

## Ćwiczenie nr VIIb-S

# ZWILŻALNOŚĆ. ADSORPCYJNA CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA

## I. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zbadanie procesu zwilżania sproszkowanego ciała stałego przez roztwory barwników przy zastosowaniu metody chromatografii cienkowarstwowej oraz poznanie zasad doboru optymalnych warunków prowadzenia procesu chromatograficznego przy rozdziale mieszanin.

## II. Zagadnienia wprowadzające

1. Swobodna energia powierzchniowa a proces zwilżania.
2. Podstawy metody chromatograficznej.
3. Adsorbenty stosowane w chromatografii cienkowarstwowej.
4. Barwniki kosmetyczne.

### Literatura obowiązuująca:

1. Z. Witkiewicz „Podstawy chromatografii”, WNT Warszawa, 1995, str. 219–258.
2. J. Kirkland, „Współczesna chromatografia cieczowa”, PWN Warszawa, 1976, str. 165–168.
3. J. Ościk, „Adsorpcja”, PWN Warszawa, 1979, str. 225–228, 230–242.
4. A. Anastasiu, E. Jelescu, „Środki powierzchniowo czynne”, WNT Warszawa, 1973.
5. A. Marzec, „Chemia kosmetyków”, Dom Organizatora Toruń 2005, str. 67-69.
6. R. Zieliński, „Surfaktanty, towaroznawcze i ekologiczne aspekty ich stosowania”, Wydawnictwo AE Poznań, 2000.
7. B. Ościk-Mendyk, „Ćwiczenia laboratoryjne z fizykochemii granic faz” UMCS Lublin 2000, Ćw. nr XII, str. 199-211.
8. A.E. Wiącek, L. Hołysz „Zwilżalność. Równanie Washburna”, Ćw. nr VIIa-S, str. 2-8.

### III. Część teoretyczna

#### III. 1. Swobodna energia powierzchniowa a proces zwilżania

Teoria do punktu III. 1. znajduje się w ćwiczeniu nr VIIa-S.

#### III. 2. Podstawy metody chromatograficznej

##### III. 2.1. Parametry retencyjne

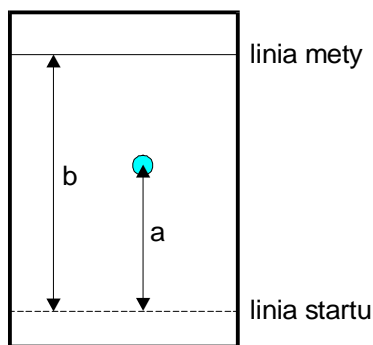
**Chromatografia** należy do metod rozdzielania polegających na zróżnicowaniu szybkości poruszania się cząsteczek poszczególnych składników mieszaniny. Układ chromatograficzny składa się z fazy ruchomej i fazy nieruchomej. W trakcie procesu chromatograficznego badana substancja dzieli się pomiędzy te dwie fazy. W adsorpcyjnej chromatografii cieczowej fazą nieruchomą jest adsorbent, fazą ruchomą zaś ciecz jedno- lub wieloskładnikowa. Rozdział analizowanych substancji wynika z różnego powinowactwa cząsteczek rozdzielanych substancji do miejsc aktywnych adsorbentu. Różnice w powinowactwie adsorpcyjnym (selektywna adsorpcja) są wynikiem różnej budowy i charakteru chemicznego substancji. Substancje wykazujące większe powinowactwo adsorpcyjne do danego adsorbentu (silniej adsorbują się) są silniej hamowane przez adsorbent, substancje słabiej adsorbujące się szybciej poruszają się wzdłuż złoża adsorbentu. Miarą podziału substancji pomiędzy dwie fazy jest **współczynnik retencji**  $k$  definiowany jako:

$$k = \frac{\text{ilość substancji w fazie nieruchomej}}{\text{ilość substancji w fazie ruchomej}}$$

Zależy on od rodzaju chromatografowanej substancji (charakteru chemicznego, budowy cząsteczki, rodzaju, ilości i położenia grup funkcyjnych).

