o SP1. Adicionalmente también hay disponibles dos insertos de teflón (HZ13618 y B6628)

para reducir el volumen activo en los rotores regular. Si dispone de cantidades altas de muestra (por encima de 80 mg) puede usar el rotor delgado, en caso contrario, usar los rotores regular con y sin fondo grueso. Se aconseja comprar tapones de Vespel en lugar de los de Kel-F ya que soportan velocidades de rotación de hasta 24 kHz, el límite de la sonda.

La Unidad de RMN solo dispone de:

- Kit Rotor regular de zirconia y tres tapones Vespel (H12135)
- Kit Rotor delgado de zirconia y tres tapones Vespel (HZ16916)

Las referencias de los rotores, tapones e insertos son:

Rotor regular sin (H12135) y con fondo grueso (HZ13706)		
Tapón Zirconia	Tapón Kel-F	Tapón Vespel o SP1
HZ12372	HZ07308	HZ07306
Insertos de teflón		
B6628		HZ09243

Rotor delgado (HZ16916)		
Tapón Zirconia	Tapón Kel-F	Tapón Vespel o SP1
HZ16253	HZ16908	HZ16254

Para introducir la muestra en el rotor y poner/quitar el tapón a presión, se cuenta con varias herramientas:

HZ07608	3.2 mm filling tool	
HZ07607 (regular) HZ16911 (delgado)	3.2 mm sample packer	
HZ16621	3.2 mm cap set tool	
HZ16913	3.2 mm cap remover	

- Extractor/compactador de muestra: con la broca se puede extraer la muestra del rotor y con el otro extremo, compactarla. Las marcas rojas sirven para ajustar la altura de la muestra. Dado que el diámetro interno del rotor difiere entre los dos tipos de rotores, esta herramienta es distinta para cada tipo, HZ16911 y HZ07607 para rotor delgado y regular, respectivamente.
- Guillotina (HZ16913) para retirar el tapón a presión del rotor. Es única para todos los rotores de 3,2 mm.
- Herramienta de llenado (HZ07608): sirve como embudo para introducir la muestra en los dos tipos de rotores (regular y delgado). El otro extremo de la herramienta se puede utilizar para colocar el tapón a presión en el rotor. Lávelo después de su uso.
- Herramienta de colocación de cap (HZ16621): es muy parecida a la anterior y solo se utiliza para colocar el tapón a presión en ambos tipos de rotores. Se recomienda tener esta herramienta para que la herramienta anterior solo se utilice como embudo.

 UNIVERSIDAD DE GRANADA	INSTRUCCIÓN TÉCNICA ESPECÍFICA	IE16-12-SOLI	Página 6 de 17 N° Revisión: 1 21/03/2025	 Centro de Instrumentación Científica
	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA RMN DE SÓLIDOS Y HRMAS			

5.2.2. Para HRMAS.

La sonda de HRMAS de la Unidad de RMN del CIC usa rotores de 4 mm de diámetro. Los rotores de los que dispone la Unidad son de zirconia (ZrO_2) y de tres volúmenes diferentes: 100 μ l, 50 μ l y 12 μ l. La forma de introducir la muestra en los rotores difiere entre los dos últimos y el primero:

- Para los rotores de 50 μ l y 12 μ l, la muestra y el disolvente deuterado se introducen directamente en el rotor.
- En el rotor de mayor volumen se introduce un cilindro polimérico desechable, llamado contenedor de muestra, que alberga la muestra y el disolvente deuterado.

Dado que el rotor gira dentro de la sonda a gran velocidad, el sistema de cierre del rotor, al que llamaremos insert, es complejo y se compone de tres elementos: plug, tapón de rosca (screw cap) y tapón a presión (cap). Todos ellos están disponibles en varios materiales, y mientras que los tapones a presión son de apariencia iguales en todos los casos, los plugs y tapones de rosca difieren en tamaño y forma según el volumen del rotor y el sistema de cierre. La Unidad de RMN dispone de tapones de rosca y a presión fabricados en Kel-F y de plugs en teflón y Kel-F.

Con la combinación de plugs, tapones de rosca y el contenedor de muestra, se generan tres sistemas de insert. En la siguiente tabla se recogen las referencias disponibles en la Unidad de los rotores y elementos que componen el insert.

