

PIANO Lauree Scientifiche (CHIMICA)

Università degli Studi di Napoli Federico II

OLEOCHIMICA: UTILIZZO DI MATERIE PRIME RINNOVABILI

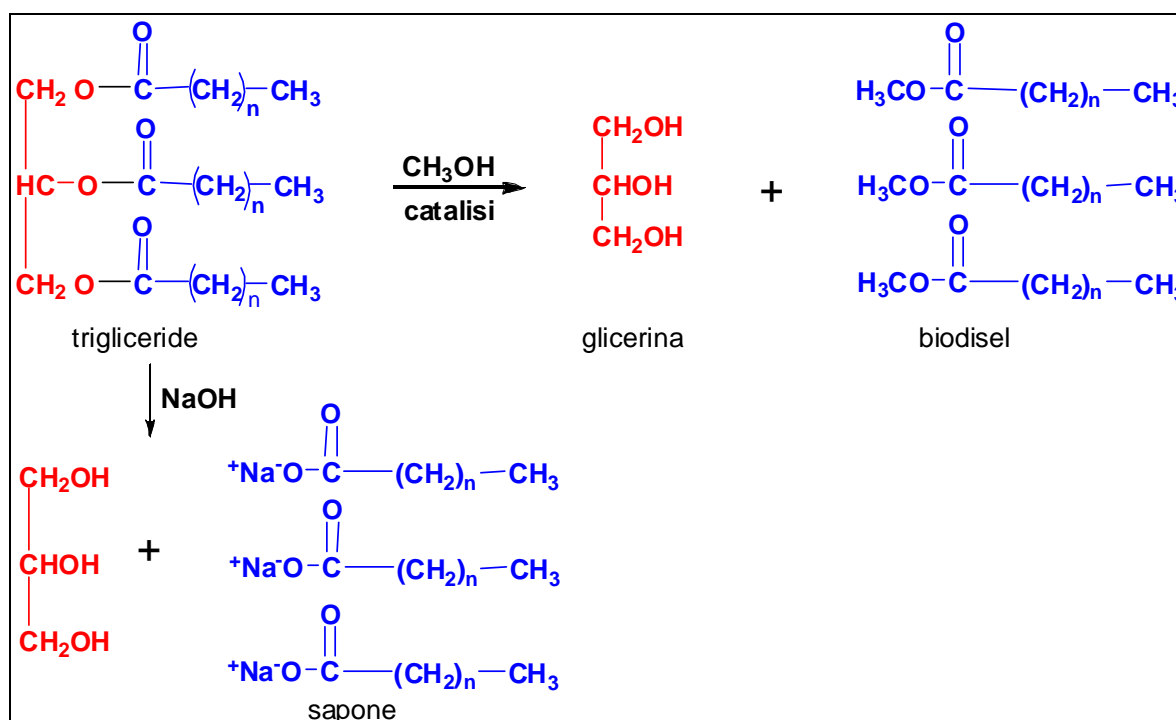
PREMESSA

In questo percorso sono state proposte esperienze basate sulla reattività degli esteri, argomento che rientra nella chimica organica, e quindi successivo ad un programma di chimica di base. Allo scopo di evidenziare come la chimica sia stata ed ancora sia uno strumento fondamentale per lo sviluppo e come sia in continua evoluzione sono state proposte esperienze che prevedono l'uso di oli vegetali, anche di scarto, e l'uso di apparecchiature strumentali non disponibili presso le scuole e reperibili presso i laboratori universitari. Prerequisito è la conoscenza dei gruppi funzionali, della funzione esterea, della reazione di esterificazione, della reazione di idrolisi degli esteri. Il percorso prevede:

Esperienza n. 1-Produzione di biodiesel da oli vegetali puri ed esausti:

- Titolazione degli acidi grassi liberi presenti in un olio
- Reazione di transesterificazione
- Uso dell'NMR e della gas-cromatografia per la verifica della reazione e caratterizzazione del biodiesel preparato

Esperienza n. 2-Produzione di sapone da oli esausti



OBIETTIVI

Conoscere e applicare alcune reazioni degli esteri

Utilizzare un'apparecchiatura chimica e seguire semplici reazioni organiche

Conoscere il ruolo delle analisi strumentali

Conoscere alcuni principi della Green Chemistry

Il tema che lega le esperienze di cui si compone questo percorso è l'utilizzo di materie prime rinnovabili in accordo con alcuni principi della green chemistry. In particolare si dimostra come un rifiuto (olio di frittura esausto) possa costituire una materia prima per la produzione di biocarburanti (Laboratorio di approfondimento - **Esperienza n. 1- Produzione di biodiesel da oli vegetali puri ed esausti**) o di prodotti per la detergenza (Laboratorio di approfondimento-**Esperienza n. 2 – Produzione di sapone da oli esausti**).

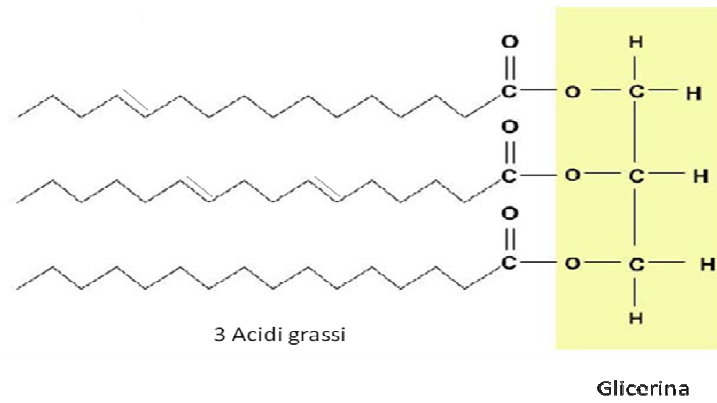
Per le due esperienze è stata preparata anche una breve introduzione teorica che i docenti possono utilizzare come base di partenza per la presentazione dell'argomento (**Materiale didattico di supporto**).

Le esperienze sono state preparate con due livelli di elaborazione/verifica dei risultati, che le diverse scuole possono adottare in relazione al livello di conoscenza degli allievi e della disponibilità delle tecniche analitiche. Le due esperienze infatti possono essere condotte utilizzando strumentazione ordinaria di laboratorio in quanto la verifica dell'avvenuta reazione si ottiene per il sapone osservando la trasformazione dello stato fisico (da liquido a solido) e per il biodiesel osservando la forte variazione di viscosità tra l'olio di partenza e il biodiesel prodotto (cfr. Schede di laboratorio). La produzione di biodiesel può essere seguita e verificata mediante l'uso del NMR e della gas-cromatografia. I cromatogrammi e gli spettri protonici dei biodiesel preparati sono inseriti nella scheda. Questa parte ha lo scopo non solo di evidenziare l'importanza delle tecniche analitiche ma anche di avvicinare gli studenti ai laboratori di ricerca.

