



**Pracownia studencka**  
**Katedra Analizy Środowiska**  
**Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych**  
**Zaawansowana Chemia**  
**Analiza kwasów tłuszczowych z żółtka jaja kurzego oraz wyodrębnianie i analiza**  
**terpenów**

**Gdańsk, 2026**

**Celem ćwiczenia 1** jest wykonanie analizy profilu kwasów tłuszczowych z żółtka jajka kurzego przy zastosowaniu dwóch metod:

1. Ekstrakcja lipidów metodą Folcha i następnie zasadowa transestryfikacja,
  2. Bezpośrednia zasadowa transestryfikacja lipidów bez wcześniejszej ekstrakcji z próbki.
- oraz

**Celem ćwiczenia 2** jest wykonanie analizy jakościowej terpenów z owoców cytrusowych (pomarańczy, mandarynki lub cytryny) lub analiza olejku eterycznego.

Zostaną zastosowane dwie metody przygotowania próbek:

1. Ekstrakcja heksanem (próbka I),
  2. Destylacja z parą wodną (próbka II),
- oraz przygotowany do analiz zostanie olejek eteryczny (próbka III).

**Harmonogram:**

Pierwszy dzień – przygotowanie próbek

Drugi dzień - analiza GC i/lub analiza GC/MS

Trzeci dzień – interpretacja wyników

Czwarty dzień - kolokwium

## Ćwiczenie 1 – przygotowanie próbek

*Uwaga: Szkło laboratoryjne (pipety, cylindry, lejki) używane jedynie do czystych lotnych rozpuszczalników organicznych po wysuszeniu jest nadal czyste. Szkło laboratoryjne używane do próbki lipidów należy po zakończeniu analiz dokładnie umyć w roztworze detergentu, dokładnie wypłukać i wysuszyć. Proszę podpisywać szkło laboratoryjne pisakiem do szkła, aby zapobiec ewentualnym pomyłkom. Bloczek grzejny należy wcześniej (na początku wykonywania ćwiczenia) ustawić oraz ustabilizować temperaturę 50 °C (ustawienie pokrętki na regulatorze mocy pomiędzy 0 a 1).*

### 1. Ekstrakcja lipidów z żółtka jajka kurzego metodą Folcha

Odważyć około 20 mg liofilizatu żółtka z dokładnością do 0,1 mg i zanotować masę próbki. Przenieść ilościowo próbkę do próbówki szklanej o obj. 25 ml z dopasowanym korkiem. Do próbówki odmierzyć 20 ml roztworu chloroform-metanol (2:1), następnie dodać 0,2 ml roztworu wzorca wewnętrznego - n-dokozanu o stężeniu  $c = 10$  mg/ml i zawartość wymieszać poprzez intensywne wstrząsanie a następnie mieszanie przy użyciu Vortexu (3 min). Ekstrahować próbkę w ciągu 15 min na łaźni ultradźwiękowej w temp. pokojowej a następnie powtórnie wymieszać (3 min) i ponownie ekstrahować (15 min). Próbówkę do łaźni ultradźwiękowej należy wstawić w napełnionym wodą szklanym cylindrze. Do próbówki odmierzyć 4 ml 0,9% roztworu NaCl, zawartość wymieszać poprzez intensywne wstrząsanie (3 min) a następnie pozostawić do całkowitego rozdzielenia się warstw. Za pomocą pipety o obj. 5 ml należy ostrożnie całkowicie usunąć warstwę wodną (górną). Dolną warstwę chloroformowo-metanolową zawierającą wyekstrahowane lipidy należy wysuszyć za pomocą bezwodnego siarczanu sodu, przesączyć i wprowadzić do kolbki. Ekstrakt należy odparować do sucha za pomocą wyparki obrotowej w temp. nieprzekraczającej 40 °C.