Sistema 1			
Rotor	Plug	Tapón de rosca	Contenedor muestra
Kit Rotor 50 μ l y cap Kel-F H144084 *	Teflón, B6879	B2309	No aplicable
	Kel-F, Z143842		
Kit Rotor 12 μ l y cap Kel-F H144082 *	Teflón, B6881	B2309	No aplicable
	Kel-F, Z143841		

Sistema 2		
Rotor	Plug y tapón de rosca	Contenedor muestra
Kit Rotor 12 μ l con cap Kel-F, plug 12 μ l Kel-F, tapón rosca y tornillo para colocar plug (HZ05537)		No aplicable
	Plug 12 μ l Kel-F, tornillo para colocar plug y tapón de rosca (H8548)	No aplicable
	Plug 50 μ l Teflón, tornillo para colocar plug y tapón de rosca (H11087)	No aplicable

Sistema 3			
Rotor	Plug	Tapón de rosca	Contenedor muestra
Kit Rotor 100 μ l y cap Kel-F H144083	B4698	B2309	B3809

* Los rotores del sistema 1 se pueden usar en el sistema 2

Para ensamblar/desensamblar todas las piezas de cierre del rotor e introducir la muestra, se cuenta con varias herramientas:

 UNIVERSIDAD DE GRANADA	INSTRUCCIÓN TÉCNICA ESPECÍFICA	IE16-12-SOLI	Página 7 de 17 N° Revisión: 1 21/03/2025	 Centro de Instrumentación Científica
	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA RMN DE SÓLIDOS Y HRMAS			



- Extractor de muestra y ajuste de la altura del plug (H148513): con la broca se puede extraer la muestra del rotor si esta queda incrustada al fondo y las marcas del otro extremo ayudan para fijar la profundidad del plug en el rotor para el sistema 2.
- Destornillador con punta roma (B5775) usado para colocar el plug en el contenedor de muestra para el sistema 3.
- Destornillador con extremo bifurcado (B1598) usado para coger el tapón de rosca.
- Guillotina (HZ05754) para retirar tapón a presión del rotor.
- Tornillo de colocación y extracción de plug (B6583) en el sistema 1.
- Tornillo de colocación y extracción de plug (91644) en el sistema 2.
- Herramienta de llenado (HZ3329): sirve como embudo para introducir la muestra en el rotor o contenedor. El otro extremo de la herramienta se puede utilizar para colocar el tapón a presión en el rotor.
- Herramienta de colocación de cap (H148486): es muy parecido al anterior y solo se utiliza para colocar el tapón a presión en el rotor. Se recomienda tener esta herramienta para que la herramienta anterior solo se utilice como embudo.

5.2.3. Compra de rotores y accesorios.

Es posible comprar los rotores, herramientas y resto de accesorios en varias web. Se recomiendan dos:

- <https://cortecnet.com/>
- <https://store.bruker.com/en-ES/>

Asegúrese de que las referencias de lo que compra son las mismas que aparecen en este documento. Si tiene alguna duda sobre qué debe comprar, consulte a los técnicos de la Unidad de RMN y a Filippo Mignogna, especialista de ventas Bruker España (filippo.mignogna@bruker.com).

 UNIVERSIDAD DE GRANADA	INSTRUCCIÓN TÉCNICA ESPECÍFICA	IE16-12-SOLI	Página 8 de 17 N° Revisión: 1 21/03/2025	 Centro de Instrumentación Científica
	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA RMN DE SÓLIDOS Y HRMAS			

5.3. Preparación de la muestra para RMN de sólidos.

La premisa más importante a la hora de preparar un rotor es que la muestra siempre debe ocupar todo el volumen activo del mismo. Siga las siguientes instrucciones (recomendable usar guantes sin polvo):