MATERIALE DIDATTICO DI SUPPORTO

I Trigliceridi

I trigliceridi si trovano sia nel mondo vegetale che animale e sono sostanze insolubili in acqua costituite da esteri della glicerina (1,2,3-propantriolo) e di miscele di acidi grassi:



Gli acidi grassi possono essere sia saturi che insaturi e sono generalmente formati da catene lineari con un numero pari di atomi di carbonio (da C4 fino a C26). I saturi più abbondanti sono l'**acido palmitico** (C16) e l'**acido stearico** (C18), mentre gli insaturi più importanti sono l'**acido oleico** (C18:1), l'**acido linoleico** (C18:2) e l'**acido linolenico** (C18:3). In Tabella 1 sono riportati i nomi comuni e le formule di struttura per i più abbondanti di essi. Il numero di carboni di un acido grasso e quello dei doppi legami carbonio-carbonio presenti nella sua catena idrocarburica vengono indicati da due numeri separati da due punti.

Tabella 1. Gli acidi grassi più abbondanti presenti nei grassi animali, negli oli vegetali e nelle membrane biologiche.

Atomi di carbonio/ Doppi legami*	Struttura	Nome comune	Punto di fusione (°C)
Acidi grassi saturi			
12:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	Acido laurico	44
14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	Acido miristico	58
16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	Acido palmitico	63
18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	Acido stearico	70
20:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	Acido arachidico	77
Acidi grassi insaturi			
16:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Acido palmitoleico	1
18:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Acido oleico	16
18:2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	Acido linoleico	-5
18:3	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	Acido linolenico	-11
20:4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	Acido arachidonico	-49

*Il primo numero rappresenta il numero di atomi di carbonio nell'acido grasso; il secondo il numero di doppi legami carbonio-carbonio nella catena idrocarburica.

I trigliceridi costituiscono i principali componenti degli oli vegetali (liquidi a temperatura ambiente) e dei grassi animali (solidi a temperatura ambiente). Gli oli si trovano in quantità maggiori nei frutti o nei semi. Le caratteristiche chimico fisiche dei diversi oli e dei grassi dipendono dalla composizione della miscela di acidi grassi che naturalmente dipende dalla loro origine. Si possono avere acidi grassi saturi ed insaturi. Gli oli rispetto ai grassi sono caratterizzati dalla presenza di concentrazioni più elevate di acidi grassi insaturi. In Tabella 2 sono riportate le composizioni degli acidi grassi di alcuni oli vegetali e grassi animali.

Tabella 2. Composizione in acidi grassi di alcuni oli vegetali e di un grasso animale

	Composizione degli acidi grassi (% in peso)									
	(numero di atomi di carbonio: numero di legami C=C legami)									
	8:0	10:0	12:0	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	22:1
Olio di cocco	4.6-9.5	4.5-9.7	44-51	13-20.6	7.5-10.5	1-3.5	5-8.2	1.0-2.6	0-0.2	
Olio di mais				0-0.3	7-16.5	1-3.3	20-43	39-62.5	0.5-13.5	
Olio di palma		0-0.4	0.5-2.4	32-47.5	3.5-6.3	36-53	6-12			
Olio di colza				0-1.5	1-6	0.5-3.5	8-60	9.5-23	1-13	5-56

Per quanto riguarda la composizione delle molecole dei trigliceridi naturali, di solito sono formate da due o tre acidi grassi diversi. Quando un acido grasso supera il 60% del totale si hanno anche gliceridi costituiti da un unico acido, come accade nell'olio di oliva che contiene circa il 50% di trioleato di glicerina (trioleina).

Alcuni acidi occupano posizioni preferenziali nei trigliceridi degli oli vegetali. In particolare, gli acidi palmitico e stearico (entrambi saturi) occupano di preferenza le posizioni 1 e 3. Gli acidi insaturi oleico e linoleico invece, occupano di preferenza la posizione 2.

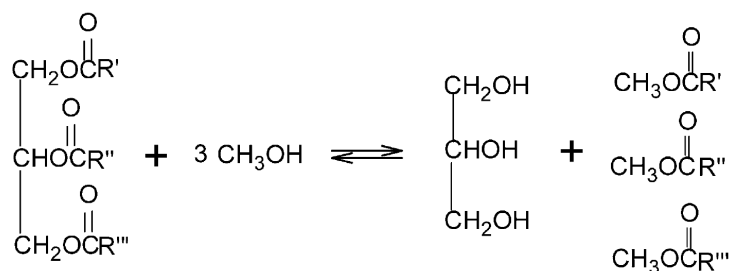
Diversamente dai prodotti naturali, nei trigliceridi di sintesi la posizione dei diversi acidi segue una distribuzione di tipo statistico e ciò può evidenziare eventuali frodi. Nel caso dell'olio di oliva si considera normale una percentuale di acido palmitico in posizione 2 che non superi il 2 % nell'olio di sansa e d'oliva, e addirittura l'1.3 % nell'olio d'oliva vergine

Il Biodiesel

Il primo motore diesel costruito da Rudolf Diesel utilizzava come carburante l'olio vegetale, con la disponibilità di frazioni petrolifere a basso costo che potevano essere utilizzate in questo tipo di motore, la tecnologia si è poi evoluta nell'ottimizzazione dell'utilizzo del carburante di origine fossile. Sono stati numerosi gli esperimenti nell'utilizzo di miscele olio vegetale/diesel da petrolio, ottenendo i migliori risultati con miscele contenenti il 20% di olio vegetale.

Per lunghi periodi di utilizzo però i motori diesel hanno mostrato l'insorgere di problemi consistenti, soprattutto nel caso dei motori ad iniezione diretta: otturazione degli iniettori, depositi carboniosi, indurimento delle guarnizioni, ispessimento e gelificazione degli oli lubrificanti a causa della contaminazione con oli vegetali.

Questi problemi vengono superati utilizzando il biodiesel che consiste in una miscela di esteri alchilici di acidi grassi ottenuti per transesterificazione dei trigliceridi (oli o grassi) con metanolo :



Come coprodotto si ottiene la glicerina (per 100 Kg di biodiesel si ottengono circa 10 Kg di glicerina).

Il biodiesel può essere utilizzato al 100% (B100) negli attuali motori diesel operando piccole modifiche ma in genere viene venduto in miscela con il diesel in concentrazioni che variano dal 1 al 20% (B1-B20).

