



Chemia żywności
Katedra Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie nr 7

**Izolacja i wstępna charakterystyka wybranych olejków
eterycznych**

Chemia żywności

Gdańsk, 2016

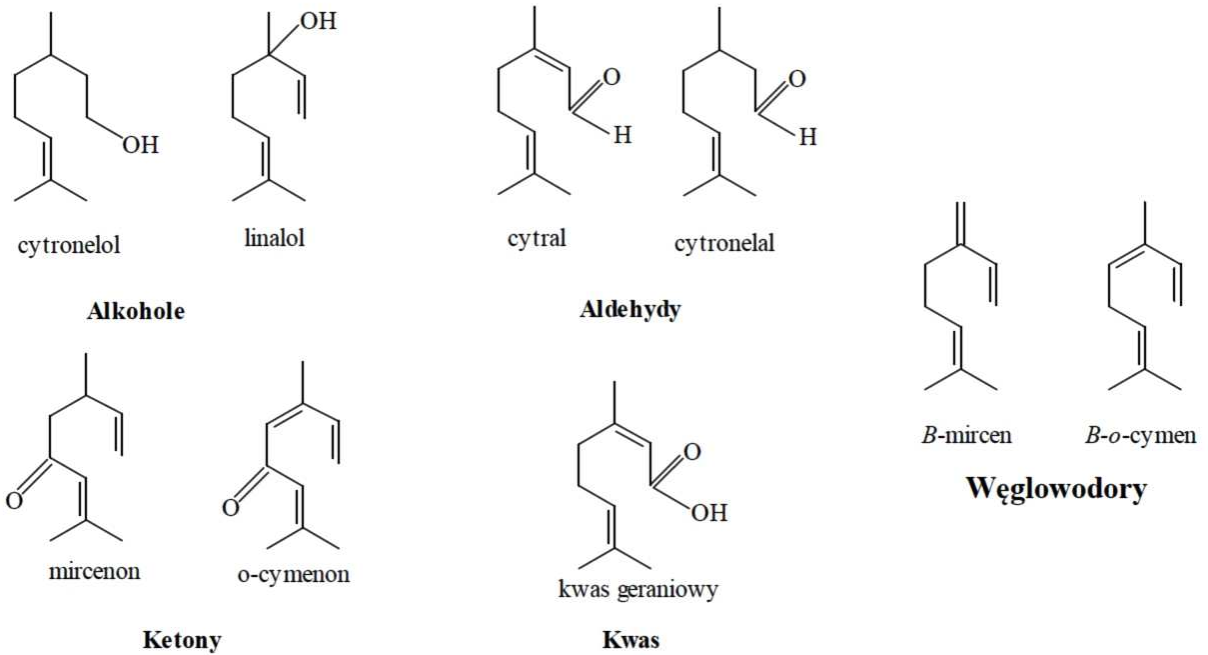
1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1.1. Olejki eteryczne

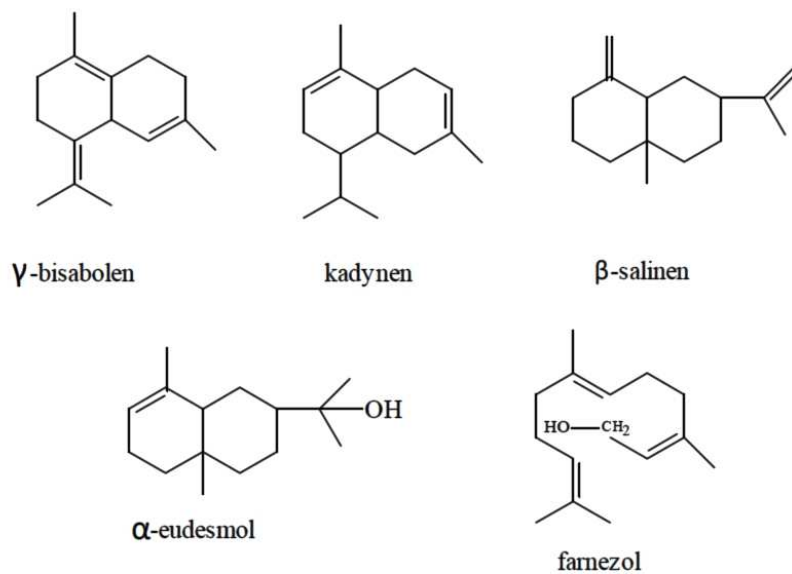
Olejki eteryczne występujące w świecie roślinnym są to mieszaniny substancji lotnych o różnym charakterze chemicznym, charakteryzujące się silnym, na ogół przyjemnym zapachem. Jest to bardzo heterogenna grupa substancji roślinnych. Podstawą jej wyróżnienia jest zespół cech fizykochemicznych oraz technologia otrzymywania, polegająca najczęściej na destylacji z parą wodną. Do ogólnych charakterystycznych cech fizykochemicznych olejków należą: płynna konsystencja, lipofilność, lotność (odróżnienie od tłuszczów), czynność optyczna oraz charakterystyczny zapach. Olejki eteryczne od dawna znane są jako zapachowe substancje roślinne używane do celów kosmetycznych, dezynfekujących i leczniczych. Ze względu na łatwość otrzymywania z roślin przez destylację z parą wodną należały do najwcześniej poznanych produktów świata roślinnego, chociaż skład chemiczny poznano dopiero później. Pod względem chemicznym olejki eteryczne stanowią wieloskładnikowe mieszaniny mono-, seskwi- i (rzadziej) diterpenowych (olejki terpenowe) lub pochodnych fenylopropanu (olejki nieterpenowe). Przykładowe struktury mono- i seskwiterpenów są zaprezentowane na **Rysunkach 1-2**. W składzie olejków stwierdzono obecność związków o charakterze węglowodorów, alkoholi, aldehydów, ketonów, estrów i eterów. Oprócz wymienionych związków terpenowych i pochodnych fenylopropanu, spotyka się również w olejkach substancje siarkowe (olejki gorczyczne), azotowe i inne.