Adsorpcyjna chromatografia cienkowarstwowa (planarna) jest metodą analityczną szybką i taną, dlatego też często stosowaną zarówno w laboratoriach analitycznych jak i przemysłowych. W chromatografii cienkowarstwowej parametrem retencyjnym jest wielkość  $R_F$  wyrażana jako:

$$R_F = \frac{a}{b} = \frac{\text{dystans przebyty przez środek plamki}}{\text{dystans przebyty przez czoło fazy ruchomej}}$$

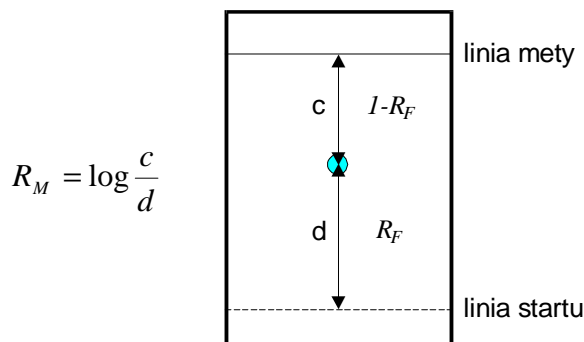


**Rys. 1.** Metoda wyznaczania  $R_F$  z chromatogramu.

Współczynnik retencji  $k$  związany jest z wielkością  $R_F$  następującym wyrażeniem:

$$k = \frac{1 - R_F}{R_F} \quad \text{lub} \quad \log k = \log \frac{1 - R_F}{R_F} = R_M \quad (2)$$

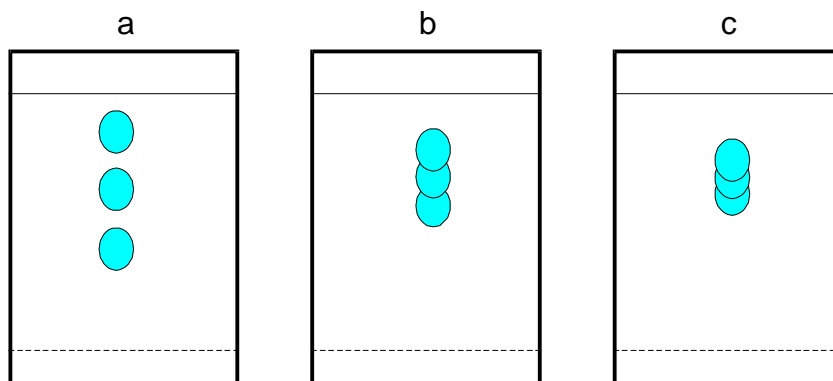
Wartość współczynnika  $R_M$  obliczona z chromatogramu wynosi:



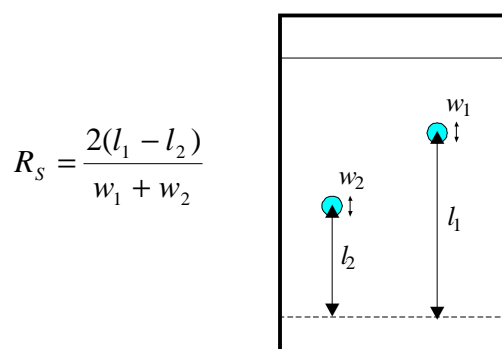
**Rys. 2.** Metoda wyznaczania  $R_M$  z chromatogramu.

W zależności od układu chromatograficznego wartość  $R_F$  substancji może osiągać wartość  $0 \leq R_F \leq 1$ . Substancja bardzo silnie adsorbująca się w danym układzie osiąga wartość  $R_F = 0$  (zostaje na linii startu). Gdy jej adsorpcja jest minimalna wędruje z czołem fazy ruchomej i wówczas jej  $R_F = 1$ . Chromatografię cienkowarstwową można wykorzystać do rozdzielu próbki (mieszaniny) na pojedyncze składniki. Prowadząc analizę nieznannej mieszaniny (np. barwników) można na podstawie wartości  $R_F$  wzorców substancji i wartości  $R_F$  substancji otrzymanych z rozdzielania mieszaniny określić jej skład.