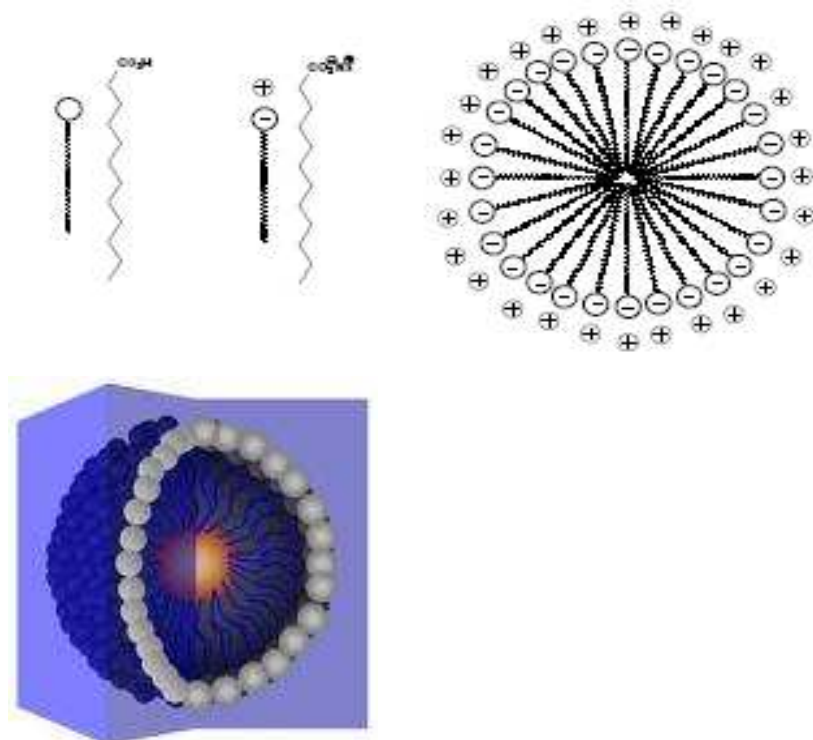
La transesterificazione è catalizzata sia dagli acidi che dalle basi, tuttavia industrialmente si utilizzano essenzialmente i catalizzatori basici in quanto questi sono 4000 volte più attivi e causano minori problemi di corrosione degli acidi. Come catalizzatori basici si utilizzano generalmente idrossido di sodio, idrossido di potassio o metossido di sodio.

La reazione di transesterificazione è una reazione di equilibrio e per spostare la conversione verso rese in biodiesel maggiori del 99% si utilizzano eccessi di alcool che è quindi utilizzato anche come solvente (tipicamente in un range compreso tra il 50 e il 200%).

Saponi

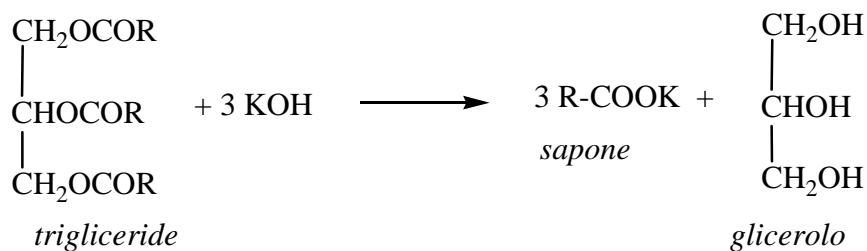
Gli acidi grassi non sono solubili in acqua, ma sono solubili in solventi organici. Ben diversa è invece la solubilità dei sali alcalini degli acidi grassi. I sali di sodio e di potassio sono molto solubili in acqua. Questa solubilità non è dovuta però ad un'intima dispersione di molecole di acido grasso in acqua. Infatti, la presenza di catene carboniose molto lunghe comunque impedisce la solubilizzazione vera e propria delle molecole. In realtà quando si mette in acqua un acido grasso si ha la formazione di particolari aggregati molecolari chiamate **micelle**. Le micelle sono aggregati

sferici in cui diverse molecole di acidi grassi si associano in modo da portare all'interno le catene carboniose (lipofile) e all'esterno i gruppi carbossilici ionizzati (idrofili) che possono interagire con l'acqua.



Le proprietà anfipatiche dei sali alcalini degli acidi grassi e la capacità che hanno di formare micelle, sono alla base delle proprietà detergenti dei saponi. Infatti il materiale che costituisce lo sporco (unto, olio, grasso) viene intrappolato nelle micelle tra le code lipofile e viene quindi eliminato con l'acqua grazie alle teste polari che permettono la solubilizzazione delle micelle.

I saponi possono essere definiti come i sali alcalini di acidi grassi. La prima testimonianza dell'esistenza del sapone risale al 2800 a.C. e proviene da scavi nella zona dell'antica Babilonia. In quella zona fu ritrovato un materiale simile al sapone conservato in cilindri d'argilla che recano incise delle ricette per la preparazione. Una tavoletta sumera datata 2200 a.C. descrive un 'sapone' composto di acqua, alcali e olio di cassia. I primi saponi venivano preparati a partire da grassi animali. Questi grassi venivano trattati in acqua con la cenere a caldo. La funzione della cenere era quella di fornire una base forte (KOH = potassa). Il nome potassa proviene dall'inglese: pot (potassium) e ash (cenere). Infatti le ceneri sono ricche di idrossido di potassio. La potassa contenuta nella cenere in acqua a caldo determinava l'idrolisi dei triacilgliceroli con formazione di glicerina e di sali di potassio degli acidi grassi in un processo comunemente chiamato saponificazione.



Una caratteristica dei sali alcalini rispetto ai sali dei metalli alcalino-terrosi (Mg e Ca) è che questi ultimi ioni formano sali insolubili in acqua che precipitano. I saponi comuni sono però fortemente alcalini per la presenza dello ione Na^+ o K^+ . Oggigiorno soprattutto per l'igiene personale sono poco utilizzati, a causa delle profonde modificazioni che determinano sul pH dell'epidermide. Sono stati perciò sostituiti da saponi sintetici (gli altri vengono definiti naturali) in cui il controione è spesso un sale d'ammonio. Inoltre per ovviare alla precipitazione dei sali di Mg e di Ca (normalmente presenti nelle acque dure) sono stati preparati derivati che come testa polare al posto del gruppo carbossilico hanno un gruppo solfato. Questi acidi non formano sali insolubili con il Mg e il Ca e risolvono il problema delle acque dure. Il sapone più famoso di questa classe è l'SDS o sodio dodecilsolfato.

Di seguito sono riportati metodi analitici per la verifica di una reazione di transesterificazione per la sintesi di biodiesel (NMR e Gascromatografia) e un protocollo per l'analisi della composizione di un olio via Gascromatografia. Entrambi i metodi necessitano di apparecchiature particolari e di una preparazione di base specifica.

