



Uniwersytet  
Gdański



# Katedra Analizy Środowiska

**Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych  
z Chemii Żywności**

## Ćwiczenie 7

Analiza jakościowa i ilościowa olejków eterycznych

Gdańsk, 2024



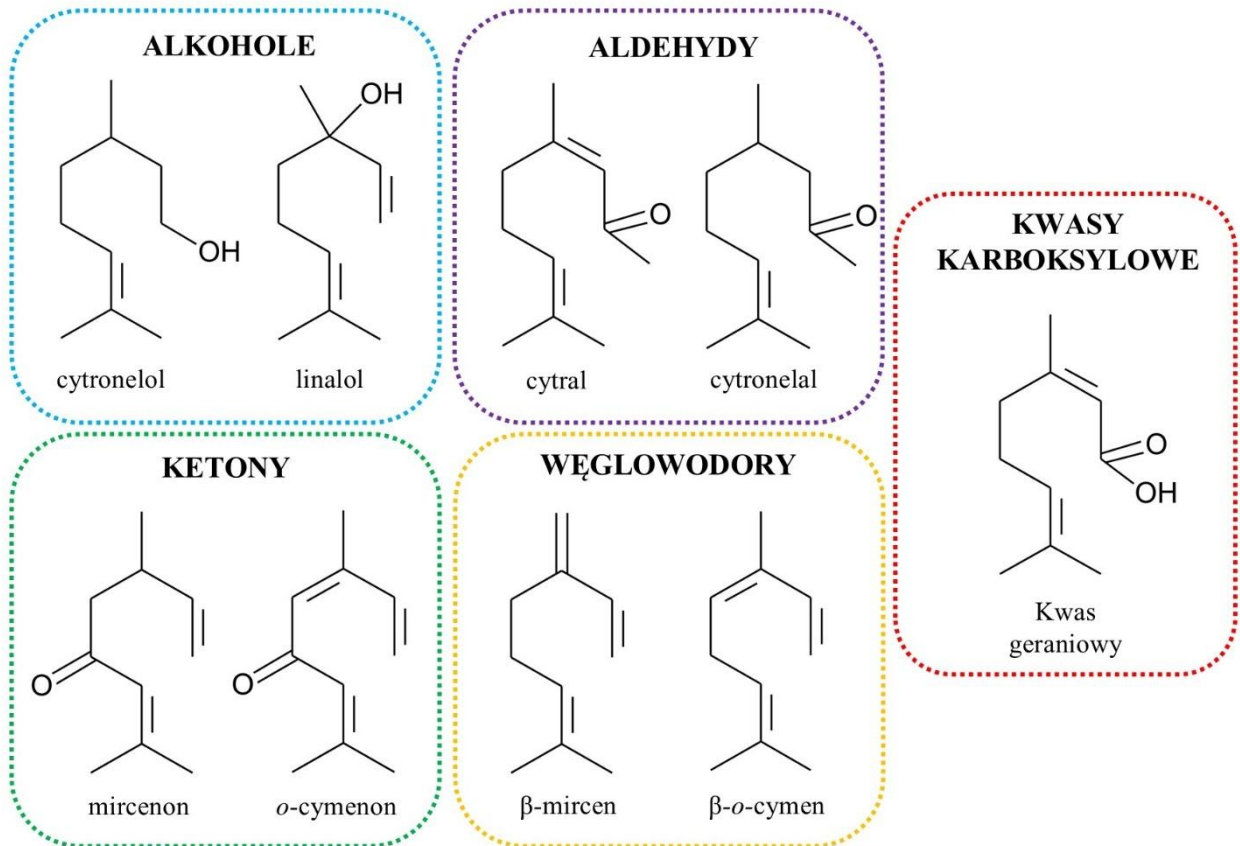
## 1. Wprowadzenie

**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.

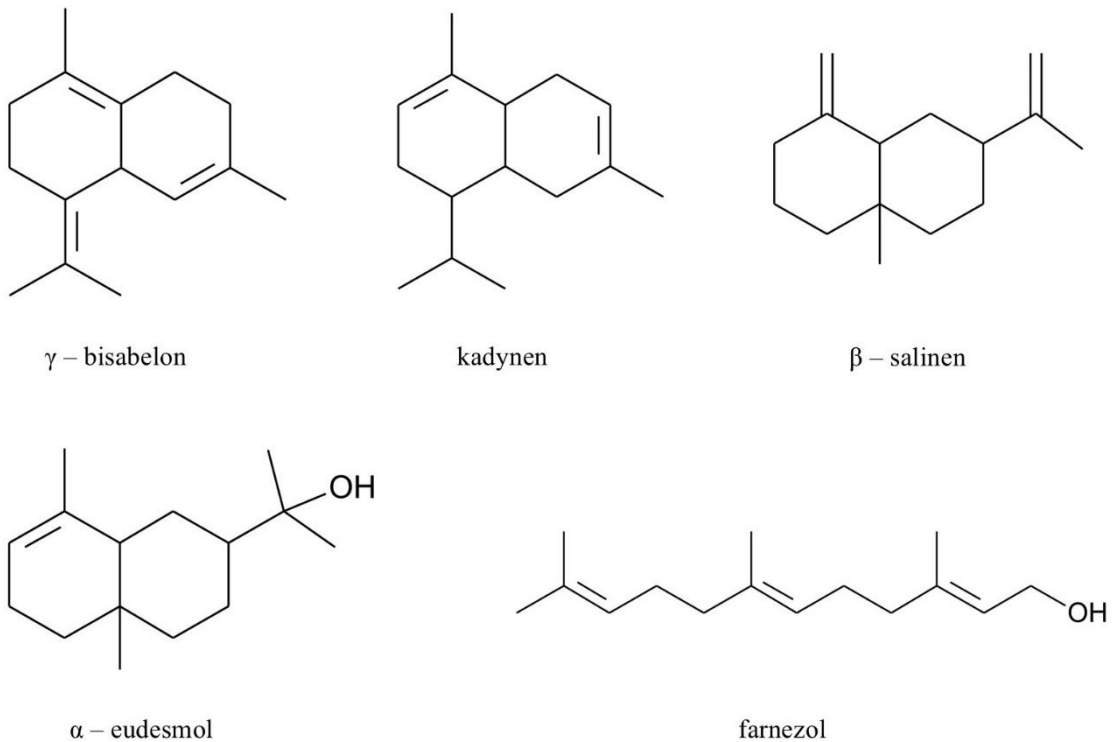
W skład jednego olejku może wchodzić kilkadziesiąt różnych związków, jednakże w większości z nich występuje dominujący składnik, np. (-)-mentol w olejku miętowym *Oleum Menthae pipertae*, nadający zapach olejkowi. Często olejek miętowy służy jako materiał wyjściowy do izolowania (-)-mentolu - jego głównego 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 [1,2].



7. Analiza jakościowa i ilościowa olejków eterycznych



Rysunek 1. Przykładowe monoterpeny występujące w olejkach eterycznych



Rysunek 2. Przykładowe seskwiterpeny występujące w olejkach eterycznych

#### 1.1. 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 od 50 °C do 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 lecznictwie (**Tabele 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 [1,2].

Tabela 1. Ważniejsze surowce olejkowe [1,2].