W skład jednego olejku może wchodzić kilkadziesiąt różnych związków, jednakże w większości z nich występuje dominujący składnik, np. (-)-mentol w olejku miętowym *Oleum Menthae pipertae*, nadający zapach olejkowi. Często olejek miętowy służy jako materiał wyjściowy do izolowania (-)-mentolu - jego głównego składnika. Ogółem poznano dotychczas ponad 1500 związków wchodzących w skład różnych olejków eterycznych. Procentowy udział poszczególnych składników w olejku jest zmienny i zależy od wielu czynników, m.in. od odmiany lub rasy chemicznej rośliny, stadium wegetacji, pochodzenia geograficznego surowca, a także czynników genetycznych (genotyp). Zwykle klasyfikuje się olejki na podstawie głównego składnika, np. mentolu, tymolu, cyneolu, eugenolu. Olejki eteryczne są wydzielinami roślinnymi o niewyjaśnionej w pełni roli fizjologicznej. Wytwarzane olejki mogą odgrywać pewną rolę w życiu rośliny, jak przywabianie owadów, ochrona przed pasożytami, zmniejszenie parowania, zasklepienie ran i wpływ na rośliny konkurencyjne.

7. Izolacja i wstępna charakterystyka wybranych olejków eterycznych



Rysunek 1. Przykładowe monoterpény, występujące w olejkach eterycznych.



Rysunek 2. Przykładowe seskwiterpény, występujące w olejkach eterycznych.

7. Izolacja i wstępna charakterystyka wybranych olejków eterycznych

1.2. Skład, zastosowanie i właściwości fizykochemiczne olejków eterycznych

Olejki eteryczne mają w temperaturze pokojowej zwykle konsystencję płynną oleistą, czasem zestalającą się. Zwykle są lotne z parą wodną i zawierają składniki o temperaturze wrzenia 50-320°C. Mogą być bezbarwne, czasem brunatnawe, ciemnoniebieskie lub zielone. Gęstość olejków zwykle wynosi poniżej 1 g/ml. Są niemal nierozpuszczalne w wodzie, rozpuszczalne - w alkoholu etylowym i tłuszczach. Olejki eteryczne są głównymi składnikami czynnymi wielu surowców farmakognostycznych określanych jako surowce olejkowe mające duże zastosowanie w leczeniu (Tabela 1-2). Zastosowanie olejków obejmuje cele medyczne (działanie moczopędne, wykrztuśne, przeciwzapalne, żółciopędne, przeciwwrobacze, uspokajające, pobudzające łaknienie oraz antyseptyczne). Są one także używane w przemyśle kosmetycznym oraz spożywczym jako związki zapachowe.

Tabela 1. Ważniejsze surowce olejkowe.