METODI ANALITICI UTILIZZATI PER OLI VEGETALI E PRODOTTI DI TRANSESTERIFICAZIONE (BIODISEL)

A.1 Analisi spettroscopica $^1\text{H-NMR}$

La spettroscopia NMR si è rivelata un'ottima tecnica per la determinazione diretta degli esteri metilici presenti nei prodotti di transesterificazione e per la valutazione della resa di reazione.

Vengono riportati di seguito gli spettri relativi all'olio di partenza, in questo caso olio di semi di soia, alla fase esterea prodotta da una reazione di transesterificazione con bassi valori di conversione e a quella prodotta dopo una reazione giunta a conversione totale.

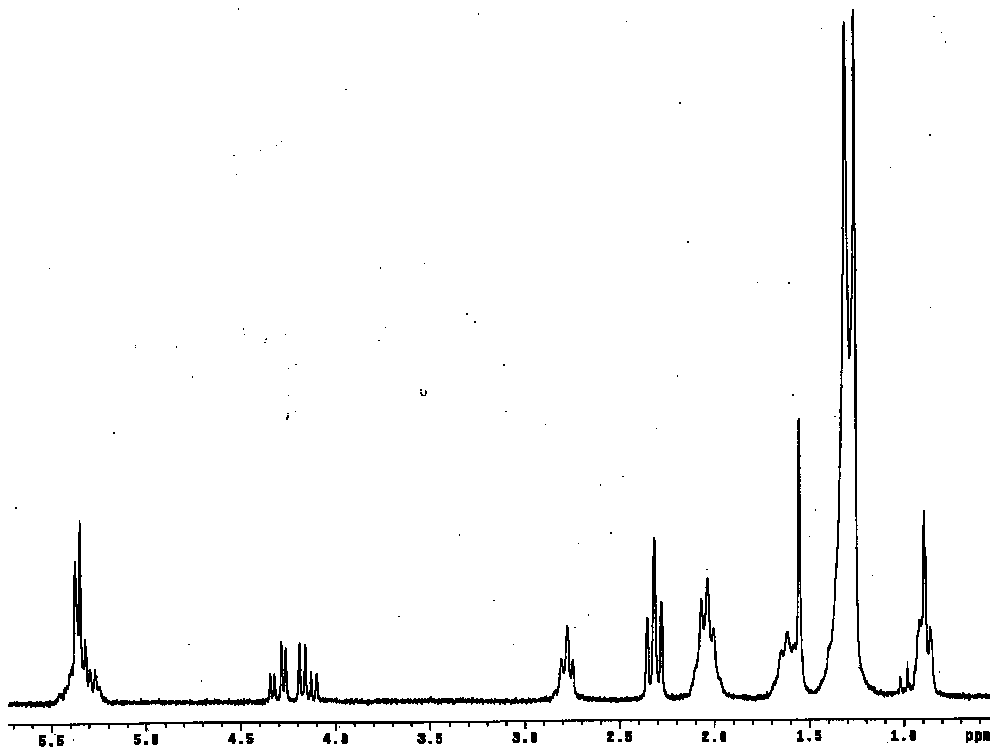


Figura A.1 - Spettro $^1\text{H-NMR}$ dell' olio di semi di soia.

I segnali fondamentali per seguire l'avanzamento della reazione sono quelli caratteristici del gruppo metossilico (che appare come singoletto a 3.7 ppm) e del gruppo metilenico in α al gruppo carbonilico (esso è presente indipendentemente dalla resa della reazione ed appare come tripletto in corrispondenza del chemical shift di 2.3 ppm).

Altri segnali, che è possibile distinguere osservando ciascuno spettro sono quelli del gruppo glicerico intorno a 4.2 ppm, del gruppo vinilico ($\text{CH}=\text{CH}$) a 5.3 ppm e del gruppo allilico ($\text{CH}_2-\text{C}=\text{}$) a 2.1 ppm.

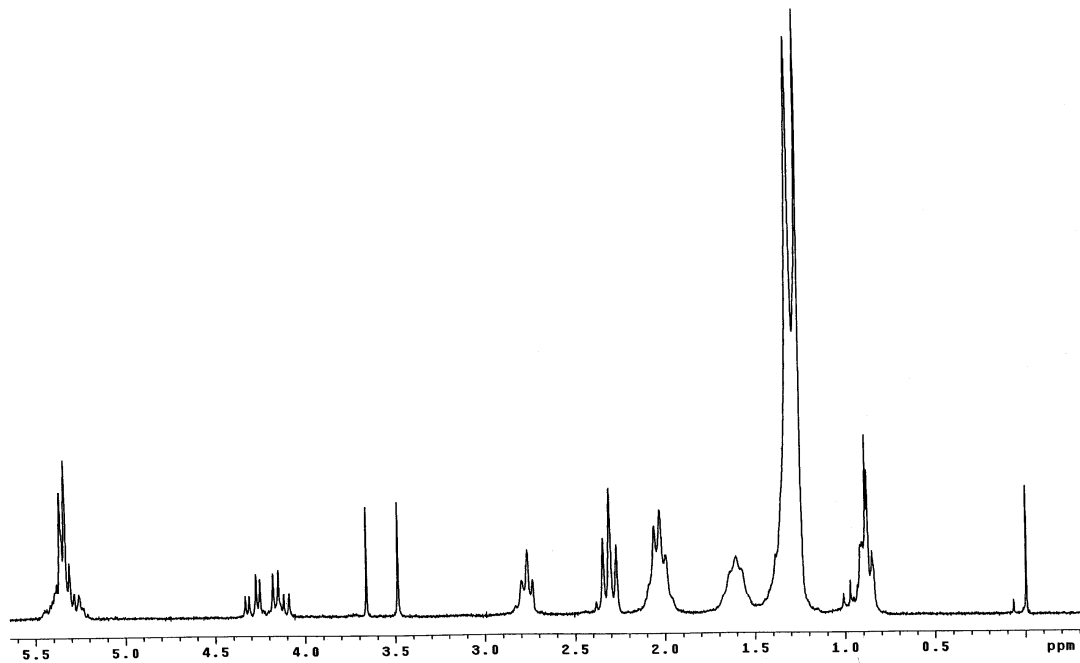


Figura A.2 - Spettro $^1\text{H-NMR}$ degli esteri prodotti da una reazione di transesterificazione con bassi valori di conversione.

