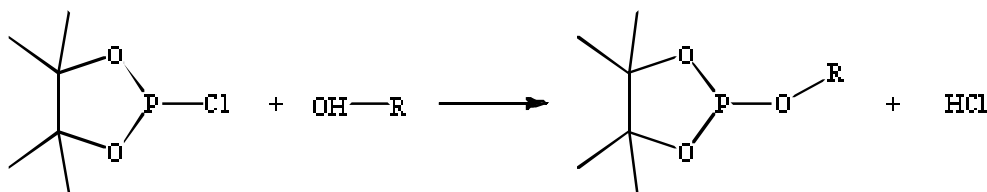


## Tecnica analitica: Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare $^{31}\text{P}$ -NMR

**Campionamento e tipo di analisi:** tecnica adatta alla determinazione qualitativa e quantitativa di classi di composti organici da bassa ad alta polarità, in campioni liquidi o solidi (10-20 mg). A seconda degli analiti di interesse possono essere necessari diversi stadi di estrazione e purificazione. Analisi distruttiva.

**Principio di funzionamento:** il campione da analizzare (10-20 mg) viene solubilizzato in un adatto solvente deuterato ( $\text{CDCl}_3$  in miscela con piridina in rapporto a seconda della polarità del campione). Alla soluzione ottenuta si aggiungono Cromo(III) acetilacetonato per diminuire i tempi di rilassamento e N-OH naftalimmide come standard interno. Alla fine si aggiunge 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3-diossafosfolano e la soluzione viene posta in un tubo NMR. Il reagente reagisce con i gruppi nucleofili contenenti protoni labili come alcoli, fenoli, acidi carbossilici.



Dopo analisi al  $^{31}\text{P}$ -NMR si ottiene lo spettro del campione derivatizzato. La tecnica permette di ottenere informazione relative alla presenza di particolari gruppi funzionali contenenti -OH. L'assenza di tecniche separative prima dell'analisi non permette il riconoscimento di singole molecole, se non in presenza di assorbimenti tipici e caratteristici, ma consente di determinare con grande dettaglio la tipologia delle classi di composti presenti nel campione, essendo il chemical shift dell'atomo di fosforo altamente sensibile all'intorno chimico dell'atomo a cui si è legato.

**Procedura analitica adottata per i campioni di unguenti antichi:** il campione (20-30 mg) viene sottoposto a estrazione a caldo per 2 ore con una miscela cloroformio-metanolo in rapporto 2:1, e successivamente filtrato con filtro in vetro sinterizzato. La fase organica ottenuto viene poi sottoposta ad una separazione con imbuto separatore raccogliendo una frazione apolare in esano e una frazione polare in etanolo-acqua 70:30. Le diverse fasi vengono portate a secchezza a bassa pressione e conservate al buio e a  $4^\circ\text{C}$  per le analisi NMR.

**Strumentazione e condizioni sperimentali adottate:** gli spettri  $^{31}\text{P}$  NMR sono stati acquisiti a 298 K con un Bruker Avance 500. Il numero totale di scansioni per ogni esperimento è stato di 1024 acquisizioni, con un tempo di acquisizione di 0.9 s e un tempo di delay di 5 s. Le quantificazioni dei gruppi funzionali vengono ottenute tramite integrazione dei picchi normalizzate sullo standard interno presente in quantità nota e espresse in mmol/g.

**Informazioni ottenibili:** la tecnica permette di ottenere informazioni relative principalmente ai gruppi -OH. In funzione del chemical shift si possono riconoscere alcoli primari, secondari, acilgliceroli, fenoli e acidi carbossilici. L'analisi risulta estremamente utile nella caratterizzazione di lipidi quali di e mono acilgliceroli, cere e resine terpeniche. Infatti i gruppi ossidrilici degli 1,2-diacilgliceroli, 1,3-diacilgliceroli, 1-monoacilgliceroli, 3-monoacilgliceroli (sempre presenti in miscele trigliceriche soprattutto in campioni antichi) presentano picchi ben risolti e distinguibili. Inoltre anche alcoli primari, secondari, dioli e  $\alpha$ -alcoli sono facilmente visibili e possono essere assegnati in maniera univoca alla presenza di cere. Nella zona degli acidi carbossilici sono individuabili gli acidi grassi (derivanti da idrolisi di cere e trigliceridi) e acidi resinici (associabili a resine pinacee). L'integrazione dei picchi in presenza di internal standard permette la quantificazione dei vari gruppi funzionali. L'analisi è distruttiva e necessita l'uso di quantità non indifferenti di campione (10-20 mg) rispetto ad altre tipologie di analisi (GC-MS). Il vantaggio principale risiede nell'assenza di pretrattamento (ad esempio idrolisi).

**Esempio di analisi:** spettro  $^{31}\text{P}$ -NMR della frazione apolare dopo estrazione dell'unguento Aboca 50023.