Surowiec	Zawartość olejku [%]	Główny składnik olejku
koszyczek arniki	0,04-0,14	tymol, ester metylowy tymolu
koszyczek rumianku	0,5-1,5	α -bisabolol
liść melisy	0,01-0,1	cytral
liść mięty pieprzowej	1,0-2,0	D (-)-mentol
liść szalwii	1,0-2,5	α - i β -tujon
owoc anyżu	1,5-3,0	anetol
owoc kminku	3,0-7,0	D (+)-karwon
owoc kolendry	0,3-1,2	D (+)-linalol
owoc kopru włoskiego	3,0-6,0	trans-anetol
ziele piołunu	ok. 0,5	tujon, tujol
ziele krwawnika	0,25-0,5	chmazulen
ziele tymianku	0,5-2,0	tymol
owocnia pomarańczy	1,0-2,5	(+)-limonen
korzeń omanu	1,0-3,0	Alantolakton
korzeń lubczyka	0,5-1,0	Ftalidy
korzeń kozłka lekarskiego	0,5-2,0	Estry borneolu
kłącze tataraku	1,5-4,0	β -azaron

7. Izolacja i wstępna charakterystyka wybranych olejków eterycznych

Tabela 2. Ważniejsze olejki eteryczne.

Olejek	Roślina macierzysta	Główny składnik olejku
anyżowy	<i>Pimpinella anisum</i>	anetol, aldehyd anyżowy
cytrynowy	<i>Citrus limon</i>	limonen, cytral
eukaliptusowy	<i>Eucalyptus globulus</i>	cyneol
kopru włoskiego	<i>Foeniculum capillaceum</i>	anetol
mięty pieprzowej	<i>Mentha piperita</i>	mentol
tymiankowy	<i>Thymus vulgaris</i>	tymol
tatarakowy	<i>Acorus calamus</i>	β -azaron
kminkowy	<i>Carum carvi</i>	karwon
goździkowy	<i>Syzygium aromaticum</i>	eugenol
jałowcowy	<i>Juniperus communis</i>	α -pinen, kadinen
lawendowy	<i>Lavandula officinalis</i>	linalol
kosodrzewinowy	<i>Pinus montana</i>	estry borneolu
sosnowy	<i>Pinus silvestris</i>	α -pinen

Analizowany w niniejszym ćwiczeniu olejek ze skórki owoców cytryny (*Citrus limon* L. Burm.) ma stosunkowo złożony skład, który silnie zależy od odmiany rośliny oraz jej pochodzenia geograficznego. Głównym składnikiem jest jednak zawsze limonen - nienasycony węglowodór z grupy monoterpenów. Do tej samej grupy związków należą także inne powszechne składniki olejku, np. β -pinen i γ -terpinen. Poza węglowodorami, w niektórych odmianach notowane są także alkohole (np. linalol) czy aldehydy (cytral). Wstępna analiza olejku przy użyciu reakcji charakterystycznych (patrz następny rozdział) pozwala jedynie stwierdzić obecność związków nienasyconych lub zawierających konkretną grupę funkcyjną. Dokładna analiza wymaga zastosowania bardziej zaawansowanych technik analitycznych, zazwyczaj chromatografii gazowej.

1.3. Wybrane reakcje charakterystyczne na obecność grup funkcyjnych

Związki organiczne, posiadające w swojej strukturze określone grupy funkcyjne, ulegają reakcjom charakterystycznym, które pozwalają wstępnie potwierdzić lub wykluczyć obecność danej grupy. Reakcje te stosuje się zatem do testów przesiewowych. Wynik pozytywny reakcji nie

7. Izolacja i wstępna charakterystyka wybranych olejków eterycznych

pozwala jednak w większości przypadków na w pełni jednoznaczne stwierdzenie obecności konkretnej grupy funkcyjnej.

1.3.1. Wykrywanie wiązań podwójnych

Wiązania podwójne wykrywa się zazwyczaj albo za pomocą utleniania przy użyciu manganianu (VII) potasu lub w reakcji addycji bromu do wiązania podwójnego.

a) utlenianie za pomocą manganianu (VII) potasu (KMnO₄): do roztworu badanej substancji w acetonie (2 ml) dodaje się kroplami roztwór KMnO₄; odbarwienie się roztworu KMnO₄ oraz wytrącanie brunatnego osadu tlenku manganu (IV) (MnO₂) może świadczyć o obecności wiązań podwójnych; **reakcji ulegają także inne związki, w tym alkohole, fenole i aldehydy; stąd, reakcja nie daje zbyt precyzyjnych informacji**

b) addycja bromu do wiązania podwójnego: do roztworu substancji badanej w chloroformie lub chlorku metylenu (2 ml) powoli dodaje się kroplami 5% roztwór bromu w chloroformie; odbarwienie roztworu bromu świadczy o obecności w badanej substancji wiązań podwójnych. **UWAGA! Reakcję należy bezwzględnie przeprowadzać pod włączonym wyciągiem!**