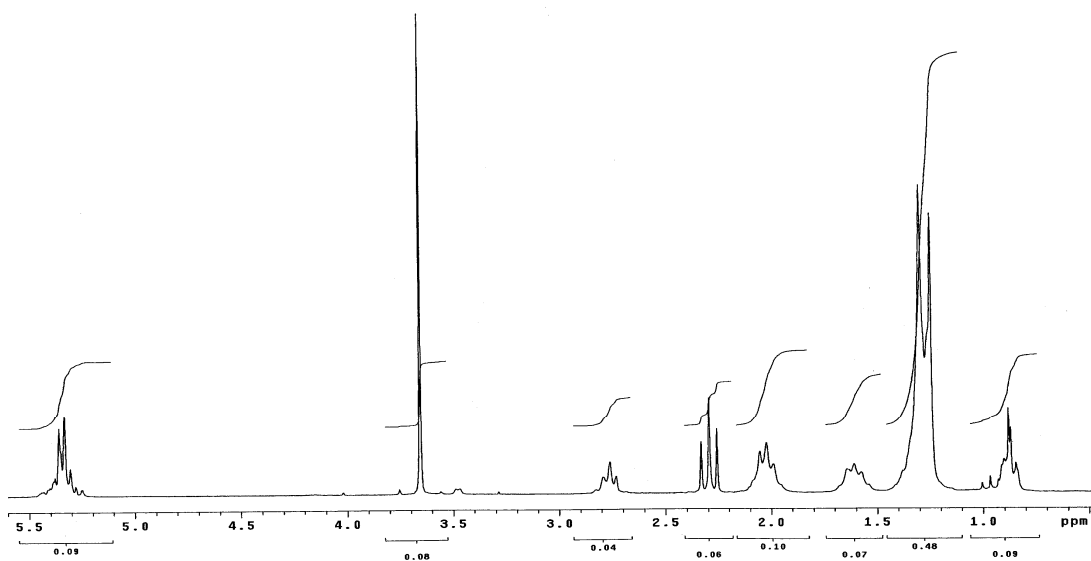
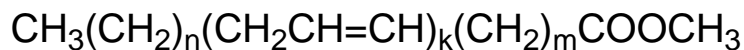


Figura A.3 - Spettro $^1\text{H-NMR}$ degli esteri prodotti da una reazione di transesterificazione giunta a conversione totale.

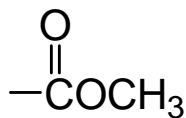
Dal confronto diretto tra questi tre spettri, si può notare come il fattore determinante nel calcolo della resa della reazione di transesterificazione sia il segnale relativo ai gruppi metossilici; questo, infatti, compare solo dopo l'avanzamento della reazione e in misura proporzionale alla conversione raggiunta, mentre i gruppi metilenici sono sempre presenti, sia nell'olio di partenza, che nei prodotti di reazione nelle stesse quantità.

Data la formula chimica del generico estere:



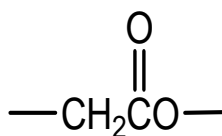
ESTERE METILICO

se si indica con A_1 l'area d'integrazione del segnale relativo al gruppo metossile (che compare a 3.7 ppm):



GRUPPO METOSSILE

e con A_2 l'area d'integrazione del segnale relativo al gruppo metilenico in α al gruppo carbonilico (con chemical shift di 2.3ppm).



GRUPPO METILENICO

La resa di reazione, espressa in termini di conversione dei trigliceridi, può essere calcolata direttamente dalla combinazione delle aree, ottenute dall'integrazione dei picchi sopra menzionati, moltiplicato un fattore di correzione che tiene conto del numero di protoni interessati:

$$Y\% = 100 \cdot \frac{2A_1}{3A_2}$$

A.2 Analisi Gascromatografica

1. Il metodo

Il metodo descrive un procedimento per la determinazione simultanea del contenuto di glicerina libera, monogliceridi, di gliceridi, trigliceridi e metilesteri presenti nel biodiesel mediante analisi gascromatografica.

La trimetilsililazione di glicerina, monogliceridi e di gliceridi seguita da una separazione gascromatografica mediante una colonna capillare con fase stazionaria di bassa polarità permette la determinazione quantitativa degli analiti mediante un'unica corsa gascromatografica.

2 - Principio del metodo

Il biodiesel è costituito da metilesteri ottenuti mediante transesterificazione con metanolo di oli vegetali o grassi animali; la presenza di quantità significative di

glicerina, monogliceridi, di gliceridi e trigliceridi è dovuta ad una transesterificazione incompleta o alla insufficiente purificazione del biodiesel stesso. Esistono, tuttavia, dei limiti alle quantità permesse di glicerina, mono-, di- e trigliceridi presenti nel biodiesel.

Il metodo descrive una procedura gascromatografica che impiega una colonna capillare con fase stazionaria apolare per la determinazione simultanea e quantitativa di glicerina libera, mono-, di- e trigliceridi.

Prima di eseguire l'analisi gascromatografica occorre derivatizzare i campioni, ossia variare considerevolmente la volatilità e la polarità dei componenti presenti. La derivatizzazione consiste nella trimetilsililazione dei gruppi idrossilici liberi di glicerina, monogliceridi e di gliceridi.

L'uso di due standard interni, metileptadecanoato e 1,2,4-butantriolo, permette la determinazione quantitativa di metilesteri, mono-, di-, trigliceridi e glicerina libera mediante il calcolo dei relativi fattori di risposta.

Il calcolo dei fattori di risposta viene eseguito analizzando una soluzione standard contenente glicerina, una monooleina, una dioleina, una trioleina e i due standard interni.

3 - Apparecchiatura

3.1 - Gascromatografo Clarus 500 della Perkin Elmer equipaggiato con iniettore on-column e rivelatore a ionizzazione di fiamma.

3.2 – Colonna gascromatografica capillare in silice fusa con fase stazionaria 5% fenil 95% dimetilpolisilossano (DB-5, HP-5, SE52, etc.):

- lunghezza: 10m
- diametro interno: 0.32 mm
- spessore: 0.1 μ m

3.3 – Sistema di acquisizione ed integrazione computerizzato attraverso l'uso del programma totalcrom sempre della Perkin Elmer.

