



Pracownia studencka
Zakład Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie nr 6

Wyodrębnianie i analiza terpenów

ANALIZA PRODUKTÓW POCHODZENIA NATURALNEGO

Gdańsk, 2013

Celem ćwiczenia jest wykonanie analizy jakościowej terpenów z owoców cytrusowych (pomarańczy, mandarynki lub cytryny) lub z igieł sosny.

Zostaną zastosowane dwie metody przygotowania próbek:

- a. ekstrakcja heksanem (próbka I),
- b. destylacja z parą wodną (próbka II).

Po wykonaniu analiz należy porównać i ocenić 2 metody przygotowania próbek do analizy lotnych związków pochodzenia roślinnego. Zidentyfikować anality na podstawie czasów retencji, indeksów Kováts'a oraz widm mas. Zinterpretować widma mas alkanów i terpenów. Prawidłowo wykonane sprawozdanie powinno zawierać pełną dokumentację analizy (należy załączyć uzyskane chromatogramy i widma mas wraz z odpowiednim opisem).

Ekstrakcja olejku eterycznego – (próbka I)

Ekstrahować około 0,5 g części pomarańczowej skórki (nie albedo) za pomocą 3 mL heksanu mieszając przez około 5 min i pozostawić na około 5 min a następnie przesączyć ekstrakt do naczynka. Jeżeli będzie to konieczne to zatężyć ekstrakt w strumieniu azotu do około 100 µL.

Ekstrakcję terpenów z igieł sosny wykonać analogicznie.

Destylacja z parą wodną – (próbka II)

Na płytce ceramicznej pokroić skórkę pomarańczową na kawałki o długości ok. 0,5 cm, a następnie zważyć ok. 4 gramów. Próbkę umieścić w zestawie do destylacji z parą wodną i dodać 20 ml wody. W kolbie okrągłodennej o pojemności 1000 ml powinno znajdować się około 500 ml wody (proszę pamiętać o dodaniu kaolinu). Wodę w kolbie doprowadzić do wrzenia (regulator mocy ustawiony na 6-7) i przeprowadzić destylację z parą wodną. Destylację przerwać po otrzymaniu około 20 ml destylatu. Do destylatu dodać 20 ml dichlorometanu. Wykonać ekstrakcję (1 minuta wytrząsania) otrzymanej próbki. Za pomocą rozdzielacza rozdzielić warstwę dichlorometanową zawierającą wyekstrahowane terpeny, wysuszyć bezwodnym siarczanem sodu i przesączyć przez sącdek do kolbki. Następnie odparować rozpuszczalnik za pomocą odparowywacza obrotowego do objętości około 1 ml. Jeżeli będzie to konieczne to zatężyć ekstrakt w strumieniu azotu do około 100 µL.

Ekstrakcję terpenów z igieł sosny wykonać analogicznie.

Analiza chromatograficzna w programowanej temperaturze

Chromatograf GC z detektorem FID, kolumna chromatograficzna RTX-5 30 m, 0,25 mm średnica wewnętrzna, 0,25 µm grubość fazy stacjonarnej,

Program temperaturowy: 60 - 120°C, narost 3°C/min, Temperatura dozownika: 220°C,

Temperatura detektora: 220°C, Dzielnik przepływu: 1:50, Gaz nośny: argon, stały przepływ 1 mL/min, Powietrze: 400 kPa, Wodór: 40 kPa, Czas analizy: 20 min.

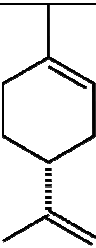

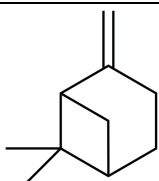
Analiza jakościowa poprzez porównanie czasu retencji analitu z czasem retencji wzorca wyznaczonych w tych samych warunkach chromatograficznych (w programowanej temperaturze)

Należy wykonać analizę próbki badanej oraz analizę roztworów wzorcowych. Odczytać z chromatogramów i porównać czasy retencji. Zidentyfikować składniki próbki. Wyznaczyć zawartość procentową składników próbki metodą normalizacji wewnętrznej.