- Molture la muestra a ser posible en un mortero de agata hasta obtener un polvo fino y homogéneo. Es muy útil conocer la densidad aproximada del sólido para calcular la cantidad de muestra necesaria. También hay que tener en cuenta que en el proceso de molienda se pierde una pequeña cantidad de muestra. Por ejemplo, si se tiene glucosa cuya densidad aproximada es 1,6 mg/ μ l para un rotor de 30 μ l se necesita aproximadamente entre 48-55 mg. La densidad de los sólidos moleculares está comprendida entre 1,2 y 1,8 mg/ μ l.
- Añade muestra en polvo poco a poco con ayuda de la herramienta de llenado (HZ07608) y una espátula. A medida que va añadiendo muestra, compáctela con la herramienta para tal fin (HZ07607 o HZ16911). Es muy importante compactarla; si no se hace el rotor puede no estar equilibrado y causar daños en la sonda al rotar a gran velocidad o que no directamente no rote.
- Si dispone de centrífuga, introduce el rotor en un eppendorf y centrifúgalo durante unos segundos a no más de 8000 rpm. No olvide equilibrar la balanza.
- Alterne la introducción de muestra y compactación con etapas de centrifugación.
- Asegúrese con las marcas rojas de la herramienta para compactar, que la altura de la muestra es la correcta.
- Opcionalmente, solo para los rotores regular, puede colocar un inserto por encima de la muestra para reducir el volumen activo del rotor.
- Por último, introduce el tapón a presión en la herramienta de colocación del cap (HZ16621) con la parte estriada del tapón hacia dentro y a continuación, introduce el rotor. Apriete suavemente el rotor contra la mesa hasta que notes como encaja el tapón. Si en su lugar utiliza la herramienta de llenado (HZ07608) para esta operación, asegúrese de que esté limpia y sin restos de muestra.

Para más información sobre como preparar muestras sólidas, ir a ANEXOS.

5.4. Preparación de la muestra para HRMAS.

Como ya se ha comentado, hay tres sistemas para preparar la muestra. Veremos cada uno en detalle. Se recomienda siempre usar guantes sin polvo.

5.4.1. Sistema 1.

Es el sistema que requiere el uso de menos herramientas. Se utiliza para los rotores de 12 μ l y 50 μ l. y requiere el uso de los plugs que se acoplan a la herramienta B6583. El procedimiento para preparar la muestra es el siguiente:

- Ayudándose de la herramienta de llenado (HZ3329) y la herramienta H148513, introduce la muestra en el rotor. Si fuera necesario, centrifuga el rotor durante unos segundos introduciéndolo en un eppendorf a no más de 3000 rpm. Procura equilibrar la balanza con otros tres eppendorf llenos de aproximadamente 750 μ l de agua.

 UNIVERSIDAD DE GRANADA	INSTRUCCIÓN TÉCNICA ESPECÍFICA	IE16-12-SOLI	Página 9 de 17 N° Revisión: 1 21/03/2025	 Centro de Instrumentación Científica
	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA RMN DE SÓLIDOS Y HRMAS			

- Añade la cantidad de disolvente deuterado adecuado y vuelve a centrifugar si quedan gotitas de disolvente en las paredes. Esto puede ocurrir con el agua deuterada. Limpie las herramientas HZ3329 y H148513.
- Enrosca el plug en el extremo adecuado del tornillo B6583 e introdúcelo en el rotor. Una vez colocado, desenróscalo. Es conveniente que el espacio entre el fondo del rotor y el plug esté completamente lleno de muestra y disolvente. La mejor forma de saberlo es ver si sale disolvente a través del pequeño orificio del plug. Si esto ocurre, limpie el disolvente sobrante que hay por encima del plug.
- Coloca el tapón de rosca B2309 con el destornillador de extremo bifurcado. Este tapón tiene dos agujeros en la cabeza donde “pinchar” el destornillador. No apretar demasiado al enroscar.
- Por último, introduce el tapón a presión con la parte estriada hacia dentro en la herramienta de colocación del cap y a continuación, introduce el rotor. Aprieta el rotor contra la mesa hasta que notes como encaja el tapón.

Para más información sobre como usar este sistema, ir a ANEXOS. En las imágenes siguientes se muestran todos los elementos necesarios para preparar la muestra con este sistema.



5.4.2. Sistema 2.

Este sistema se diferencia del anterior en el diseño de los tapones de rosca y plugs que se enroscan en el tornillo 91644. Al igual que en el caso anterior, este sistema es aplicable a los rotores de 12 µl y 50 µl. El procedimiento para introducir la muestra es:

 UNIVERSIDAD DE GRANADA	INSTRUCCIÓN TÉCNICA ESPECÍFICA	IE16-12-SOLI	Página 10 de 17 N° Revisión: 1 21/03/2025	 Centro de Instrumentación Científica
	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA RMN DE SÓLIDOS Y HRMAS			