3.4 – Microsiringhe da 1 μ l con ago per iniezione on-column

3.5 – Provette graduate munite di tappo

3.6 – Pipette Pasteur

3.7 – Bombola di azoto

3.8 – Micropipette Gilson 100:1000

3.9– Matracci da 10, 50 e 100 ml

3.10– Bilancia analitica con precisione ± 0.0001

4 - Reagenti

4.1 – Eptano di grado analitico

4.2 – Esano di grado analitico

4.3 – Piridina di grado analitico

4.4 – Glicerina (>99%)

4.5 – (S)- (-) -1,2,4-butantriolo (standard interno)

4.6 – 1-mono[*cis*-9-octadecenoil]-*rac*-glicerolo (monooleina)

4.7 – 1,3-di-[*cis*-9-octadeceniol]glicerolo (dioleina)

4.8 – 1,2,3-tri-[*cis*-9-octadeceniol]glicerolo (tiroleina)

4.9 – Metileptadecanoato (>99%) (standard interno)

4.10 – N,O - bis(trimetilsilil)trifluoroacetammide + 1% trimetilclorosilano (BSFTA + 1% TMCS)

5 – Procedimento

5.1 – Preparazione delle soluzioni standard per il calcolo dei fattori di risposta

5.1.1 – Preparazione della soluzione standard di metileptadecanoato: in un matraccio da 100 ml pesare 0.1 g di standard e portare a volume con esano (concentrazione effettiva = 1 mg/ml)

5.1.2 – Preparazione della soluzione standard di 1,2,4-butantriolo: in un matraccio da 100 ml pesare 0.1 g di standard e portare a volume con piridina (concentrazione effettiva = 1mg/ml)

5.1.3 – Preparazione della soluzione standard di glicerina: in un matraccio da 10 ml pesare 10 mg di standard e portare a volume con piridina (concentrazione effettiva = 1.86 mg/ml)

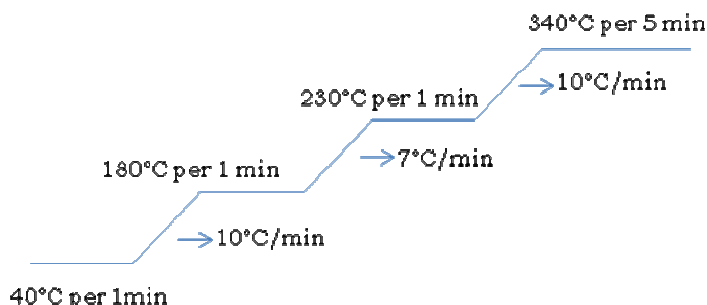
5.1.4 – Preparazione della soluzione standard di monooleina: in un matraccio da 10 ml pesare 10 mg di standard e portare a volume con piridina (concentrazione effettiva = 1 mg/ml)

5.1.5 - Preparazione della soluzione standard di dioleina: in un matraccio da 10 ml pesare 10 mg di standard e portare a volume con piridina (concentrazione effettiva = 1 mg/ml)

5.1.6 - Preparazione della soluzione standard di trioleina: in un matraccio da 100 ml pesare 500 mg di standard e portare a volume con piridina (concentrazione effettiva = 4.09 mg/ml)

5.2 – Scelta delle condizioni operative:

- pressione in colonna: 10 psia
- programmata di temperatura



- Iniettore on-column spento
- Temperatura del rivelatore (FID): 350°C

5.3 – Preparazione dello standard per il calcolo dei fattori di risposta.

Introdurre in una provetta graduata con tappo a vite 1 ml della soluzione standard di metileptadecanoato (5.1.1), 1 ml della soluzione standard di 1,2,4-butantriolo (5.1.2), 1 ml della soluzione standard di glicerina (5.1.3), 1 ml della soluzione standard di monooleina (5.1.4), 1 ml della soluzione standard di dioleina (5.1.5) e 1 ml della soluzione standard di trioleina (5.1.6). Si lascia evaporare il solvente sotto il flusso di azoto. Realizzare l'operazione a temperatura ambiente evitando riscaldamenti del campione.

Addizionare al campione, completamente privato dei solventi, 300µl di BSFTA + 1% TMCS e 300 µl. Tappare la provetta e lasciare a temperatura ambiente per 20 minuti circa. Al termine della reazione evaporare la piridina e l'agente silanilizzante sotto flusso di azoto senza riscaldare.

Ad evaporazione completata aggiungere immediatamente 8 ml di eptano e tappare la provetta. Conservare la provetta in assenza di umidità.

5.4 – Preparazione del campione

In un matraccio da 50 ml pesare 0.5 ± 0.0001 g di biodiesel e portare a volume con esano. Tappare il contenitore ed agitare. Trasferire 1 ml della soluzione del campione mediante pipetta a bolla in una provetta a fondo conico. Aggiungere 1 ml della soluzione standard di metileptadecanoato (5.1.1). Trattare con flusso di azoto per allontanare il solvente. Realizzare l'operazione a temperatura ambiente evitando riscaldamenti del campione. Addizionare al campione, completamente privato del solvente, 300µl di BSFTA + 1% TMCS e 300µl di piridina. Tappare la provetta e lasciare a temperatura ambiente per 20 minuti circa. Al termine della reazione evaporare la piridina e l'agente silanilizzante sotto flusso di azoto senza riscaldare. Ad evaporazione completata aggiungere immediatamente 8 ml di eptano e tappare la provetta. Conservare la provetta in assenza di umidità.

5.5 – Esecuzione delle analisi

Si preleva 1µl della soluzione del campione con la micro siringa, si aspira aria e si asciuga l'estremità dell'ago. Si introduce l'ago attraverso la membrana sul portello dell'iniettore on-column seguendo l'introduzione dell'ago (flessibilissimo) con l'aiuto delle dita, si preme lo stantuffo rapidamente fino in fondo e dopo 5-7 secondi si estrae l'ago.

Nel cromatogramma l'ordine di eluizione sarà il seguente: glicerina libera, metilesteri, monogliceridi, digliceridi, trigliceridi.

6 - Valutazione quantitativa ed espressione dei risultati

6.1 – Calcolo dei fattori di risposta

Si inietta al gascromatografo 1 µl dello standard preparato come al punto 5.3. si procede al calcolo delle aree di ogni singolo picco mediante integrazione dal computer. Prendendo come riferimento il metileptadecanoato e assegnando 1 al fattore di risposta del metileptadecanoato, si ricavano gli altri fattori di risposta come segue:

$$\text{fattore monogliceridi} = (A_{\text{mono}} \cdot C_{\text{met}}) / (A_{\text{met}} \cdot C_{\text{mono}})$$

$$\text{fattore digliceridi} = (A_{\text{di}} \cdot C_{\text{met}}) / (A_{\text{met}} \cdot C_{\text{di}})$$

$$\text{fattore trigliceridi} = (A_{\text{tri}} \cdot C_{\text{met}}) / (A_{\text{met}} \cdot C_{\text{tri}})$$

$$\text{fattore glicerina} = (A_{\text{gly}} \cdot C_{\text{but}}) / (A_{\text{but}} \cdot C_{\text{gly}})$$

in cui:

A_{mono} = area del picco della monooleina

A_{di} = area del picco della dioleina

A_{tri} = area del picco della trioleina

A_{gly} = area del picco della glicerina

A_{met} = area del picco del metileptadecanoato

A_{but} = area del picco del 1,2,4-butantriolo

C_{mono} = concentrazione della soluzione standard di monooleina (1 mg/ml)

C_{di} = concentrazione della soluzione standard di dioleina (1 mg/ml)