Wyznaczenie indeksów Kováts'a w warunkach programowanej temperatury

Należy wykonać analizę próbki oraz roztworu wzorcowego: mieszaniny 3-ciu *n*-alkanów od *n*-C₉ do *n*-C₁₁ i wyznaczyć indeksy. Porównać uzyskane indeksy z danymi literaturowymi zawartymi w tabeli 1.

Tabela 1. Wartości indeksów Kováts'a dla wybranych terpenów (Adams, 2009).

Nazwa	Wzór strukturalny	Indeks
limonen		1024
α -pinen		932
β -pinen		974

Analiza GC-MS

Ze względu na ograniczenia czasowe studenci otrzymują widma mas alkanów oraz terpenów wyizolowanych z badanych próbek, które wraz z obliczonymi indeksami retencji posłużą do identyfikacji związków.

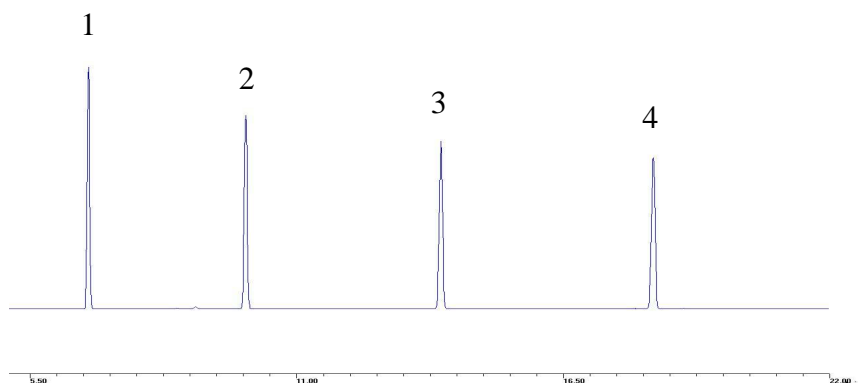
Zagadnienia do przygotowania:

1. Terpeny – biosynteza, występowanie, budowa.
2. Metody izolacji olejków eterycznych, metody analizy.
3. Chromatografia gazowa – teoria procesu chromatograficznego, sprzęt, optymalizacja warunków analizy, analiza ilościowa i jakościowa.
4. Połączenie chromatografii gazowej ze spektrometrią mas – metody jonizacji, widma mas, identyfikacja związków organicznych.

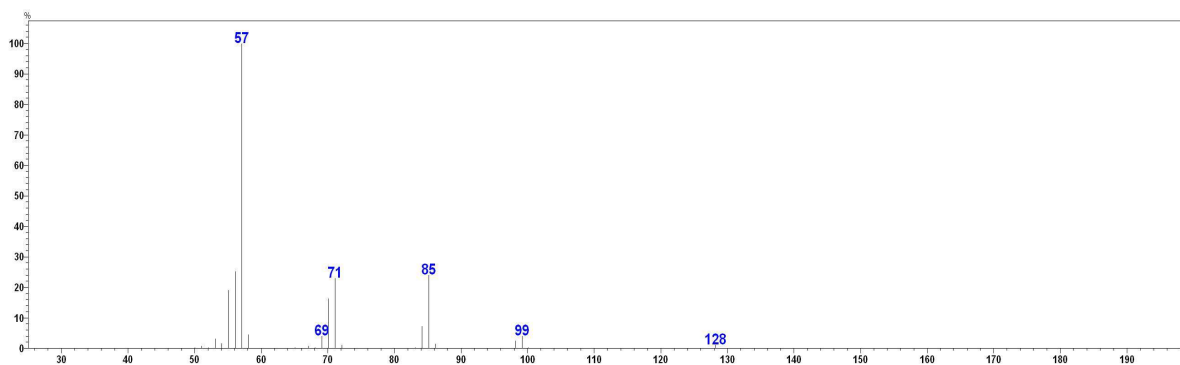
Literatura

1. Piotr Stepnowski, Elżbieta Synak, Beata Szafranek, Zbigniew Kaczyński. *Techniki separacyjne*. Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2010,
2. Walenty Szczepaniak. *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*. PWN, W-wa, 1996.
3. Ryszard Kocjan (red.). *Chemia analityczna*. Podręcznik dla studentów. Tom 2. PZWL, W-wa, 2000.
4. Zygfryd Witkiewicz. *Podstawy chromatografii*. WNT, Warszawa, 2005.
5. Robert P. Adams. *Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. Allured Pub Corp. USA, 2009.