Na wartości parametrów retencji analizowanej substancji wpływa wiele czynników: rodzaj i jakość adsorbentu, rodzaj fazy ruchomej, budowa badanej substancji, warunki prowadzenia procesu (temperatura, kształt i wielkość plamki, stopień wysycenia komory parami fazy ruchomej).



**Rys. 3.** Schemat rozdziału mieszaniny: a – bardzo dobry, b – wystarczający, c – zły rozdziel modelowej mieszaniny na poszczególne składniki. Wielkością charakteryzującą rozdziel chromatograficzny jest wielkość  $R_s$ :



**Rys. 4.** Metoda wyznaczania  $R_s$  z chromatogramu.

gdzie  $l_1$  i  $l_2$  oznaczają odległości środków plamek substancji 1 i 2 od linii startu,  $w_1$  i  $w_2$  to szerokości plamek. Uzyskana wartość  $R_s$  powyżej 0.9 informuje nas o wystarczającym rozdziale składników mieszaniny.

Wymienione wyżej czynniki mogą sprawić, że kształt plamek będzie odbiegał od idealnie symetrycznego. Czynniki te będą bowiem wpływać na liniowość izoterm adsorpcji testowej substancji. W niektórych układach może dojść do tzw. „ogonowania” substancji. W takim przypadku wartość  $R_F$  substancji określa się biorąc pod uwagę maksimum stężenia w ogonującej próbce. Bardzo silne ogonowanie dowodzi, że wybrany został nieodpowiedni układ rozwijający (adsorbent + faza ruchoma).

W celu optymalizacji warunków prowadzenia analizy w adsorpcyjnej chromatografii cienkowarstwowej należy zwrócić uwagę na dobór odpowiedniego adsorbentu i odpowiedniej fazy ruchomej. W związku z tym należy zapoznać się z właściwościami adsorbentów. W tabeli przedstawiono podział adsorbentów najczęściej stosowanych w chromatografii planarnej.

Rodzaj adsorbentu	Typowy przedstawiciel
polarny nieorganiczny (hydrofilowy)	żel krzemionkowy, tlenek glinowy, krzemian magnezu
niepolarny nieorganiczny	węgiel aktywowany, sadza grafitowana
chemicznie modyfikowane fazy polarne	aminopropylowe, cyjanopropylowe, diolowe fazy związane
chemicznie modyfikowane fazy niepolarne	silanizowany żel krzemionkowy, RP: C <sub>2</sub> , C <sub>4</sub> , C <sub>8</sub> , C <sub>18</sub>
polarne organiczne	Celuloza, chityna, poliamid

### III. 2.2. Dobór fazy ruchomej

W adsorpcyjnej chromatografii cienkowarstwowej najczęściej stosuje się dwuskładnikowe fazy ruchome dobrane tak, aby zapewnić optymalną zdolność rozdzielczą układu. Rozpuszczalniki wchodzące w skład fazy ruchomej nie mogą: reagować w sposób nieodwracalny z fazą nieruchomą, zmieniać charakteru chemicznego substancji chromatografowanej oraz zawierać zanieczyszczeń.

W adsorpcyjnej chromatografii cieczowej pomocne w wyborze odpowiedniego składu fazy ruchomej są tzw. *szeregi eluotropowe*. Kryterium podziału jest polarność rozpuszczalników uporządkowana dla danego typu adsorbentu. Na podstawie szeregów eluotropowych można określić właściwości elucyjne mieszaniny różnych rozpuszczalników o różnych stężeniach. Gdy składniki fazy ruchomej znacznie różnią się siłą elucyjną to podczas rozwijania chromatogramu mamy do czynienia ze zjawiskiem *demiksji* (plamka spłaszczona i rozmyta w kierunku prostopadłym do poruszania się fazy ruchomej). Im bardziej polarny rozpuszczalnik tym silniej się adsorbuje, a tym samym adsorpcja substancji testowej (np. barwnika) jest mniejsza ze względu na zachodzący proces adsorpcji konkurencyjnej.