- Ayudándote de la herramienta de llenado (HZ3329) y la herramienta H148513, introduce la muestra en el rotor. Si fuera necesario, centrifuga el rotor durante unos segundos introduciéndolo en un eppendorf a no más de 3000 rpm. Procura equilibrar la balanza con otros tres eppendorf llenos de aproximadamente 750 µl de agua.
- Añade la cantidad de disolvente deuterado adecuado y vuelve a centrifugar si quedan gotitas de disolvente en las paredes. Esto puede ocurrir con el agua deuterada. Limpie las herramientas HZ3329 y H148513.
- Enrosca el plug en el tornillo 91644 e introdúcelo en el rotor. Después ajusta la profundidad a la que colocarlo ayudándote de las marcas rojas de la herramienta H148513. Es conveniente que el espacio entre el fondo del rotor y el plug esté completamente lleno de muestra y disolvente. La mejor forma de saberlo es observar si sale disolvente a través del pequeño orificio del plug. Si esto ocurre, limpie el disolvente sobrante que hay por encima del plug.
- Coloca el tapón de rosca con el destornillador de extremo bifurcado. Este tapón se encuentra en la misma caja donde está el tornillo 91644 y, a diferencia del tapón usado en el sistema 1, tiene una pequeña raja en lugar de agujeros. No apretar demasiado al enroscar.
- Por último, introduce el tapón a presión con la parte estriada hacia dentro en la herramienta de colocación del cap y a continuación, introduce el rotor. Aprieta el rotor contra la mesa hasta que notes como encaja el tapón.

En la imagen siguiente se muestran todos los elementos necesarios para preparar la muestra con este sistema.



5.4.3. Sistema 3.

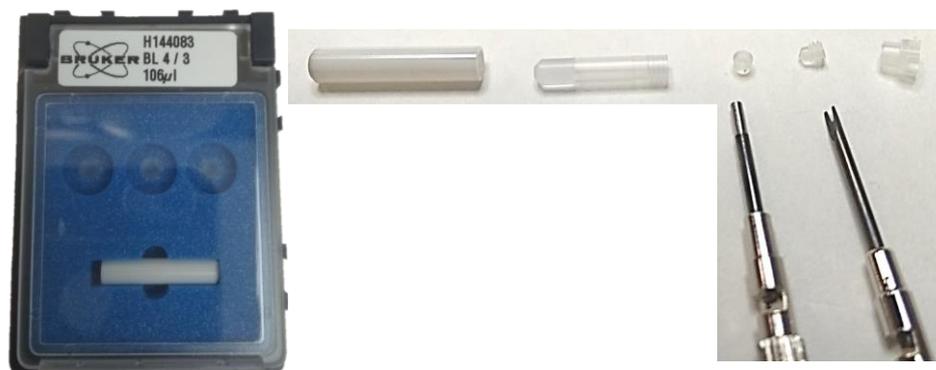
Este sistema es el que más elementos usa y solo es aplicable para el rotor de 100 µl. Su principal característica es que usa el contenedor de muestra y un plug no enroscable, por lo es casi imposible retirarlo cuando se procede a desmontarlo. El procedimiento para preparar la muestra es:

- Con ayuda de la herramienta H148513, introduce la muestra en el contenedor de muestra. Si fuera necesario, centrifúgalo durante unos segundos metiéndolo en un eppendorf a no más de 3000 rpm. Procura equilibrar la balanza con otros tres eppendorf llenos de aproximadamente 750 µl de agua. En el caso de que la muestra sea un tejido, Bruker proporciona herramientas específicas para esta etapa (ver ANEXOS).

 UNIVERSIDAD DE GRANADA	INSTRUCCIÓN TÉCNICA ESPECÍFICA	IE16-12-SOLI	Página 11 de 17 N° Revisión: 1 21/03/2025	 Centro de Instrumentación Científica
	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA RMN DE SÓLIDOS Y HRMAS			

- Añade la cantidad adecuada de disolvente deuterado y vuelve a centrifugar si quedan gotitas de disolvente en las paredes. Esto puede ocurrir con el agua deuterada. Limpie la herramienta H148513.
- Coloca el plug con el destornillador de punta roma. Aplica la fuerza adecuada para no expandir la pared del contenedor ya que si esto ocurre, este no encajará dentro del rotor.
- Limpia cualquier resto de líquido o muestra que esté por encima del plug.
- Coloca el tapón de rosca con el destornillador de extremo bifurcado. Este tapón es el mismo que se utiliza en el sistema 1. No apretar demasiado al enroscar ya que puede deformar las paredes del contenedor.
- Introduce el contenedor de muestra en el rotor.
- Por último, introduce el tapón a presión con la parte estriada hacia dentro en la herramienta de colocación del cap y a continuación, introduce el rotor. Aprieta el rotor contra la mesa hasta que notes como encaja el tapón.