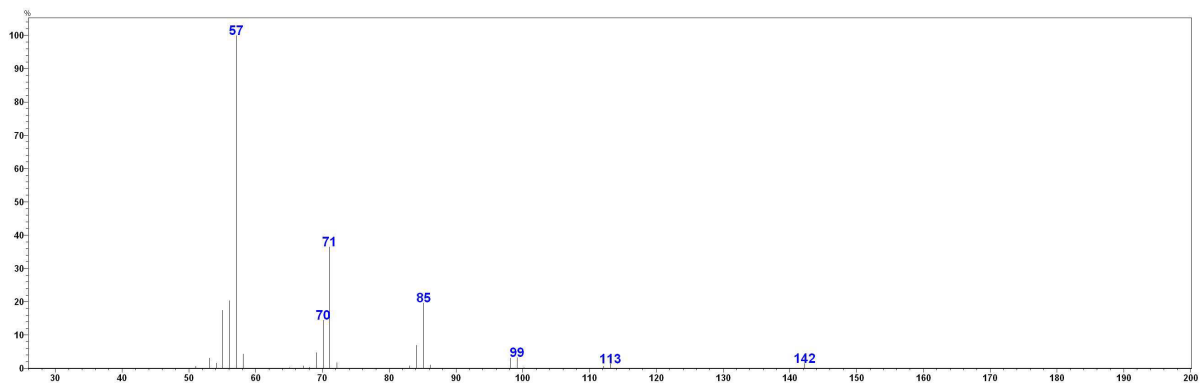
Materiały do opracowania (proszę przynieść wydrukowane na zajęcia)



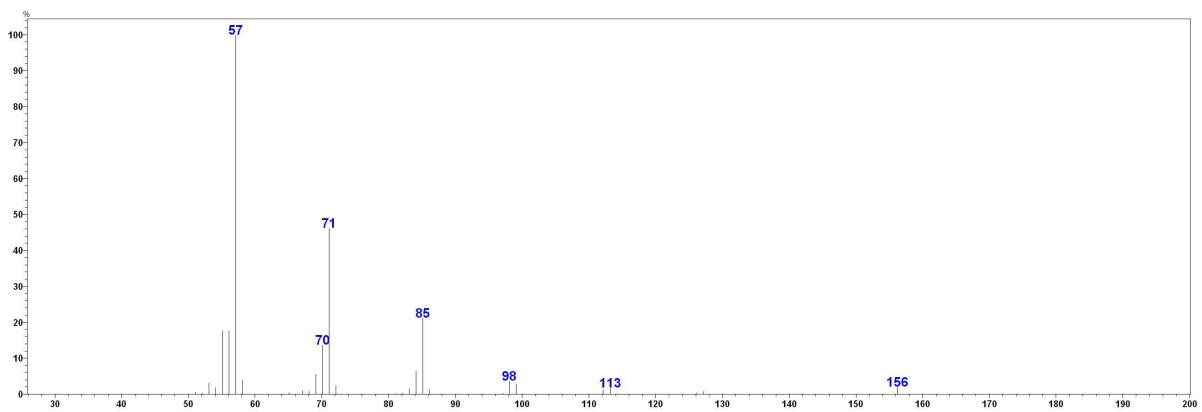
Rys. 1. Chromatogram GC roztworu wzorcowego alkanów: C9, C10, C11, C12