C_{tri} = concentrazione della soluzione standard di trioleina (4.09 mg/ml)

C_{but} = concentrazione della soluzione standard di 1,2,4-butantriolo (1 mg/ml)

C_{gly} = concentrazione della soluzione standard di glicerina (1.86 mg/ml)

Esprimendo i risultati con due cifre decimali si ottiene:

$$f_{\text{met}} = 1$$

$$f_{\text{mono}} = 1.77$$

$$f_{\text{di}} = 0.7$$

$$f_{\text{tri}} = 0.5$$

$$f_{\text{gly}} = 1.18$$

6.2 – Calcolo della % in peso di metilesteri, mono-, di-, trigliceridi e glicerina libera

Si inietta al gascromatografo 1 μ l del campione preparato come al punto 5.4. Si procede al calcolo delle aree di ogni singolo picco mediante integratore elettronico. Dal cromatogramma si ricavano le sommatorie delle aree dei metilesteri, dei monogliceridi, dei digliceridi, dei trigliceridi e l'area del picco della glicerina libera.

Si procede al calcolo percentuale come segue:

$$mg_{\text{met}} = (S_{\text{met}} \cdot C_{\text{met}}) / (A_{\text{met}} \cdot f_{\text{met}})$$

$$mg_{\text{mono}} = (S_{\text{mono}} \cdot C_{\text{met}}) / (A_{\text{met}} \cdot f_{\text{mono}})$$

$$mg_{\text{di}} = (S_{\text{di}} \cdot C_{\text{met}}) / (A_{\text{met}} \cdot f_{\text{di}})$$

$$mg_{\text{tri}} = (S_{\text{tri}} \cdot C_{\text{met}}) / (A_{\text{met}} \cdot f_{\text{tri}})$$

$$mg_{\text{gly}_i} = (A_{\text{gly}} \cdot C_{\text{but}}) / (A_{\text{but}} \cdot f_{\text{gly}})$$

$$S_t = mg_{\text{met}} + mg_{\text{mono}} + mg_{\text{di}} + mg_{\text{tri}} + mg_{\text{gly}}$$

$$\% \text{ metilesteri} = (mg_{\text{met}} \cdot 99) / S_t$$

$$\% \text{ monogliceridi} = (mg_{\text{mono}} \cdot 99) / S_t$$

$$\% \text{ digliceridi} = (mg_{\text{di}} \cdot 99) / S_t$$

$$\% \text{ trigliceridi} = (\text{mg}_{\text{tri}} \cdot 99) / S_t$$

$$\% \text{ glicerina} = (\text{mg}_{\text{gly}} \cdot 99) / S_t$$

I valori ottenuti sono normalizzati al 99% poiché bisogna considerare l'1% di sostanze non gliceridi che (steroli, idrocarburi, cere, etc.) comunque presenti negli oli di partenza.

Esprimere i risultati con una cifra decimale.

Dove:

S_{met} = sommatoria delle aree dei metilesteri

S_{mono} = sommatoria delle aree dei monogliceridi

S_{di} = sommatoria delle aree dei digliceridi

S_{tri} = sommatoria delle aree dei trigliceridi

A_{met} = area del picco del metileptadecanoato

A_{but} = area del picco dell'1,2,4-butantriolo

C_{met} = concentrazione della soluzione standard di metileptadecanoato

F_{mono} = fattore di risposta dei monogliceridi

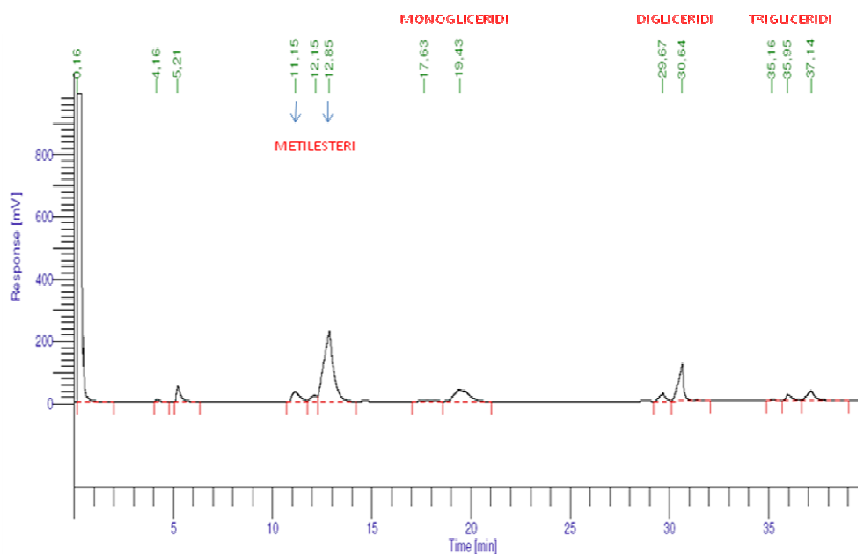
F_{di} = fattore di risposta dei digliceridi

F_{tri} = fattore di risposta dei trigliceridi

F_{gly} = fattore di risposta della glicerina

Di seguito si riporta un cromatogramma ottenuto con il Clarus 500 per degli esteri prodotti da una reazione di transesterificazione con elevati valori di conversione.

Figura A.3 – Cromatogramma degli esteri prodotti da una reazione di transesterificazione con elevati valori di conversione.



A.3 Analisi di acidità dei reagenti e del prodotto

L'acidità di un olio viene generalmente espressa in termini di percentuale in peso di acido oleico contenuto nel substrato. Questo valore viene determinato seguendo la procedura di titolazione indicata dal metodo NGD C 10 (1976).

La soluzione titolante è una soluzione di idrossido di sodio 0,1 N .

Tale titolazione richiede una massa di sostanza grassa che va dai 3 ai 20 grammi; questa massa viene disciolta in 100 ml della miscela etanolo-etere etilico, in rapporto volumetrico 1:2, contenente poche gocce di indicatore fenolftaleina e successivamente titolata con la soluzione di idrossido di sodio fino al viraggio.

Il valore dell'acidità viene calcolato in questo modo:

$$A \% = \frac{V \cdot N \cdot 282,5}{m} \cdot 100$$

V= volume della soluzione titolante, NaOH, consumato, espresso in litri;

N= normalità della soluzione titolante;

m= massa del campione prelevato per l'analisi, espressa in grammi;

282,5= peso molecolare dell'acido oleico, espresso in grammi/mol.

L'acidità di una sostanza grassa viene comunemente espressa anche come "numero di acidità", definito come milligrammi di idrossido di potassio necessari per neutralizzare un grammo di sostanza grassa. Questo valore viene determinato seguendo la procedura di titolazione indicata dal metodo ASTM D 4662-03.