Surowiec	Zawartość olejku [%]	Główny składnik olejku
koszyczek arniki	0,04 – 0,14	Tymol, ester kwasu tymolu
koszyczek rumianku	0,5 – 1,5	$\alpha$ -bisabolol
liść melisy	0,01 – 0,1	Cytral
liść mięty pieprzowej	1,0 – 2,0	D (-)-mentol
liść szalwii	1,0 – 2,5	$\alpha$ - i $\beta$ -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	chamazulen
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	$\beta$ -azaron

Tabela 2. Ważniejsze olejki eteryczne [1,2]

Rodzaj olejku	Roślina macierzysta	Główny składnik olejku
anyżowy	<i>Pimpinella anisum</i>	anetol, aldehyd anyżowy
cytrynowy	<i>Citrus lemon</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>	$\beta$ -azaron
kminkowy	<i>Carum carvi</i>	karwon
goździkowy	<i>Syzygium aromaticum</i>	eugenol
jałowcowy	<i>Juniperus communis</i>	$\alpha$ -pinen, kadinen
lawendowy	<i>Lavandula officinalis</i>	linalol
kosodrzewinowy	<i>Pinus montana</i>	estry borneolu
sosnowy	<i>Pinus silvestris</i>	$\alpha$ -pinen

Rośliny z rodzaju *Citrus* (rodzina rutowatych), do których należą m.in. pomarańcza chińska (pomarańcza słodka) (*Citrus sinensis* L. Osbeck), cytryna zwyczajna (*Citrus limon* L. Burm.), czy grejpfrut (*Citrus paradisi*), stanowią jedną z najstarszych, najczęściej sprzedawanych i najpopularniejszych roślin uprawnych. Ze względu na ich duże znaczenie gospodarcze skład chemiczny olejków eterycznych ze skórek, liści i kwiatów różnych gatunków cytrusów został dobrze poznany. Doniesienia literaturowe wskazują, że olejki te mają stosunkowo złożony skład, który jest silnie zależny od odmiany, pochodzenia geograficznego, pory roku, klimatu, czy etapu dojrzewania. Olejki eteryczne ze słodkiej pomarańczy są bogate w monoterpeny, których głównym składnikiem jest *d*-limonen (83,9 – 95,9%). Do tej samej grupy należą także inne składniki olejku:  $\beta$ -mircen (1,3 – 3,3%) i sabinen (0,2 – 1,0%). Z kolei zawartość monoterpenów cyklicznych, do których zalicza się  $\alpha$ -pinen mieści się w zakresie 0,6 – 1,0%. Poza węglowodorami, notowane są również alkohole (linalol (0 – 5,6%)) oraz aldehydy (neral (0 – 1,3%) i geranial (0 – 1,8%)) [3].



## 2. Część eksperymentalna

### 2.1. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z metodami ekstrakcji olejków eterycznych ze skórki pomarańczy, wstępna ocena składu wyizolowanych olejków oraz analiza ilościowa z wykorzystaniem techniki chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID)

### 2.2. Odczynniki, akcesoria laboratoryjne i aparatura

#### a) Odczynniki

- 5% roztwór wody bromowej
- 1% roztwór chlorku żelaza (III)
- Roztwór 2,4-dinitrofenylohydrazyny
- Odczynnik Lucasa
- Odczynnik Jonesa
- Dichlorometan – 250 ml
- Etanol 95% – 100 ml
- Aceton – 100 ml
- Bezwodny siarczan sodu
- Heksan cz.d.a. – 50 ml

#### b) Akcesoria laboratoryjne

- Sprzęt do rozdrabniania skórki owoców (deska, nóż)
- Zestaw do destylacji prostej
- Cylinder miarowy 500 ml - 1 szt.
- Pipety szklana 2 ml – 3 szt.
- Pipeta szklana 5 ml – 4 szt.
- Pipeta szklana 10 ml - 3 szt.
- Pipety Pasteura – 10 szt.
- Smoczki – 2 szt.
- Kolbka stożkowa 250 ml - 1 szt.
- Kolbka stożkowa 100 ml - 1 szt.