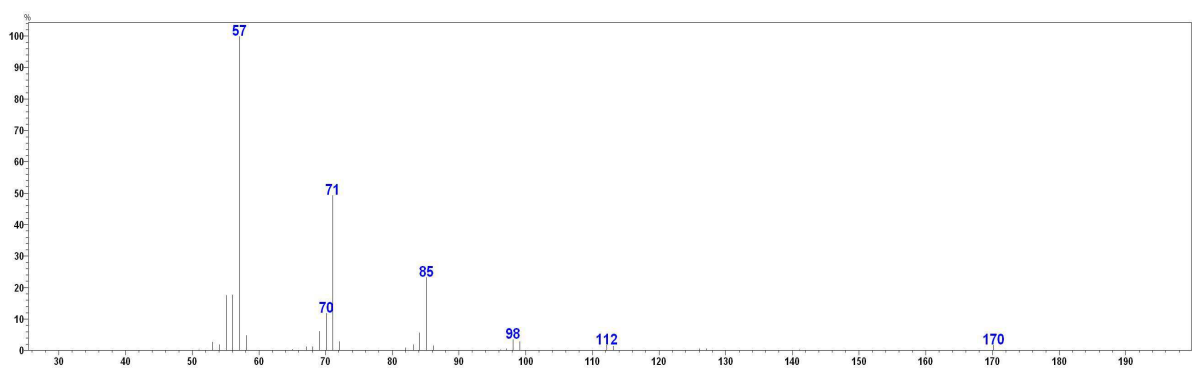
Rys. 2. Widmo mas (EI) nonanu C₉H₂₀ (pik nr 1 na rys.1).



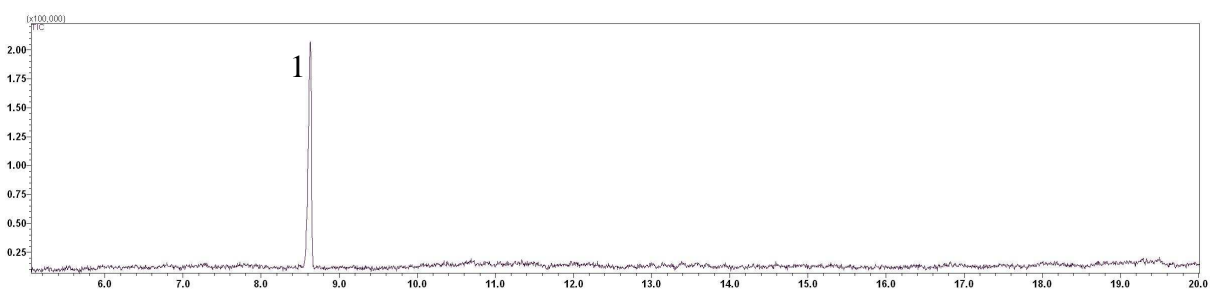
Rys. 3. Widmo mas (EI) dekanu C₁₀H₂₂ (pik nr 2 na rys.1).



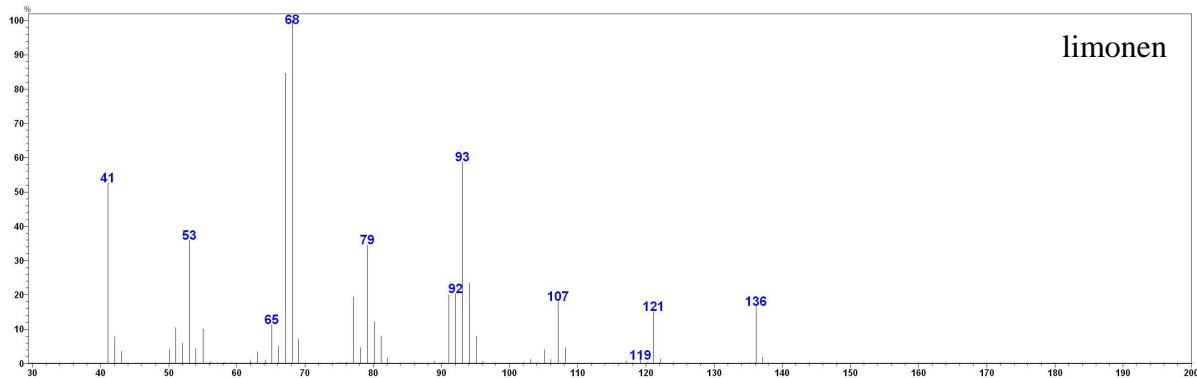
Rys. 4. Widmo mas (EI) undekanu C₁₁H₂₄ (pik nr 3 na rys.1).