*Potrzebne szkło i odczynniki:*

*roztwór chloroform-metanol (2:1) (150 ml),*

*0,9% wodny roztwór NaCl (250 ml),*

*mały słoik szklany,*

*bagietka szklana,*

*pipeta Pasteura,*

*pompka do pipet,*

*2 cylindry szklane o obj. 10 ml oraz 2 dopasowane do nich małe lejki,*

*próbówka szklana o obj. 25 ml zamykana plastikowym korkiem,*

*cylinder szklany,*

*pipeta o obj. 5 ml ( o średnicy zew. mniejszej niż średnica wew. próbówki),*

*kolbka z dnem konicznym o obj. 50 ml z korkiem szklanym,*

*średni lejek pasujący do kolbki,*

*pisak do szkła,*

*roztwór wzorca wewnętrznego n-dokozanu w heksanie  $c = 10$  mg/ml.*

### 2. Transestryfikacja próbki lipidów

*Uwaga: Reakcja z użyciem roztworu metanolanu sodu wymaga bezwodnych warunków, co oznacza, że należy przechowywać go w zakręconym naczyniu i szybko pobierać idealnie suchą pipetą; również próbka lipidów musi być sucha. Należy pamiętać, że po otwarciu naczynia roztwór chłonie wilgoć z powietrza.*

Próbkę wydzielonych lipidów (o masie do 50 mg), rozpuszczonych w 1 ml toluenu, należy przenieść do próbówki o obj. 15 ml zamykanej plastikowym korkiem. Do próbki dodać za pomocą suchej pipety 2 ml roztworu 0,5 M metanolanu sodu w bezwodnym metanolu. Roztwór należy ogrzewać w bloczku grzejnym w temperaturze 50 °C w ciągu 10 min. Po zakończeniu reakcji transestryfikacji próbkę należy ochłodzić, dodać 5 ml 2% wodnego roztworu kwasu octowego i intensywnie wymieszać. Po zobojętnieniu próbki należy wyekstrahować uzyskane estry metylowe kwasów tłuszczowych poprzez intensywną ekstrakcję heksanem (5 ml) z fazy metanolowo-wodnej używając pipety do ostrożnego wydzielenia warstwy heksanowej (górnej) po rozdzieleniu się warstw. Należy pobrać jedynie warstwę górną nie naruszając warstwy dolnej; w razie trudności można zostawić odrobinę warstwy górnej w próbówce ze względu na to, że do analizy ilościowej zastosowano wzorzec wewnętrzny dodany na początkowym etapie procedury wyodrębniania i spochadniania próbki. Ekstrakcję należy powtórzyć (5 ml heksanu). Połączone ekstrakty heksanowe należy wysuszyć za pomocą bezwodnego siarczanu sodu, przesączyć i zatężyć na wyparce obrotowej do objętości około 1 ml.

*Potrzebne szkło i odczynniki:*

*2 próbówki szklane o obj. 15 ml zamykana plastikowym korkiem,*

*2 pipety o obj. 5 ml ( o średnicy zew. mniejszej niż średnica wew. próbówki),*

*pipeta o obj. 5 ml,*

*pompka do pipet,*

*2 kolbki z dnem konicznym o obj. 50 ml z korkiem szklanym,*

*2 średnie lejki do przesączenia ekstraktu heksanowego pasujące do kolbki*

*2 cylindry szklane o obj. 10 ml oraz 2 dopasowane do nich małe lejki*

*łyżka,*

*reduktor pasujący do kolbki*

*0,5 M roztwór metanolanu sodu w metanolu (wykonany poprzez rozpuszczenie 1,4 g sodu w 50 ml bezwodnego metanolu)*