Para más información sobre como usar este sistema, ver ANEXOS. En la imagen inferior se muestran todos los elementos necesarios para preparar la muestra con este sistema.



5.5. Limpieza de los rotores.

Siempre que se vaya a manipular los rotores se recomienda usar guantes sin polvo.

Para limpiar los rotores de 3,2 mm:

- Con la parte de la broca del extractor/compactador de muestra (HZ16911 o HZ07607), “taladre” el interior del rotor a mano y en el sentido de las agujas del reloj para retirar poco a poco la muestra.
- Para eliminar el polvo que pueda quedar en el rotor, introdúcelo en un eppendorf boca abajo y centrifúgelo. Procura equilibrar la balanza con otros tres eppendorf llenos de aproximadamente 700 µl de agua.
- Lava el interior del rotor con agua mili-Q o el disolvente más adecuado y a continuación, con metanol. Para asegurar que no queda líquido ni restos de muestra en el interior, pasa una corriente de aire o nitrógeno a presión por el interior del rotor.

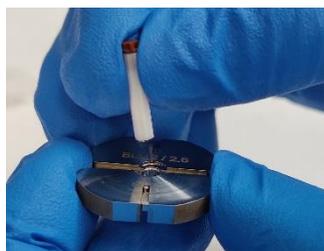
 UNIVERSIDAD DE GRANADA	INSTRUCCIÓN TÉCNICA ESPECÍFICA	IE16-12-SOLI	Página 12 de 17 N° Revisión: 1 21/03/2025	 Centro de Instrumentación Científica
	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA RMN DE SÓLIDOS Y HRMAS			

- Por último, lava con agua mili-Q o el disolvente más adecuado el tapón a presión (cap) colocándolo sobre papel adsorbente o dentro de un eppendorf.

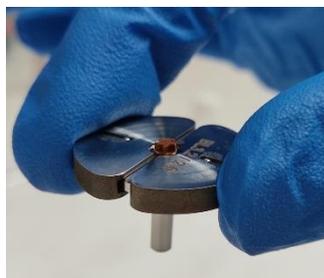
Y para limpiar los rotores de HRMAS, siga los siguientes pasos:

- Retira el tapón a presión con ayuda de la guillotina. Con cuidado, colocar la guillotina en la muesca entre el tapón y el rotor, apretarla con una mano y con la otra tirar del rotor.
- Con el destornillador con extremo bifurcado, retira el tornillo de rosca.
- Usa el tornillo B6583 y el tornillo 91644 para quitar el plug del sistema 1 y 2, respectivamente.
- Dado que el sistema 3 está diseñado para desecharlo después de su uso, quitar el plug con el destornillador con punta roma es tarea complicada.
- Introduce los tapones y el plug en un eppendorf para lavarlos con agua mili-Q o el disolvente más adecuado y a continuación, con metanol.
- En otro eppendorf, coloca el rotor o el contenedor de muestra, si has conseguido reciclarlo, boca abajo e introdúcelo en la centrífuga. Procura equilibrar la balanza con otros tres eppendorf llenos de aproximadamente 750 μ l de agua. Si la muestra está muy apelmazada, utilice previamente la broca de la herramienta de extracción de muestra.
- Por último, lava el interior del rotor con agua mili-Q o el disolvente más adecuado y a continuación, con metanol. Para asegurar que no queda líquido ni restos de muestra en el interior, pasa una corriente de aire o nitrógeno a presión por el interior del rotor y/o del contenedor de muestra.

La forma correcta de usar la guillotina, independientemente del tipo de rotor, se muestra en las siguientes imágenes.



- Coger el rotor por la parte del tapón.
- Con la otra mano, abrir la guillotina e introducir el rotor desde arriba.
- Deslizar el rotor suavemente por el orificio de la guillotina.
- Las aspas del tapón nunca debe llegar a tocar la herramienta.