## III. 3. Adsorbenty stosowane w chromatografii cienkowarstwowej

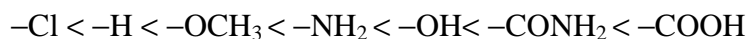
### III. 3.1. Budowa żelu krzemionkowego a oddziaływania powierzchniowe

Żel krzemionkowy to adsorbent hydrofilowy, typowy przedstawiciel polarnych adsorbentów nieorganicznych. Właściwości powierzchniowe adsorbentu otrzymanego przez polimeryzację kwasu krzemowego zależą od metody otrzymywania i termicznej aktywacji. Powierzchnia właściwa adsorbentu wynosi zazwyczaj od 100 m<sup>2</sup>/g do 800 m<sup>2</sup>/g.

Proces wygrzewania żelu w temperaturze ok. 200<sup>0</sup>C powoduje usunięcie z jego powierzchni wody zaadsorbowanej fizycznie. Na powierzchni pozostają funkcyjne grupy hydroksylowe, związane ze szkieletem wiązaniami kowalencyjnymi oraz grupy siloksanowe. Obecność na powierzchni tych dwu rodzajów grup decyduje o właściwościach powierzchniowych żelu. Grupy hydroksylowe (silanolowe) uważane są za silne centra adsorpcyjne (nie

równocenne pod względem zdolności adsorpcyjnych) dzięki specyficznym oddziaływaniom z cząsteczkami adsorbentu na skutek tworzenia mostków wodorowych lub ogólniej wiązań donorowo-akceptorowych (kwasowo-zasadowych). O specyficznych właściwościach adsorpcyjnych żelu decyduje ilość grup OH przypadających na jednostkę powierzchni oraz rodzaj tworzonych przez nie centrów adsorpcyjnych. Wygrzewanie żelu w wyższych temperaturach powoduje usunięcie z powierzchni grup hydroksylowych, przez co właściwości hydrofilowe zmieniają się na skutek tworzenia wiązań siloksanowych. Powierzchniowe grupy siloksanowe nie mają charakteru polarnego i traktowane są zazwyczaj jako miejsca apolarne, hydrofobowe, które nie mogą tworzyć wiązań wodorowych, co prowadzi do obniżenia zdolności adsorpcyjnych. Znajomość liczby powierzchniowych grup hydroksylowych w warunkach całkowitej hydroksylacji umożliwia określenie maksymalnej aktywności adsorpcyjnej żelu. Przyjmuje się, że średnia liczba grup OH na maksymalnie zhydroksylowanej powierzchni (suszenie SiO<sub>2</sub> w próżni w temperaturze ok. 200°C) wynosi 4,6 grup/nm<sup>2</sup>. W miarę podwyższenia temperatury wygrzewania próbek, hydrofilowa powierzchnia żelu staje się hydrofobowa na skutek dehydroksylacji i tworzenia się mostków siloksanowych:

O właściwościach adsorpcyjnych żelu krzemionkowego decydują swobodne i bliźniacze grupy hydroksylowe. Żel krzemionkowy wykazuje silne powinowactwo do substancji elektronodonorowych i elektronoakceptorowych. Wielkość adsorpcji rośnie wraz ze wzrostem liczby wiązań podwójnych i polarnych grup funkcyjnych występujących w cząsteczkach substancji penetrujących żel krzemionkowy. Obecność grup funkcyjnych w cząsteczce zwiększa zazwyczaj jej powinowactwo do żelu, przy czym efekt ten rośnie w następującej kolejności:



Przemieszczanie się substancji na żelu krzemionkowym jest przede wszystkim wynikiem tworzenia się wiązań wodorowych pomiędzy grupami funkcyjnymi substancji a miejscami aktywnymi żelu. W zależności od rodzaju i budowy barwnika zachodzi lub nie zachodzi proces adsorpcji. Możliwość powstawania wewnętrznego mostka wodorowego w cząsteczce barwnika osłabia zdolność adsorbowania się substancji.