*2% wodny roztwór kwasu octowego (100 ml)*

*heksan destylowany (50 ml)*

*toluen destylowany (50 ml)*

*bezwodny siarczan sodu,*

*sączki*

### **3. Bezpośrednia transestryfikacja lipidów**

Zważyć zakręcane szklane naczynko o objętości 4 ml z dokładnością do 0,1 mg. Wprowadzić do naczynka około 20 mg żółtka. Pobraną próbkę żółtka należy zważyć z dokładnością do 0,1 mg i masę próbki zanotować. Następnie do próbki dodać 1 ml toluenu oraz 0,2 ml roztworu wzorca wewnętrznego - n-dokozanu o stężeniu  $c = 10$  mg/ml. Do próbki dodać za pomocą suchej pipety 2 ml roztworu 0,5 M metanolanu sodu w bezwodnym metanolu i intensywnie wymieszać. Roztwór należy ogrzewać w bloczku grzejnym w temperaturze 50 °C w ciągu 10 min, następnie poddać działaniu łaźni ultradźwiękowej przez 5 minut i ponownie ogrzewać w bloczku grzejnym w temperaturze 50 °C w ciągu 10 min okazjonalnie wstrząsając. Po zakończeniu reakcji transestryfikacji próbkę należy ochłodzić i dalej należy postępować według procedury **transestryfikacji próbki lipidów** (punkt 2), z tym, że należy przenieść próbkę do próbówki o obj. 15 ml zamykanej plastikowym korkiem w celu ekstrakcji estrów metylowych.

*Potrzebne szkło i odczynniki:  
pipeta Pasteura,  
zakręcane szklane naczynko o objętości 4 ml.*

#### **4. Analiza chromatograficzna GC-FID i/lub GC/MS**

*Uwaga: Chromatograf gazowy należy wcześniej (na początku wykonywania ćwiczenia) włączyć i przygotować do analiz. Analizy chromatograficzne są długotrwałe – należy dobrze rozplanować ich wykonanie.*

Należy wykonać następujące analizy chromatograficzne:

1. Analizę roztworu wzorca wewnętrznego o stężeniu  $c = 1$  mg/ml w celu oznaczenia jego czasu retencji,
2. Analizę wzorcowego roztworu estrów metylowych kwasów tłuszczowych w celu oznaczenia ich czasów retencji,
3. Analizy przygotowanych próbek lipidów z żółtka jaja kurzego,
4. Analizę roztworu wzorca cholesterolu o stężeniu  $c = 1$  mg/ml w celu oznaczenia jego czasu retencji.

Warunki pracy chromatografu gazowego:

- kolumna kapilarna RTX-5, długość 25 m, średnica wewnętrzna 0,25 mm,
- temperatura dozownika 320 °C, temperatura detektora 320 °C,
- analiza w warunkach programowanej temperatury kolumny od 170 °C do 240 °C, narost temperatury 4 °C/min, a następnie od 240 °C do 320 °C, narost temperatury 8 °C/min, izotermicznie 10 min,
- gaz nośny - argon, ciśnienie gazu nośnego 90 kPa,
- detektor płomieniowo - jonizacyjny FID,
- objętość dozowania próbki ~1 ml,

Warunki analiz GC/MS należy ustalić z prowadzącym ćwiczenia

*Potrzebne szkło i odczynniki:*

*chlerek metylenu do mycia strzykawki chromatograficznej (25 ml),  
strzykawka chromatograficzna 10 ml oraz 100 ml,  
roztwór wzorcowy estrów metylowych kwasów tłuszczowych oznaczony „jajko I”,  
roztwór wzorca wewnętrznego n-dokozanu w toluenie  $c = 1$  mg/ml,  
roztwór wzorca cholesterolu w toluenie  $c = 1$  mg/ml.*

