

## Tecnica analitica: **Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare $^1\text{H}$ -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 stadi di estrazione e purificazione. Analisi non distruttiva.

**Principio di funzionamento:** il campione (10-20 mg) viene solubilizzato in un adatto solvente deuterato ( $\text{CDCl}_3$  per composti apolari,  $\text{CD}_3\text{OD}$  per composti polari, circa 1 mL) e posto in un tubo NMR. La soluzione viene poi analizzata ottenendo lo spettro NMR del protone. La tecnica permette di ottenere informazione relative alla presenza di determinati gruppi funzionali, in particolare per gruppi contenenti legami C-H. 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.

**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 ottenuta 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 in rotavapor e conservate al buio e a  $4^\circ\text{C}$  per le analisi NMR.

**Strumentazione e condizioni sperimentali adottate:** circa 10-20 mg di campione pesati precisamente sono stati sciolti in 750  $\mu\text{l}$  di solvente deuterato. Gli spettri NMR sono stati acquisiti a 298 K con un spettrometro Bruker-300. Il numero totale di scansioni per ogni esperimento è stato di 64 acquisizioni, con un tempo di acquisizione di 1.6 s.. Per eseguire quantificazioni, prima dell'analisi una adeguata quantità di internal standard (benzene) viene aggiunta alla soluzione.

**Informazioni ottenibili:** la tecnica permette di ottenere informazioni relative principalmente alla struttura carboniosa del campione, attraverso l'analisi spettrale dei protoni contenuti nei composti. In particolare sono facilmente individuabili strutture chimiche quali:

-aldeidi: campi bassi, chemical shift 9-10 ppm.

-strutture aromatiche: campi bassi, chemical shift 8-6 ppm; in particolare dalla struttura fine di accoppiamento sono osservabili le differenti posizioni dei sostituenti presenti sull'anello.

-doppi legami semplice e coniugati: 6-5 ppm. Di particolare interesse per i lipidi.

-alcoli: 5-3 ppm, sono osservabili i protoni legati ad un carbonio portatore di gruppi idrossilici.

-chetoni: 2.5 ppm, di interesse per campioni particolarmente degradati.

-idrocarburi alchilici: 3-1 ppm, catene con carboni metilenici e metilici.

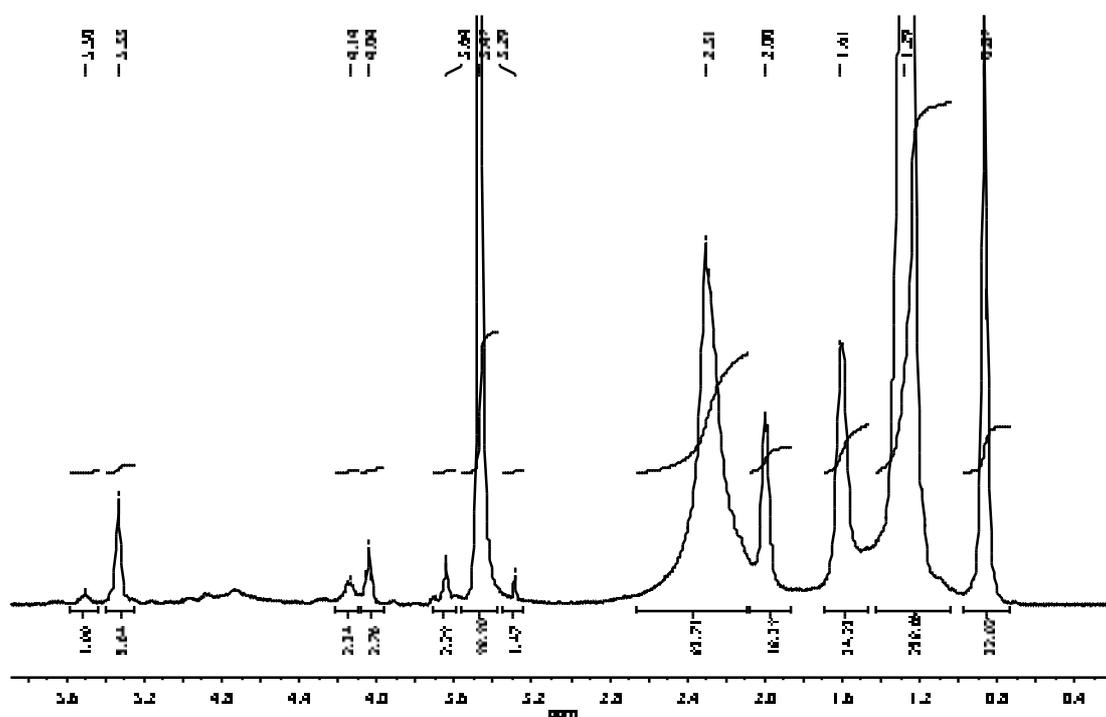
I differenti gruppi funzionali possono essere quantificati inoltre tramite integrazione dei picchi corrispondenti.

Queste strutture sono particolarmente caratteristiche per i componenti lipidici degli unguenti, in particolare nella frazione apolare gli spettri  $^1\text{H-NMR}$  permettono facilmente di individuare la presenza di trigliceridi, cere e terpeni di tipo resinico.

Per quanto riguarda la frazione polare, spesso estremamente complessa, e' possibile riconoscere le principali classi di composti chimici presenti e, tramite confronto con biblioteche utilizzando tecniche di analisi multivariata, ricostruire la composizione del campione.

L'analisi non e' distruttiva ma necessita comunque l'uso di quantita' non indifferenti di campione (10-20 mg) rispetto ad altre tipologie di analisi (GC-MS). Il vantaggio principale risiede nell'assenza di pretrattamento del campione (ad esempio idrolisi).

**Esempio di analisi:** spettro  $^1\text{H-NMR}$  della frazione polare del campione di unguento Aboca 50023.



$^1\text{H-NMR}$  frazione apolare unguento 50023