1.3.2. Wykrywanie alkoholi

Alkohole wykrywa się przy zastosowaniu **próby Lucasa** oraz **próby Jonesa**.

a) Próba Lucasa: do badanej substancji dodaje się 3 ml **odczynnika Lucasa** (roztwór chlorku cynku w stężonym HCl), probówkę zamyka korkiem i energicznie wytrząsa. Następnie, przez ok. 5 minut należy obserwować zachodzące zmiany: w wyniku reakcji, pojawiają się nierozpuszczalne w środowisku reakcji chlorki alkilowe. **Alkohole trzeciorzędowe reagują natychmiast**, powodując zmętnienie roztworu i zazwyczaj wytrącanie osadu. **Alkohole drugorzędowe reagują wolniej**: po kilku minutach pojawia się zmętnienie roztworu. **Reakcja nie zachodzi w widoczny sposób dla alkoholi pierwszorzędowych**. Negatywny wynik próby oznacza zatem, że w badanej mieszaninie nie są obecne alkohole, lub że są one związkami pierwszorzędowymi.

7. Izolacja i wstępna charakterystyka wybranych olejków eterycznych

b) Próba Jonesa: do roztworu badanej substancji w acetonie (1 ml) dodaje się kroplę odczynnika Jonesa (roztwór CrO_3 w wodnym roztworze H_2SO_4) i wytrząsa przez 10 sekund. Alkohole pierwszorzędowe utleniają się do aldehydów, zaś drugorzędowe do ketonów; **alkohole trzeciorzędowe nie ulegają reakcji**. Powstanie niebieskozielonego zabarwienia świadczy o obecności alkoholi pierwszo- lub drugorzędowych. UWAGA! W niektórych przypadkach zabarwienie pojawia się po pewnym czasie, obserwuje się też wytrącanie niebiesko zabarwionego osadu!

1.3.3. Wykrywanie grupy karbonylowej

Obecność aldehydów i/lub ketonów potwierdza się na podstawie **próby z 2,4-dinitrofenylohydrazyną** (odczynnik to roztwór tego związku w układzie kwas siarkowy (VI) - etanol - woda). Do niewielkiej ilości badanej substancji, rozpuszczonej w kilku kroplach etanolu, dodaje się 3 ml roztworu 2,4-dinitrofenylohydrazyny i energicznie wytrząsa. Następnie, otwartą probówkę umieszcza się w zlewce z bardzo gorącą wodą (najlepiej zagotowaną tuż przed eksperymentem) na ok. 1 minutę, po czym chłodzi się probówkę pod zimną bieżącą wodą przez kolejną minutę. Pojawienie się żółtego lub pomarańczowego osadu LUB zabarwienia jest dowodem na obecność substancji posiadających w strukturze grupę karbonylową.

1.3.4. Wykrywanie fenoli

Obecność fenoli stwierdza się na podstawie wyniku **próby z chlorkiem żelaza (III) FeCl_3** . Niewielką ilość badanej substancji rozpuszcza się w mieszaninie 3 ml wody i 2 ml etanolu, po czym dodaje się w odstępie 5 sekund dwie krople 1% wodnego roztworu FeCl_3 . Pojawienie się przejściowego lub trwałego zabarwienia (od żółtego po żółtopomarańczowe) świadczy o obecności fenoli. UWAGA! Równoległe należy wykonać analogicznie ślełą próbę - do czystej probówki dodać w identyczny sposób wszystkich odczynników, ale NIE DODAWAĆ próbki badanej. Obecność zabarwienia należy stwierdzić lub odrzucić poprzez porównanie wyglądu obu roztworów.

2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

2.1. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest wyizolowanie olejku eterycznego ze skórki cytryny oraz wstępne określenie jego składu poprzez przeprowadzenie cyklu reakcji charakterystycznych. W celu izolacji olejku zastosowana zostanie destylacja z parą wodną.