#### **5. Opracowanie wyników analiz**

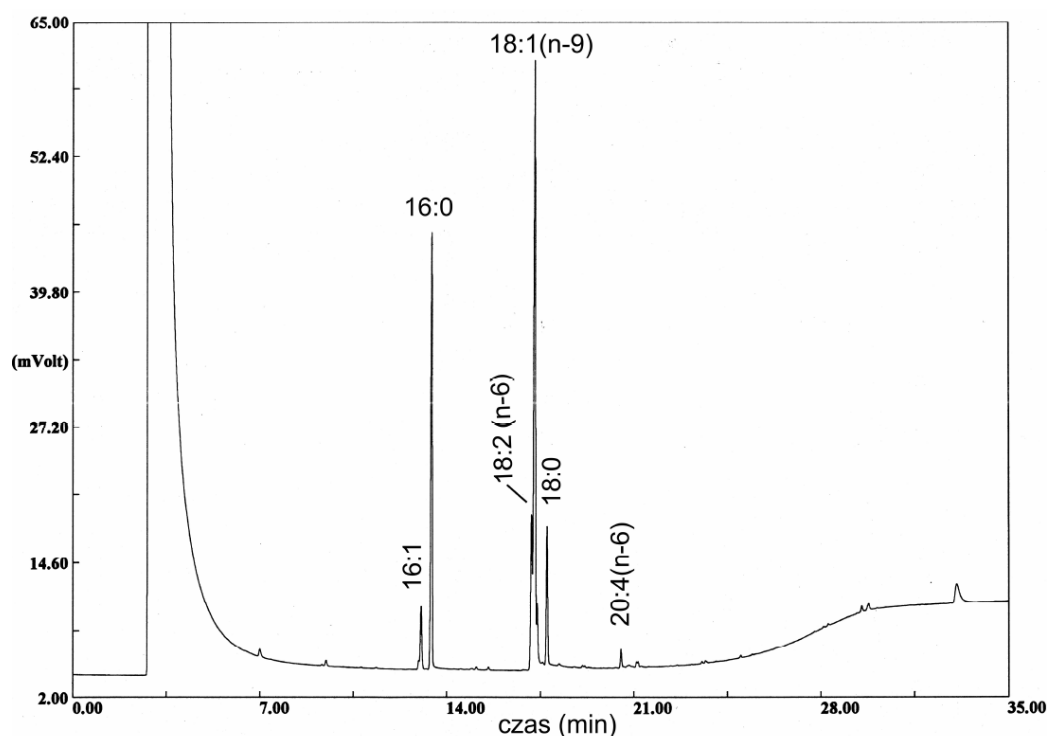
Po wykonaniu analiz należy:

1. Zidentyfikować estry metylowe kwasów tłuszczowych oraz cholesterol w badanej próbce,
2. Określić zawartość kwasów tłuszczowych oraz cholesterolu w przeliczeniu na masę żółtka,
3. Obliczyć zawartość procentową kwasów tłuszczowych w sumie kwasów tłuszczowych,
4. Porównać profile kwasów tłuszczowych z lipidów żółtka jaja kurzego oznaczone 2 różnymi metodami i przedyskutować wyniki,
5. Porównać uzyskane profile kwasów tłuszczowych z chromatogramem zamieszczonym na Rys. 1.
6. Przedyskutować wpływ warunków chromatograficznych na uzyskanie rozdzielania pików chromatograficznych.

Prawidłowo wykonane sprawozdanie powinno zawierać pełną dokumentację analizy jakościowej oraz ilościowej (należy załączyć uzyskane chromatogramy wraz z odpowiednim opisem, patrz rys. 1; należy podać i porównać czasy retencji wzorców i analitów).

## 6. Zagadnienia do przygotowania

1. Chromatografia gazowa – teoria procesu chromatograficznego, sprzęt, dobieranie warunków analizy, analiza ilościowa i jakościowa.
2. Lipidy – definicja, występowanie, budowa, nomenklatura.
3. Analiza lipidów.
4. Reakcje hydrolizy, estryfikacji i transestryfikacji.
5. Procedura analizy kwasów tłuszczowych z żółtka jaja kurzego.



Rys. 1. Przykładowy chromatogram GC-FID roztworu wzorcowego estrów metylowych kwasów tłuszczowych. Kolumna kapilarna RTX-5 (faza stacjonarna niepolarna), 25 m 0,25 mm; 0,25 mm grubość filmu fazy stacjonarnej. Analiza w warunkach programowanej temp. od 170 °C do 240 °C, narost temperatury 4 °C/min, a następnie od 240 °C do 320 °C, narost temperatury 8 °C/min, izotermicznie 10 min.