## Analiza Żywności

### 7. Analiza jakościowa i ilościowa olejków eterycznych

- Kolba stożkowa 50 ml – 2 szt.
- Zlewka 100 ml - 1 szt.
- Rozdzielacz 250 ml - 1 szt.
- Lejek szklany - 1 szt.
- Probówka z podziałką i korkiem - 6 szt.
- Drewniana łąpa do probówek - 1 szt.
- Sączki,
- Kamyczki wrzenne, gumki do pipet Pasteura
- Strzykawka do GC 100 ul – 1 szt.
- Strzykawka do GC 10 ul – 1 szt.
- Wialki 4 ml – 2 szt.

#### c) Aparatura

Chromatograf gazowy Shimadzu GC-2025 (Shimadzu, Kyoto, Japonia) z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID)

### 2.3. Materiał badawczy

Do badań należy wykorzystać skórkę z owocu pomarańczy słodkiej (*Citrus sinensis* L. Osbeck).

### 2.4. Wykonanie oznaczenia

#### 2.4.1. Wstępna charakterystyka olejku eterycznego ze skórki pomarańczy

##### a) Ekstrakcja

Skórkę z jednej owoców pomarańczy pokroić na drobne kawałki i umieścić w kolbie okrągłodennej o pojemności 500 ml. Następnie, zalać surowiec 250 ml wody dejonizowanej, dodać kilka kamyczków 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.

##### b) Oczyszczenie

Uzyskany destylat przenieść do rozdzielacza. Następnie dodać 15 ml dichlorometanu **do kolby stożkowej, w której zbierany był destylat**, przepłukać ją i przelać zawartość do rozdzielacza.

Wytrząsać 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 15 ml dichlorometanu, i połączyć obie fazy organiczne. Dodać bezwodnego siarczanu sodu (w takiej ilości, by przestał się zbrylać) i 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.

#### c) Przebieg reakcji charakterystycznych

Zatężony ekstrakt rozdzielić po równo do czterech probówek z podziałką i z każdej odparować rozpuszczalnik po średnim strumieniem azotu (przez około 5-10 sekund). Następnie przeprowadzić reakcje charakterystyczne:

- **Wykrywanie wiązań podwójnych** (addycja bromu do wiązania podwójnego) – próbkę olejku eterycznego rozpuścić w 2 ml metanolu, a następnie dodawać kroplami 5% roztwór wody bromowej; odbarwienie się roztworu bromu świadczy o obecności wiązań podwójnych.

UWAGA! Reakcję należy bezwzględnie przeprowadzić pod włączonym dygestorium!

#### ➤ **Wykrywanie alkoholi:**

— **Próba Lucasa** – do próbki olejku eterycznego dodać 3 ml odczynnika Lucasa (roztwór chlorku cynku w stężonym HCl), zatkać korkiem i energicznie wytrząsać. Następnie, przez około 5 minut obserwować zachodzące zmiany. W wyniku reakcji pojawiają się nierozpuszczalnie w środowisku reakcji chlorki alkilowe. Alkohole trzeciorzędowe reagują natychmiast, powodując zmętnienie roztworu i zazwyczaj wytrącenie osadu. Alkohole drugorzędowe reagują wolniej, po kilku minutach pojawia się zmętnienie roztworu. Dla alkoholi pierwszorzędowych reakcja nie zachodzi w widoczny sposób. Negatywny wynik próby oznacza zatem, że w badanej mieszaninie nie są obecne alkohole lub są one związkami pierwszorzędowymi.

— **Próba Jonesa** – próbkę olejku rozpuścić w 1 ml acetonu. Do otrzymanego roztworu dodać kroplę odczynnika Jonesa (roztwór  $\text{CrO}_3$  w wodnym roztworze  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) i wytrząsać przez 10 sekund. Alkohole pierwszorzędowe utleniają się do aldehydów, natomiast 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 również wytrącanie niebiesko zabarwionego osadu!