2.2. Wykonanie ćwiczenia

Analizowane produkty spożywcze

- skórka z owoców cytryny

Odczynniki chemiczne

- woda destylowana
- chlorek metylenu
- aceton
- etanol
- bezwodny siarczan magnezu
- odczynniki do reakcji charakterystycznych: 5% roztwór bromu w chloroformie, 1% roztwór FeCl_3 , roztwór 2,4-dinitrofenylohydrazyny, odczynnik Lucasa, odczynnik Jonesa

Szkoło laboratoryjne, sprzęt i akcesoria

- Sprzęt do rozdrabniania skórki owoców (deska, nóż)
- Zestaw do destylacji prostej
- Cylinder miarowy 500 ml - 1 szt.
- Pipety miarowe z tłokiem (2, 5 i 10 ml) - 3 szt
- Pipety Pasteura
- Kolbka stożkowa o poj. 250 ml ze szlifem - 1 szt.
- Kolbka stożkowa o poj. 100 ml ze szlifem - 1 szt.
- Zlewka - 1 szt.

7. Izolacja i wstępna charakterystyka wybranych olejków eterycznych

- Rozdzielacz 250 ml - 1 szt.
- Lejek szklany - 1 szt.
- Probówka z podziałką i korkiem - 6 szt.
- Drewniana łapa do probówek - 1 szt.
- Sączki, kamyczki wrzenne, gumki do pipet Pasteura

SPOSÓB WYKONANIA

Ekstrakcja olejku eterycznego ze skórek cytryny

UWAGA! Destylację z parą wodną należy ustawić i uruchomić na początku zajęć, przed pisaniem wejściówki!

Skórki z dwóch owoców cytryny należy pokroić na drobne kawałki i umieścić w kolbie okrągłodennej o pojemności 1 litra. Następnie, zalać surowiec 400 ml wody destylowanej, dodać kilka kamyków wrzennych i zmontować zestaw do destylacji prostej (bez kolumny destylacyjnej). Po włączeniu wody chłodzącej, uruchomić destylację, ustawiając regulator napięcia w **pozycji 5**. Destylację prowadzić do momentu uzyskania około 100 ml destylatu (około 30-40 minut), wyłączyć zestaw i po upływie 5 minut ostrożnie go zdemontować.

Uzyskany destylat przenieść do rozdzielacza. Następnie dodać 15 ml chlorku metylenu **do kolby stożkowej, w której zbierany był destylat**, przepłukać ją i przelać zawartość do rozdzielacza. Wyrząsać zawartość rozdzielacza przez około 1 minutę, ostrożnie odgazowując co kilkanaście sekund. Odstawić rozdzielacz do rozdzielenia się faz i zebrać fazę organiczną (dolną) do suchej kolby stożkowej. Ekstrakcję powtórzyć kolejną porcją chlorku metylenu, i połączyć obie fazy organiczne. Po dodaniu bezwodnego siarczanu magnezu (w takiej ilości, by przestał się zbrylać) odstawić ekstrakt do suszenia na 5-10 minut. Po tym czasie, przesączyć zawartość kolby do kolby okrągłodennej i odparować rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej (**temperatura łaźni wodnej nie wyższa niż 35°C**) do objętości około 1 ml. Przenieść zatężony ekstrakt do zakręcanej butelki o pojemności 2 ml.

Przebieg reakcji charakterystycznych

Do pięciu probówek ze szlifem i podziałką przenieść za pomocą pipety Pasteura po około 4-5 kropli ekstraktu olejku. Następnie, z każdej probówki odparować rozpuszczalnik pod średnim

7. Izolacja i wstępna charakterystyka wybranych olejków eterycznych

strumieniem azotu (**przez około 5-10 sekund**). Przeprowadzić reakcje charakterystyczne:

- na obecność wiązań podwójnych - addycja bromu do wiązań podwójnych **zgodnie z punktem 1.3.1 (b)**
- na obecność alkoholi - próby Lucasa i Jonesa, **zgodnie z punktem 1.3.2 (a) i (b)**
- na obecność grupy karbonylowej - próba z 2,4-dinitrofenylohydrazyną **zgodnie z punktem 1.3.3**
- na obecność fenoli - próba z chlorkiem żelaza (III) **zgodnie z punktem 1.3.4** (proszę pamiętać o ślepej próbie do tego testu!)

3. OPRACOWANIE WYNIKÓW

Sprawozdanie powinno zawierać opis części eksperymentalnej, opis uzyskanych wyników reakcji charakterystycznych oraz dyskusję otrzymanych rezultatów pod kątem obecności substancji różnego rodzaju w badanym olejku eterycznym.

LITERATURA

1. Kączkowski J. *Biochemia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, 1993.
2. Kohlmunzer S. *Farmakognozja*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa, 1993.
3. Lota, M.L. i inni, Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**, 796-805.