## Ćwiczenie 2 – przygotowanie próbek

### 1. Przygotowanie próbek

#### 1.1. 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 mL.

#### 1.2. 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 sączek 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 mL.

#### 1.3. Przygotowanie olejku eterycznego należy ustalić z prowadzącym ćwiczenia (próbka III)

### 2. Analiza chromatograficzna GC-FID i/lub GC/MS

*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.

### 3. Opracowanie wyników analiz

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).

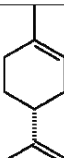

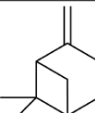
#### 3.1. Analiza jakościowa poprzez porównanie czasu retencji analitu z czasem retencji wzorca wyznaczonych w tych samych warunkach chromatograficznych (w programowanej temperaturze)

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.

#### 3.2. Wyznaczenie indeksów Kováts'a w warunkach programowanej temperatury

Należy wykonać analizę próbki oraz roztworu wzorcowego: mieszaniny *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
$\alpha$ -pinen		932
$\beta$ -pinen		974

### 3.3. Analiza GC-MS

Widma mas alkanów oraz terpenów wyizolowanych z badanych próbek wraz z obliczonymi indeksami retencji posłużą do identyfikacji związków. Na podstawie widm mas zidentyfikować poszczególne związki w próbkach.

### 4. 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.

### 5. 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.

### **Szkło i odczynniki**

roztwór wzorcowy mieszaniny *n*-alkanów: *n*-C9, *n*-C10, *n*-C11 przygotowany poprzez rozpuszczenie 2 ml każdego

związku w 1 ml heksanu,

roztwór wzorcowy limonenu,

roztwór wzorcowy  $\alpha$ -pinenu,

chlerek metylenu do mycia strzykawki – 2 szt

strzykawka do GC 10  $\mu$ L – 2 szt

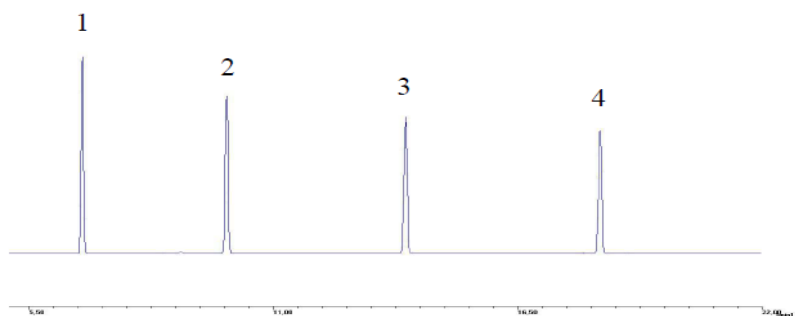
Ekstrakcja olejku eterycznego ze skórek owoców cytrusowych – (próbka I)

kolbka stożkowa z korkiem 10 mL – 3 szt

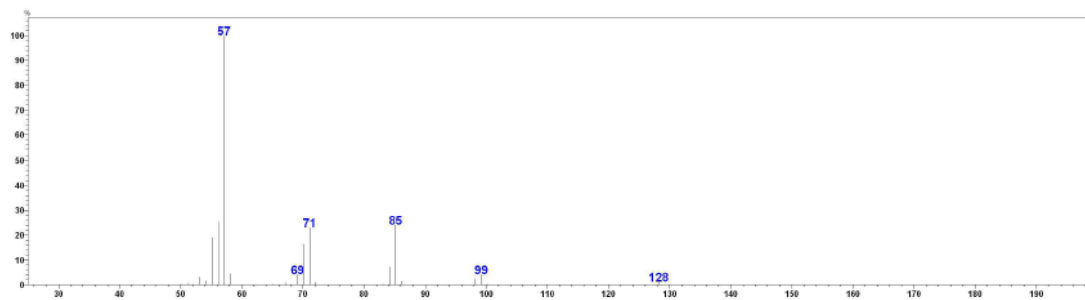
naczynko zakręcane 1,5 mL oraz mały lejek i sączki – 3 szt,