Questo metodo misura l'acidità dei polioli, dove a determinare l'acidità sono più composti acidi diversi o di cui non si è a conoscenza della formula chimica, e di altri materiali di alta acidità che sono solubili in miscele di toluene ed alcol etilico, usati come solventi.

In tal caso il valore dell'acidità sarà così individuato:

$$N.A. = \frac{(A - B) \cdot 56,1 \cdot N}{m}$$

dove

A=soluzione di KOH per titolare il campione, mL

B= soluzione di KOH per titolare il bianco (solo solvente), mL

56,1= peso molecolare di KOH

A.4 Analisi gas-cromatografica della composizione di un trigliceride

A seconda della provenienza del grasso la composizione dei trigliceridi è molto variabile. Di conseguenza la determinazione della composizione acidica in

campioni di olio, burro, margarina, ed in prodotti contenenti frazioni significative di sostanza grassa (alimenti, cosmetici, farmaci, ecc.) risulta essenziale per una loro caratterizzazione sia in termini di composizione che di qualità del prodotto.

L'analisi degli acidi grassi può essere convenientemente eseguita per via gascromatografica, sfruttando la volatilità dei loro **esteri metilici** che è maggiore sia degli acidi grassi liberi che dei trigliceridi originali.

La **composizione qualitativa** degli acidi grassi presenti nel campione si fa per confronto con una miscela standard a composizione nota di esteri metilici degli acidi grassi; oppure, sulla base delle proprietà della fase stazionaria, si può prevedere il seguente ordine di eluizione:

- 1) il tempo di ritenzione aumenta all'aumentare del numero di atomi di carbonio;
- 2) gli esteri insaturi eluiscono dopo i corrispondenti esteri saturi;
- 3) il tempo di ritenzione degli esteri insaturi aumenta all'aumentare del numero di doppi legami;
- 4) gli esteri ramificati escono prima degli esteri lineari con uguale numero di atomi di carbonio;

In realtà con l'invecchiamento delle colonne i tempi di ritenzione possono cambiare e si possono anche verificare delle inversioni nell'ordine di eluizione.

L'**analisi quantitativa** si basa sulla misura dell'area di ogni picco (in pratica di tutti tranne quelli attribuibili al solvente), esprimendo ogni concentrazione come area relativa (% w/w), **nell'ipotesi che tutti i componenti vengano eluiti** (cioè se la corsa è sufficientemente lunga).

Sarebbe possibile ottenere dei valori percentuali più accurati calcolando i fattori di risposta dei singoli esteri metilici degli acidi grassi. Ciò si potrebbe fare preparando ed analizzando una miscela a contenuto noto di ogni estere. I fattori di risposta si otterrebbero prendendo uno degli analiti come riferimento ($f_i = 1$), oppure utilizzando uno standard interno.

E' riportata una procedura standard per l'analisi di un olio

Reagenti

- acido solforico al 98 %
- metanolo
- n-esano
- standard singoli o in miscela dei principali esteri metilici degli acidi grassi
- carbonato di sodio
- solfato di sodio anidro (oppure solfato di magnesio anidro)

Attrezzatura

- gas-cromatografo equipaggiato con colonna capillare polare, per esempio EC-WAX (30 m) e rivelatore FID
- integratore o computer
- bagno riscaldante
- fiala da 20 mL munita di setto rivestito in teflon e ghiera in alluminio (con *cup crimper*)
- pipetta graduata da 1 mL
- pipetta tarata da 2 mL
- pipetta tarata da 5 mL
- pipetta Pasteur con tettarella
- siringa da GC da 5 μ L
- spatolina in acciaio
- 6 matracci da 2 o 5 mL

PROCEDIMENTO

Preliminarmente è necessario metilare i campioni di lipide, quindi si procede all'analisi sul gas-cromatografo opportunamente impostato.

1. Introdurre nella fiala circa 0.5 g di campione di olio;
2. Aggiungere 2 mL di metanolo e 80 μ L di acido solforico concentrato (98 %) utilizzando una pipetta graduata da 1.0 mL.

Att. Seguire questo ordine di aggiunta dei reagenti. L'acido solforico va introdotto con cautela perché la sua solvatazione è fortemente esotermica.

3. Chiudere con setto e ghiera la fiala;
4. **Indossando occhiali protettivi** porre la fiala in un bagno termostatico alla temperatura di 80 $^{\circ}$ C per 40 minuti;
5. Nel frattempo preparare una soluzione sciogliendo la minima quantità possibile per ogni estere metilico a disposizione in *n*-esano, e successivamente una soluzione contenente una miscela di questi, utilizzando dei matracci da 2 o 5 mL od una fiala con tappo, di volume opportuno; se invece è disponibile una miscela standard commerciale, diluirla opportunamente prima di iniettarla;
6. Raffreddare la fiala a temperatura ambiente con acqua corrente, **dopo aver tolto il sostegno metallico**;
7. Aprire la fiala e introdurre 5 mL di *n*-esano;
8. Agitare bene in modo da estrarre completamente gli esteri metilici nella fase organica (strato superiore) e poi separare la fase organica (per esempio con una Pasteur) e conservarla a parte; se la soluzione è appena torbida (per la presenza di acido solforico), aggiungere del carbonato di sodio e agitare fino al termine dell'effervescenza; aggiungere poi del solfato di sodio o di magnesio anidro per eliminare l'acqua residua;

9. Impostare l'apparecchio: una colonna cromatografia adatta è una EC-WAX. Si imposta il metodo di analisi (tra cui i valori di T iniettore, T rivelatore, T colonna; i valori normalmente impiegati con una colonna EC-WAX sono: T iniettore = 230 – 250 °C, T rivelatore = 260 °C, T colonna = 180 – 200 °C). Si regola il flusso del gas di trasporto (per es. 14 psi (se necessario)). Si selezionano i parametri di acquisizione ed integrazione del segnale;
10. Iniettare i singoli standard, 0.3µL, e poi la miscela di questi, verificando la sequenza di uscita;
11. Se tutti i picchi risultano separati procedere col campione, altrimenti modificare le condizioni di separazione (T della colonna od eventuale rampa di temperatura);
12. Iniettare 0.3µL di campione (fase organica) nel gas-cromatografo nelle condizioni scelte, 2 o 3 volte.

ELABORAZIONE DATI

Dai cromatogrammi ricavare una tabella con i componenti e i relativi tempi di ritenzione e aree. Calcolare i fattori di risposta (cfr. sopra). Calcolare le aree percentuali per ogni componente ed il valore medio con deviazione standard, se il campione è stato analizzato più volte.

Riportare nella relazione un cromatogramma della miscela degli standard ed un cromatogramma del campione.