- **Wykrywanie grupy karbonylowej** (próba z roztworem 2,4-dinitrofenylohydrazyny w układzie kwas siarkowy (VI) – etanol – woda) – próbkę olejku eterycznego rozpuścić w kilku kroplach etanolu, dodać 3 ml roztworu 2,4-dinitrofenylohydrazyny i energicznie wytrząsać. Następnie otwartą próbkę umieścić w zlewce z bardzo gorącą wodą (najlepiej zagotowaną tuż przed eksperymentem) na ok. 1 minutę, po czym ochłodzić próbkę pod zimną bieżącą wodą przez kolejną minutę. Pojawienie się pomarańczowego bądź czerwonego osadu lub zabarwienia jest dowodem na obecność substancji posiadających w swojej strukturze grupę karbonylową.

#### 2.4.2. Analiza ilościowa

##### a) Ekstrakcja olejków eterycznych

Odważyć 0,1 g skórki pomarańczy (bez albedo) i przenieść do kolby stożkowej 50 ml. Do próbki dodać taką objętość wzorca wewnętrznego (wskazany przez prowadzącego), aby masa substancji w próbce wynosiła 100 µg. Następnie, dodać 3 ml heksanu, mieszać przez 3 minuty i przesączyć do buteleczki zakręcanej o objętości 4 ml. Tak przygotowany ekstrakt poddać analizie chemicznej opisanej poniżej.

**WAŻNE!** W razie konieczności ekstrakt można zatężyć w strumieniu azotu do objętości około 100 µl.

##### b) Analiza olejków eterycznych

Próbkę zawierającą olejki eteryczne otrzymaną zgodnie z procedurą w Rozdziale 2.4.2.a poddać analizie za pomocą techniki GC-FID zgodnie z warunkami:

- Chromatograf gazowy Shimadzu GC-2025 (Shimadzu, Kyoto, Japonia) z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID)
- Kolumna kapilarna RTX-5 (30 m, 0,25 mm średnica wewnętrzna, 0,25 µm grubość filmu fazy ciekłej (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
- Temperatura dozownika: 300 °C
- Temperatura detektora: 300 °C
- Program temperaturowy: od 60 °C do 120 °C, z narostem 3 °C/min



## Analiza Żywności

### 7. Analiza jakościowa i ilościowa olejków eterycznych

- Gaz nośny: argon
- Przepływ gazu nośnego: 1 ml/min
- Dzielnik przepływu: 1:20
- Objętość nastrzyku: 1  $\mu$ l

#### 2.5. Opracowanie wyników

- na podstawie wyników uzyskanych podczas przeprowadzania reakcji charakterystycznych (Rozdział 2.4.1) określić grupy funkcyjne jakie występują w olejkach eterycznych i omówić, które ze związków mogą być obecne w analizowanej próbce;
- na podstawie wyników uzyskanych w Rozdziale 2.4.2 określić zawartość limonenu w skórce pomarańczy;
- Uzyskane wyniki zestawzić z danymi literaturowymi.

### 3. Literatura:

- [1] Kączkowski J. Biochemia roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, **1993**
- [2] Kohlmunzer S. Farmakognozja. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa, **1993**
- [3] Dosoky N.S., Setzer W.N., Biological activities and safety of *Citrus* spp. essential oils, International Journal of Molecular Science, **2018**, 19, 1966, doi:10.3390/ijms19071966

### 4. Informacje dodatkowe

Zakres informacji, które student powinien umieć, aby móc uczestniczyć w zajęciach:

- budowa, właściwości i występowanie olejków eterycznych;
- reakcje charakterystyczne różnych grup funkcyjnych;
- budowa i zasada działania chromatografu gazowego z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID);
- parametry retencji;
- ekstrakcja;
- metoda wzorca wewnętrznego (sposób działania, obliczania oraz jakie warunki musi spełniać substancja, aby mogła być wzorcem wewnętrznym);
- różnica między analizą jakościową, a ilościową.



## Analiza Żywności

### 7. Analiza jakościowa i ilościowa olejków eterycznych

#### Przydatna literatura:

— Literatura spisana w Rozdziale 3.