*pipeta 5 mL, pompka do pipet,  
heksan 50 mL  
nóż i płytka 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*

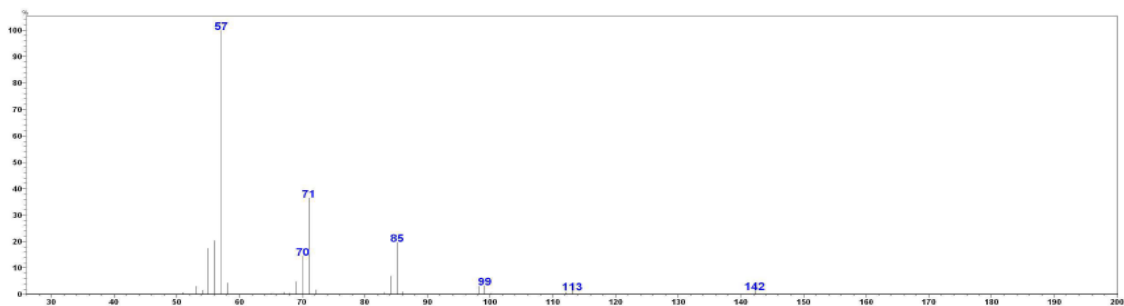
**Materiały do opracowania (proszę przynieść wydrukowane na zajęcia)**



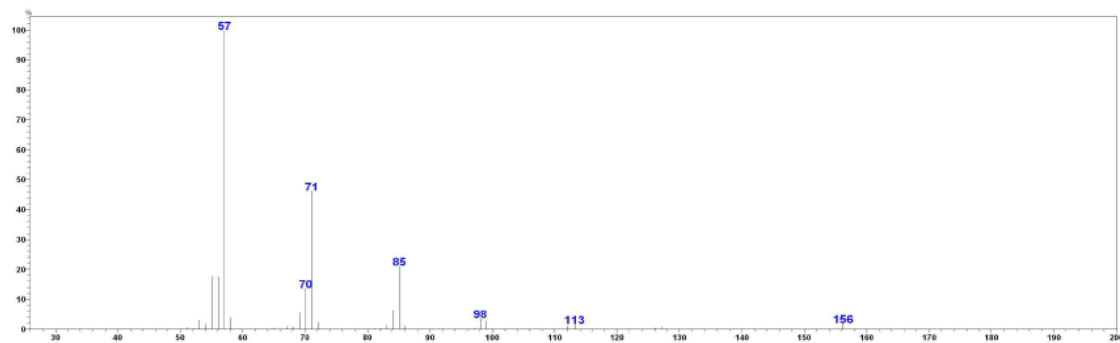
Rys. 1. Chromatogram GC roztworu wzorcowego alkanów: C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>



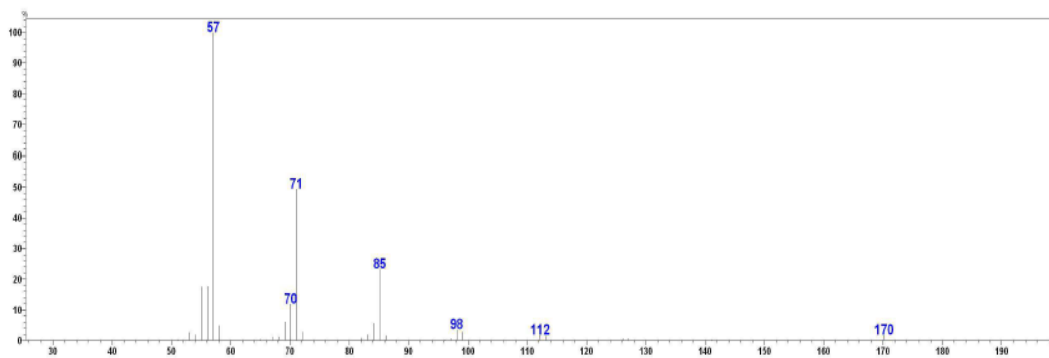
Rys. 2. Widmo mas (EI) nonanu C<sub>9</sub>H<sub>20</sub> (pik nr 1 na rys.1).