### III. 3.2. Budowa tlenku glinowego a oddziaływania powierzchniowe

Tlenki glinowe określają grupę związków zawierających oprócz  $\text{Al}_2\text{O}_3$  różne ilości wody (w postaci powierzchniowych grup hydroksylowych lub w postaci zaadsorbowanej) oraz tlenki metali ziem alkalicznych. Tlenki glinowe stosowane najczęściej w chromatografii planarnej mają zwykle strukturę  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  (klasyfikacja Lippensa) i powierzchnię właściwą rzędu 100–200  $\text{m}^2/\text{g}$ . Powierzchnię tlenku tworzą jony  $\text{O}^{2-}$  oraz jony  $\text{Al}^{3+}$ . Jony  $\text{Al}^{3+}$  zajmują 2/3 pozycji im przypadających, pozostałe nie wypełnione miejsca to defekty powierzchni.

Na powierzchni tlenku glinowego istnieją cztery rodzaje centrów aktywnych: jony  $\text{Al}^{3+}$  (kwasowe), jony  $\text{O}^{2-}$  (zasadowe), zjonizowane grupy  $-\text{OH}$  (zasadowe), protonowe defekty powierzchni (elektronoakceptorowe). Większość substancji adsorbują się na aktywnych miejscach kwasowych (jony  $\text{Al}^{3+}$ ). Obserwuje się szczególnie silną adsorpcję na tych miejscach węglowodorów nienasyconych lub aromatycznych. Na zasadowych miejscach aktywnych (jony  $\text{O}^{2-}$ ) adsorbują się głównie cząsteczki posiadające grupy kwasowe. Protonowe defekty powierzchni zachowują się podobnie jak miejsca aktywne o charakterze kwasowym. Adsorpcja na grupach  $-\text{OH}$  jest niewielka, o czym świadczy wzrastająca aktywność adsorpcyjna  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  wraz z podwyższeniem temperatury aktywacji (usuwanie grup  $\text{OH}$ ). Przyjmuje się, że oddziaływania powierzchniowe na tlenku glinowym mają charakter głównie elektrostatyczny.

### III. 4. Barwniki kosmetyczne

Barwniki to związki organiczne barwne lub bezbarwne absorbujące światło widzialne lub bliski nadfiolet oraz mające zdolność trwałego zabarwiania innych substancji. Barwniki mogą być pochodzenia naturalnego i syntetycznego, co przyjmuje się za główne kryterium ich podziału. Do barwników naturalnych, pozyskiwanych z surowców roślinnych i zwierzęcych, zaliczamy:

- karotenoidy ( $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten, luteina),
- antocyjany (pelargonidyna, cyjanidyna),
- flawonoidy (kwercetyna, apigenina),
- chlorofile (chlorofil a).

Do barwników syntetycznych zaliczamy:

- barwniki azowe (oranż metylowy, czerwień Kongo, tartrazyna),
- barwniki trifenylometanowe (zieleń malachitowa, fenoloftaleina, fluoresceina, eozyna, erytrozyna),
- barwniki antrachinonowe (alizaryna),
- barwniki tiazynowe (błękit metylenowy),
- indygoide (indygotyna),
- inne (kurkumina, żółcień chinolinowa).

Barwniki wykorzystywane w przemyśle kosmetycznym muszą spełniać szereg wymogów. Przede wszystkim muszą to być substancje nieszkodliwe dla zdrowia, ze względu na przenikliwość skóry (pudry, róże, farby, tusze, cienie do powiek, lakiery) i możliwość dostania się do organizmu (pomadki, konturówki).

Do barwników naturalnych stosowanych w kosmetyce zaliczamy głównie:

- chlorofil (bardzo trwały barwnik, ma właściwości dezynfekcyjne, przyjmuje różne odcienie zieleni, jest wykorzystywany w pastach do zębów, mydłach, kremach),
- karoten (barwnik pomarańczowy - samoopalacze i olejki z prowitaminą A),
- szafran (barwnik żółtoczerwony stosowany do produkcji kremów i pomadek),
- henna (barwnik utleniający się na powietrzu do różnych odcieni, jest wykorzystywany do produkcji farb do włosów),
- karmin (barwnik pochodzenia zwierzęcego do wyrobu pomadek i kredek do ust),

Barwniki syntetyczne stosowane w przemyśle kosmetycznym dzieli się zazwyczaj na:

- rozpuszczalne w wodzie lub innym rozpuszczalniku (czerwona eozyna, żółtozielona fluoresceina wykazująca silną zieloną fluorescencję, czerwona rodamina z niebieską fluorescencją),
- nierozpuszczalne w wodzie i innych rozpuszczalnikach (laki - pigmenty).