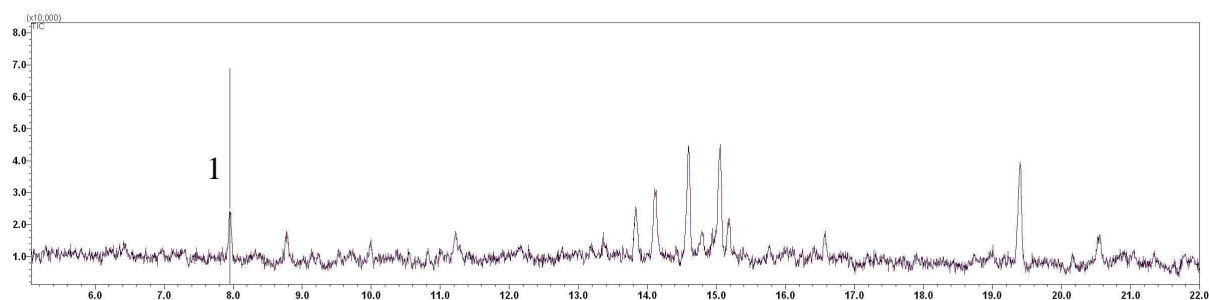
Rys. 5. Widmo mas (EI) dodekanu C₁₂H₂₆ (pik nr 4 na rys.1).



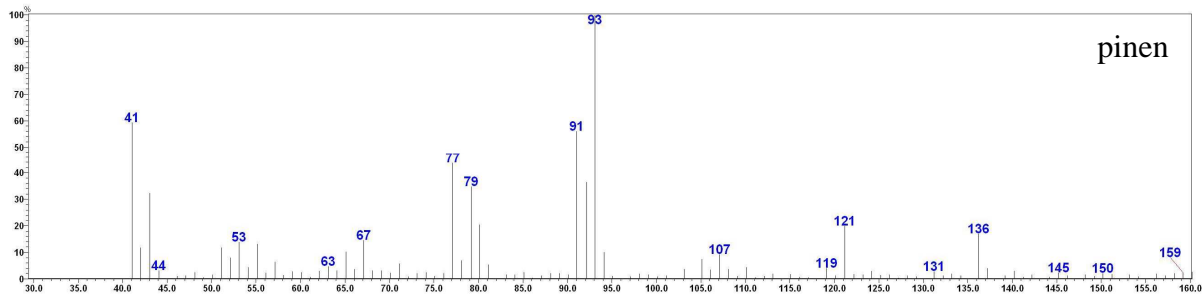
Rys. 6. Chromatogram GC/MS ekstraktu terpenów ze skórki mandarynki.



Rys. 7. Widmo mas (EI) pikę nr 1 na rys. 6.



Rys. 8 Chromatogram GC/MS ekstraktu terpenów z igieł sosny.



Rys. 9 Widmo mas (EI) pikę nr 1 na rys. 8.

Szkło i odczynniki

roztwór wzorcowy mieszaniny *n*-alkanów: *n*-C₉, *n*-C₁₀, *n*-C₁₁ przygotowany poprzez rozpuszczenie 2 μl każdego związku w 1 ml heksanu,

roztwór wzorcowy limonenu,

roztwór wzorcowy α-pinenu,

chlerek metylenu do mycia strzykawki – 2 szt

strzykawka do GC 10 μL – 2 szt

Ekstrakcja olejku eterycznego ze skórek owoców cytrusowych – (próbka I)

kolbka stożkowa z korkiem 10 mL – 3 szt

naczynko zakręcane 1,5 mL oraz mały lejek i sączki – 3 szt,

pipeta 5 mL, pompka do pipet,

heksan 50 mL

nóż i płytko do krojenia

Destylacja z parą wodną – (próbka II):

chlerek metylenu o obj. 100 ml,

bagietka szklana,

pipeta o obj. 5 ml,

pompka do pipet,

lejek średni + odpowiednie sączki,

rozdzielacz o obj. 100 lub 200 ml + mały lejek,

cylinder miarowy o obj. 25 ml,

kolbka z dnem konicznym o obj. 50 ml,

2 kolbki płaskodenne o obj. 50 ml + korki szklane,

bezwodny siarczan sodu + łyżka,

kamyczki wrzenie,

folia aluminiowa,

zestaw do mikrodestylacji z parą wodną z wydajną chłodnicą,

statyw