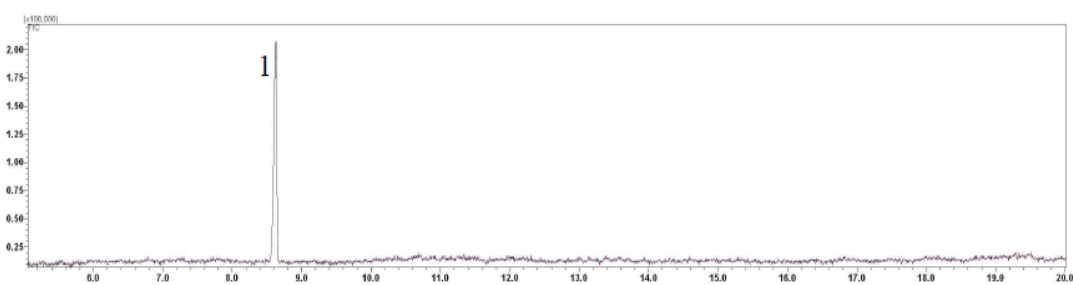
Rys. 3. Widmo mas (EI) dekanu C<sub>10</sub>H<sub>22</sub> (pik nr 2 na rys.1).



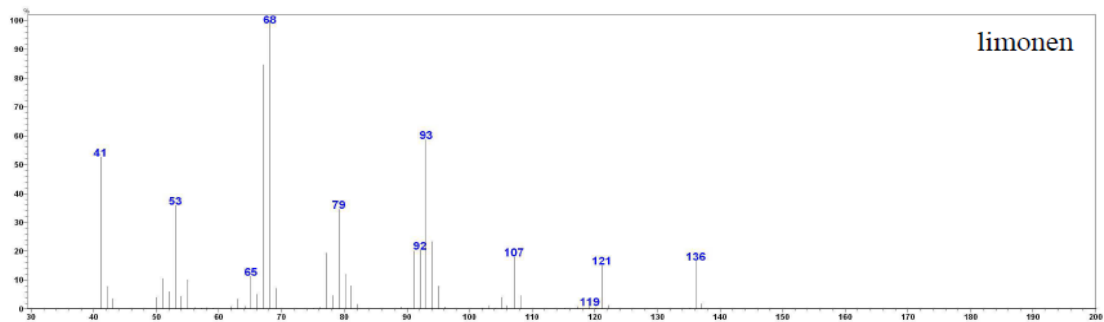
Rys. 4. Widmo mas (EI) undekanu C<sub>11</sub>H<sub>24</sub> (pik nr 3 na rys.1).



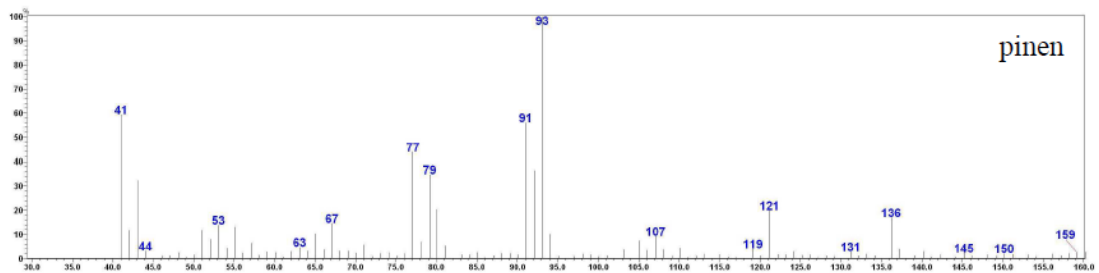
Rys. 5. Widmo mas (EI) dodekanu  $C_{12}H_{26}$  (pik nr 4 na rys.1).



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



Rys. 7. Widmo mas limonenu



Rys. 8. Widmo mas pinenu