## IV. Część doświadczalna

### A. Aparatura i odczynniki

1. Sprzęt:
  - komory do chromatografii planarnej – 2 szt.,
  - ponumerowane od (1) do (10) buteleczki zawierające testowe substancje – 10 szt.,
  - pojemniki na fazy ruchome – 2 szt.,
  - pipety o poj.  $5\text{ cm}^3$  – 3 szt.,
  - zlewka o poj.  $50\text{ cm}^3$  – 1 szt.,
  - płytki chromatograficzne pokryte  $\text{SiO}_2$  (lub  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ),
  - pocięte kawałki bibuły,
  - kapilarki do nakraplania substancji – 10 szt.,
  - eksykator.
2. Odczynniki:
  - heksan, toluen, aceton,
  - numerowane kolbki z substancjami: (1) 2-nitroanilina, (2) 3-nitroanilina, (3) azobenzen, (4) sudan II, (5) 4-metylo-2-nitroanilina (6) 2-metylo-5-nitroanilina, (7) 2-metylo-4-nitroanilina, (8) mieszanka (9) eozyna, (10) fluoresceina.

### B. Program ćwiczenia

1. Przygotowanie faz ruchomych.
2. Przygotowanie płytek do analizy.
3. Rozwinięcie chromatogramów.

### C. Sposób wykonania ćwiczenia

1. Przygotowanie faz ruchomych.

Sporządzić po  $5\text{ cm}^3$  następujących faz ruchomych:

- heksan + toluen 3:2,
- heksan + aceton 3:2.

2. Przygotowanie płytek do analizy.

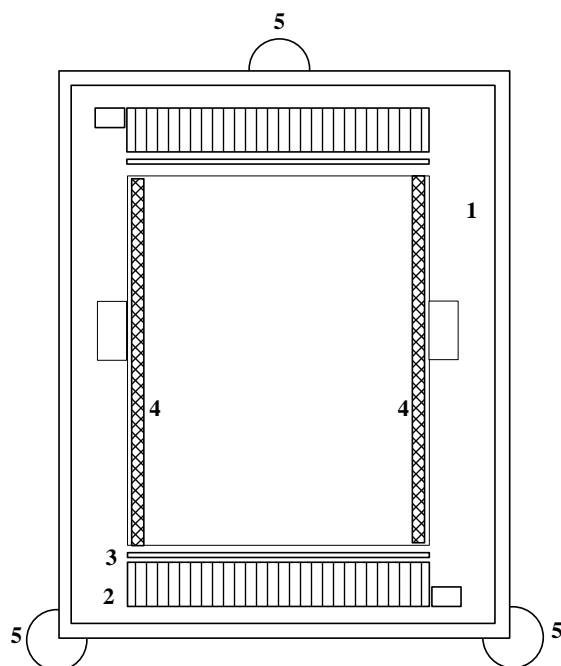
Na płytki chromatograficzne należy nakraplać substancje w odległości 1 cm jedna od drugiej, zachowując odległość od boków płytki przynajmniej 0,5 cm. Linie startu (9 cm od końca płytki) i miejsce, w którym będą nakraplane substancje delikatnie oznaczyć ołówkiem, aby nie zdrapać adsorbentu. Substancje nakraplać ponumerowanymi kapilarkami (do każdej substancji stosujemy inną) tak, aby plamki na adsorbencie miały średnicę max. 3 mm. Substancje można nakropić od razu na obie płytki. Na płytki żelu krzemionkowego (lub tlenku glinu, rodzaj adsorbentu określi prowadzący ćwiczenia) nakraplamy kolejno substancje z kolbek od (1) do (10). Po nakropieniu substancji kapilarki należy dokładnie umyć acetonem, osuszyć bibułą i umieścić w pojemniku.