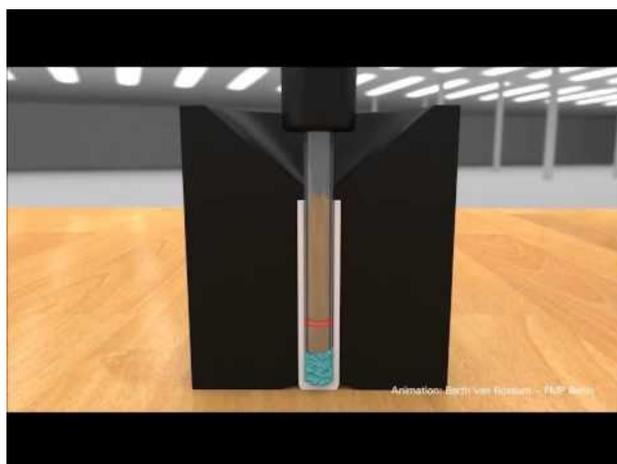
- Una vez colocado el rotor en la posición correcta, apretar fuertemente con una mano la guillotina mientras que con la otra tiras del rotor.

 UNIVERSIDAD DE GRANADA	INSTRUCCIÓN TÉCNICA ESPECÍFICA	IE16-12-SOLI	Página 13 de 17 N° Revisión: 1 21/03/2025	 Centro de Instrumentación Científica
	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA RMN DE SÓLIDOS Y HRMAS			

6. ANEXOS.

6.1. Información adicional sobre preparación de muestras en RMN de sólidos.

- Video preparación de la muestra.



6.2. Información adicional sobre preparación de muestras en HRMAS.

- Video preparación de la muestra (sistema 1).



Preparación de la muestra_Sistema 1.n

<https://www.picuki.com/media/2252241467918108350>

- Videos preparación de la muestra (todos los sistemas).

Para visualizar estos videos es necesario estar registrado en bruker.com

<https://www.bruker.com/service/information-communication/bruker-academy-videos.html>

- Enlace web sobre preparación de muestras.

<http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/preparation/preparation.html#solid>

 UNIVERSIDAD DE GRANADA	INSTRUCCIÓN TÉCNICA ESPECÍFICA	IE16-12-SOLI	Página 14 de 17 N° Revisión: 1 21/03/2025	 Centro de Instrumentación Científica
	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA RMN DE SÓLIDOS Y HRMAS			

- Muestreo de tejido para sistema 3

Tissue Sampling for Disposable Bruker HRMAS Insert

Tissue sampling for HRMAS insert require special tools and skills due to its relatively small size. At room temperature, most tissues have semi-solid consistency which is not ideal for efficient sampling. Moreover, tissues degrade rapidly at ambient temperature. For best results, sample tissues when it has a rigid consistency. For most tissues (e.g., liver, kidney, brain, muscle, etc), this is achieved by freezing the tissue below -20 °C. Maintaining the temperature of the tissues below -20 °C during sample manipulations also helps to reduce the amount of sample degradation. The sampling/cutting operations on the frozen tissues are ideally performed in a cold room or on a cold block (< -20 °C) to prevent rapid thawing of the sample.

The disposable biopsy punches, dermal curettes, and scalpels are very useful for sampling and transferring tissues into HRMAS inserts. The disposable nature of these tools enables the processing of large numbers of samples without cross contamination. Biopsy punches are useful for reliable, fast, and efficient sampling of frozen tissues. The 2 mm biopsy punches were found to be ideal to use with Bruker HRMAS inserts. The 1.5 mm biopsy punches are useful to obtain smaller volumes of tissues. Curettes are useful when a thin slice of sample (0.5 – 2 mm) is required from the surface of a tissue (useful for investigating multi-compartmental organs such as kidney, eye, etc.). A scalpel is generally useful to cut tissues any desirable sizes. It may be particularly useful in cutting tough tissues such as tendons and ligaments.

Tools and consumables:

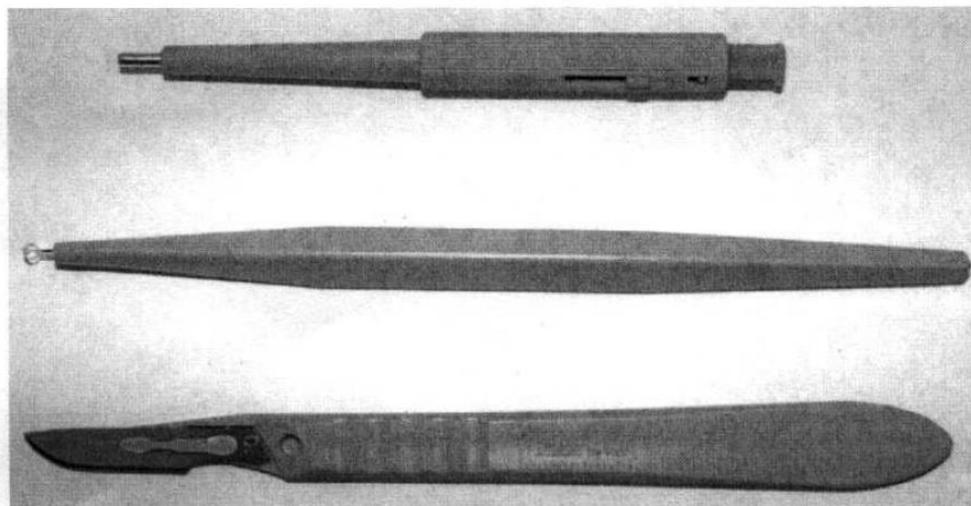
HRMAS insert assembly (Part Nos. B3793, 4493, 4494, 4495, 4496)

Disposable Biopsy punches - 3 mm (Part # 93384)
 2 mm (Part # 93383)
 1.5 mm (Part # 93385)

Disposable Curette (Part # 93414)

Disposable Scalpels (Part # 93386)

Note: The disposable biopsy punches, curettes, and scalpels supplied by Bruker are not intended for human use.



Biopsy punch
93383

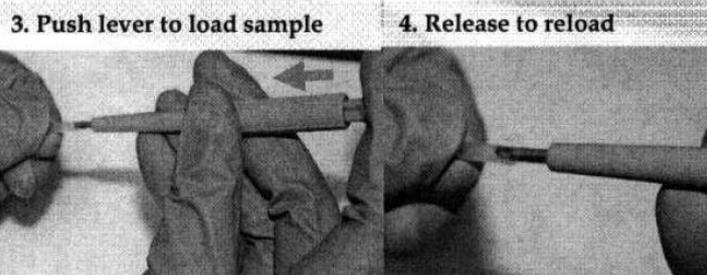
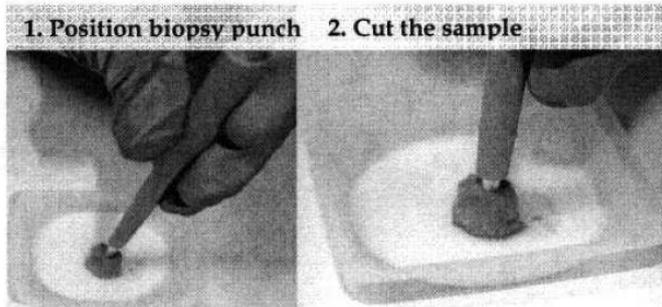
Curette
93414

Scalpel
93386

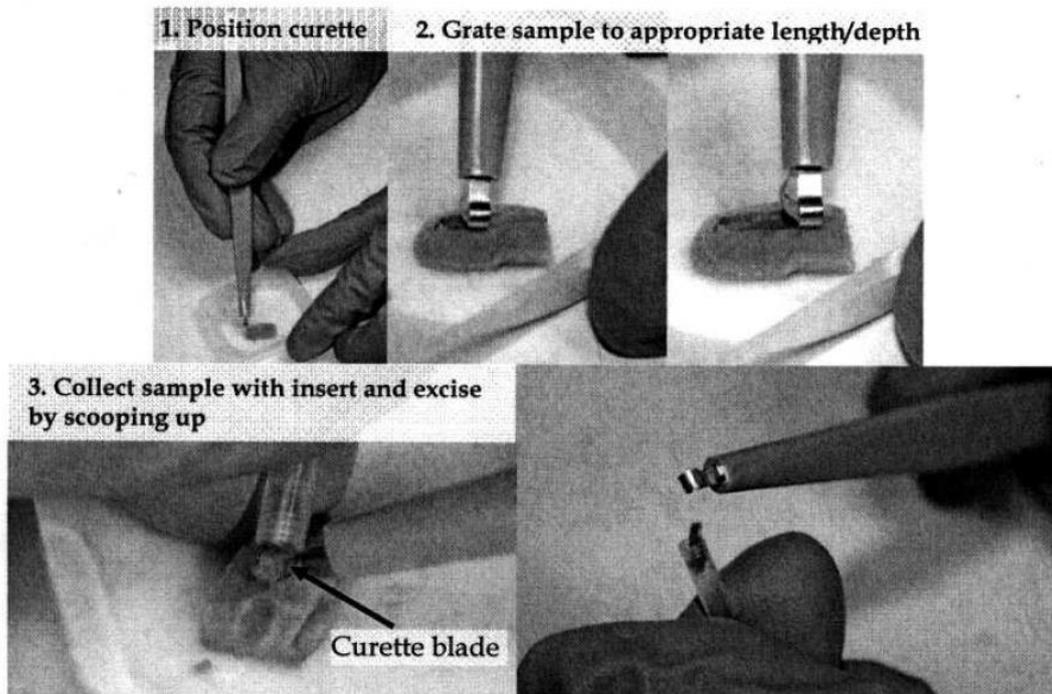


Procedure:

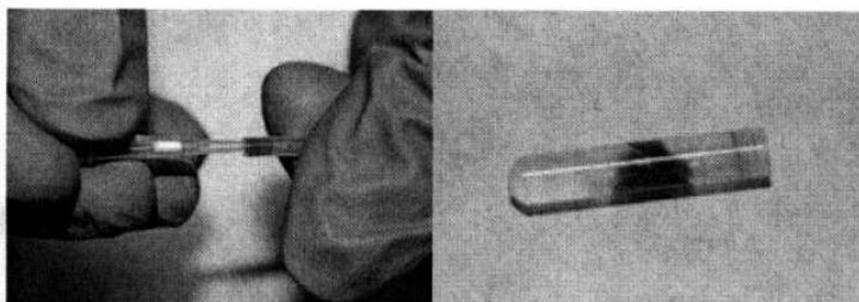
1. Add required amount of buffer into the HRMAS insert (5-15 μL). Weigh the HRMAS insert, insert plug, and plug restraining screw together to get the weight of the fully assembled insert without the sample (important for quantitative studies). Due to the small size of the insert, use of a weighing balance with a precision of at least ± 0.1 mg is recommended in order to obtain quantitative results with good precision. When working with biohazardous samples, weighing the inserts in a clean, labeled, 0.65 mL microcentrifuge may reduce the possibility of contaminating the weighing balance.
2. To perform tissue sampling (to be performed in a cold room or on a cold block):
 - a. Place a clean plastic weighing boat on cold block.
 - b. Place the frozen tissue (small piece may be excised from a larger piece using a disposable scalpel) on the weighing boat.
 - c. When using a Biopsy punch: Push the cylindrical blade of the biopsy punch into the tissue area where you wish to sample. Hold the sample and make a circular motion (at 15-30° angle from the line of initial biopsy incision) to cut the sample from the bulk.



- d. When using a Curette: Push the curette ring in to the tissue to desired thickness and gently grate the frozen tissue. Collect the excised tissue emerging out of the curette ring with the HRMAS insert. When desired length of tissue is cut, excise the sample by moving the curette upward (scooping motion).



- e. *When using a Scalpel:* Cut the tissue sample to a dimension that would fit into the insert using a scalpel.
3. Load the sample into the insert. If you need more sample, repeat steps 1 and 2. However, it is important to minimize the number of sample cutting manipulations when filling the insert. This reduces the amount of tissue-degrading enzymes that are released from the ruptured cells. Use a toothpick, pin or pipette tip to push the sample inside the insert or put the insert into a microcentrifuge tube and spin it for 10 s at 1000g in a centrifuge.



4. Close the insert with the insert plug (see HRMAS insert assembly instructions). Wipe any excess liquid with a Kimwipe and put the plug restraining screw. The exterior of the insert may be wiped with ethanol for decontamination. If this decontamination procedure is used, be sure to fully dry the exterior. Note: Optimizing the amount of buffer and sample added into the insert will help in reduction of liquid loss when closing the insert. Liquid loss in this step will lead to underestimation of the actual sample weight.

 UNIVERSIDAD DE GRANADA	INSTRUCCIÓN TÉCNICA ESPECÍFICA	IE16-12-SOLI	Página 17 de 17 N° Revisión: 1 21/03/2025	 Centro de Instrumentación Científica
	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA RMN DE SÓLIDOS Y HRMAS			

Put the insert in the labeled microcentrifuge tube and reweigh the insert to obtain sample weight.

Assign a slot for the insert in the Bruker 96-slot HRMAS insert storage rack (P/N B5771) for efficient tracking of the sample. Store the samples in the rack at -80 °C until data collection. The Bruker 96-slot HRMAS insert storage rack is designed to reduce any insert deformations due to water expansion during freezing.