3. Rozwijanie chromatogramu.

Wszystkie czynności związane z komorą należy wykonywać ostrożnie, aby nie stłuc szklanych elementów:

- zdjąć szklaną szybkę przykrywającą [1],
- przesunąć maksymalnie do siebie płytkę szklaną [2],
- włączyć fazę ruchomą pod płytkę [2] nie wyjmując jej z komory. Wlew fazy ruchomej znajduje się z boku płytki [2] (płytsze wgłębienie po prawej stronie). Gdy faza ruchoma podpłynie pod płytkę [2] należy ją przesunąć w kierunku występu [3] (do oporu). O tym czy komora jest wypoziomowana świadczy układ cieczy pod płytką [2]. Jeżeli ciecz gromadzi się z jednej strony płytki [2] należy śrubami [5] wypoziomować komorę tak, aby ciecz pod płytką była rozmieszczona równomiernie,
- włożyć do komory płytkę chromatograficzną z naniesionymi substancjami (adsorbentem do góry) w ten sposób, aby krawędź płytki z substancjami znajdowała się przy występie [3]. Płytkę powinna leżeć na krawędziach [4],
- płytkę chromatograficzną nasunąć na występ [3], przytrzymując jednocześnie płytkę [2] przy występie. W takim położeniu faza ruchoma powinna być zassana przez warstwę adsorbentu. Jeżeli faza ruchoma nie zostanie zassana należy poruszyć płytkę chromatograficzną i szklaną [2] (docisnąć je do siebie ponownie, nie wyjmując z komory),
- gdy faza ruchoma zostanie zassana przykryć komorę szybką [1] i czekać do momentu aż faza ruchoma dojdzie do linii mety (koniec płytki),
- gdy faza ruchoma dojdzie do linii mety należy zdjąć szybkę [1] i odsunąć płytkę [2] od występu [3] (zasysanie fazy ruchomej zostanie przerwane) wyjąć płytkę chromatograficzną z komory i umieścić ją pod dygestorium w celu odparowania fazy ruchomej,
- w ten sposób rozwinąć dwa chromatogramy używając różnych faz ruchomych,
- po rozwinięciu chromatogramu należy wyjąć z komory płytkę [2] (zwrócić uwagę na jej położenie, krótsza część na dole) i bibułą zebrać pozostałą fazę ruchomą. Jeżeli w trakcie rozwijania chromatogramu zabraknie fazy ruchomej pod płytką [2] to należy ją uzupełnić nie przerywając pomiaru. W tym celu należy przesunąć od siebie szybę [1] i dolać fazę ruchomą przez wlot obok płytki [2].

Po rozwinięciu chromatogramów komory umyć niewielką ilością acetonu i osuszyć bibułą, resztki fazy ruchomej w kolbkach wylać do butelki pod dygestorium z napisem ZLEWKI.



Rys. 5. Schemat komory chromatograficznej.

## D. Opracowanie wyników

1. Wyznaczyć wartości  $R_F$  i  $R_M$  wszystkich substancji w obu badanych układach.
2. Wyznaczyć wartości  $R_S$  dla użytej mieszaniny (kolbka 8).
3. Analizując wartości  $R_F$  i  $R_M$  substancji testowych wysunąć wnioski dotyczące ich adsorpcji w poszczególnych układach chromatograficznych.
4. Biorąc pod uwagę budowę użytych barwników kosmetycznych opisać wpływ struktury substancji na wartości parametrów chromatograficznych.
5. Na podstawie wartości  $R_F$  substancji testowych określić skład zadozowanej mieszaniny.
6. Na podstawie wartości zarówno  $R_F$ , jak i  $R_S$  podać najlepszy skład fazy ruchomej do rozdzielania mieszaniny.

Ze względu na wysoką cenę płytek są one regenerowane po zakończeniu ćwiczenia. Dlatego środek plamki substancji należy wyznaczyć jedynie przez przyłożenie linijki i odczytanie odległości.