

Brochwicz, Zbigniew

Zastosowanie barwników organicznych jako czynników kontrolnych w bibułowej chromatografii spływowej ciągłej w ramach identyfikacji węglowodanowych spoiw malarskich

Acta Universitatis Nicolai Copernici. Zabytkoznawstwo i Konserwatorstwo 21 (270), 7-28

1994

Artykuł został opracowany do udostępnienia w internecie przez Muzeum Historii Polski w ramach prac podejmowanych na rzecz zapewnienia otwartego, powszechnego i trwałego dostępu do polskiego dorobku naukowego i kulturalnego. Artykuł jest umieszczony w kolekcji cyfrowej bazhum.muzhp.pl, gromadzącej zawartość polskich czasopism humanistycznych i społecznych.

Tekst jest udostępniony do wykorzystania w ramach dozwolonego użytku.

Zakład Technologii
i Technik Malarskich

Zbigniew Brochwicz

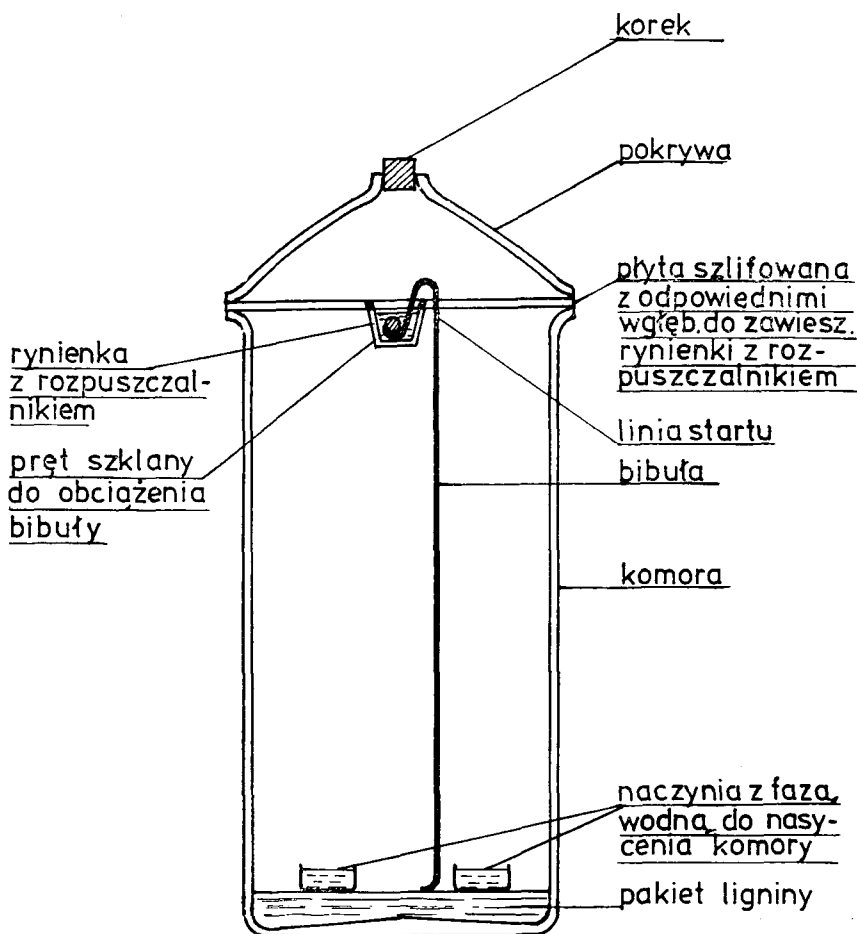
ZASTOSOWANIE BARWNIKÓW ORGANICZNYCH
JAKO CZYNNIKÓW KONTROLNYCH
W BIBUŁOWEJ CHROMATOGRAFII SPŁYWOWEJ CIĄGŁEJ
W RAMACH IDENTYFIKACJI
WĘGLOWODANOWYCH SPOIW MALARSKICH *

W chromatografii jednokierunkowej właściwej odróżnia się, obok chromatografii wstępującej, również chromatografię spływową lub inaczej zstępującą. W tym drugim przypadku w procesie rozwijania chromatogramów rozpuszczalnik (faza ruchoma — organiczna), znajdujący się w odpowiednim naczyniu (rynience) w górnej części komory (rys. 1), spływa wzdłuż paska bibuły w dół. Przepływ rozpuszczalnika zachodzi pod wpływem działania sił ciężkości. Ogólnie chromatografię spływową (zstępującą) określa się mianem techniki spływowej. Rozwijanie chromatogramów w technice spływowej prowadzić można trzema sposobami:

a. Przez jednokrotne rozwijanie chromatogramów w wybranym układzie rozwijającym i przerwanie tego procesu przed spływem fazy organicznej do końca paska. W ten sposób czoło rozpuszczalnika spływa do pewnej określonej długości paska (ca 2—3 cm od dolnego jego brzegu). Po wyjęciu z komory czoło rozpuszczalnika jest oznaczane ołówkiem bądź to w świetle białym, bądź też w promieniach UV. Mając dokładnie zaznaczone czoło rozpuszczalnika można dokładnie obliczyć R_f dla każdego składnika badanej substancji.

b. Przez wielokrotne rozwijanie chromatogramów w jednym i tym samym układzie rozwijającym, bądź też w dwóch różnych układach, stosowanych na przemian. Mimo stosunkowo długiego okresu rozwijania chromatogramów, metoda ta znacznie przewyższa rozwijanie jednokrotne, szczególnie wtedy, gdy chromatograficznemu rozdziałowi podlegają mieszaniny zawierające składniki trudno rozdzielające się na chromato-

* Część doświadczalną niniejszej pracy wykonano w latach 1978 i 1979, natomiast jej ostateczną redakcję i przygotowanie do druku zrealizowano na przełomie 1989 i 1990 r.



Rys. 1. Schemat komory „Chropa” produkcji NRD do rozwijania chromatogramów techniką splywową

gramie w rozwijaniu jednokrotnym. Wyniki uzyskane metodą wielokrotnego rozwijania chromatogramów z cukrami prostymi techniką wstępującą świadczą o tym najlepiej. W wariancie tym stosuje się rozwijanie 2—3-krotne, a w niektórych przypadkach wielokrotność ta może być zwiększona. Przy tym wariancie technicznym traci się jednak możliwość stosowania tzw. współczynnika podziału R_f poszczególnych składników, a to z tego względu, że po wielokrotnym rozwijaniu trudno jest za każdym razem uzyskać czoło rozpuszczalnika w identycznej odległości od linii startowej. W takim przypadku stosuje się więc w praktyce inny współczynnik podziału niż R_f , a mianowicie R_o , gdzie o = wybrany zwią-

zek, w stosunku do którego oblicza się współczynnik podziału innych składników¹. Odnosi się to zarówno do chromatogramów rozwijanych wielokrotnie techniką wstępującą, jak i spływową.

c. Przez chromatografię spływową ciągłą, polegającą na tym, że faza ruchoma (organiczna) spływa z bibuły chromatograficznej do pakietu bibuły, bądź też ligniny, ułożonego na dnie komory chromatograficznej. Zwisająca z rynienki bibuła styka się z pakietem, który przyjmuje nadmiar rozpuszczalnika spływającego z bibuły. Również i w tym przypadku stosuje się w praktyce ten sam współczynnik podziału, o którym wspomniano wyżej.

Pierwsze dwa warianty mają wiele wad i na ogół ustępują technice wstępującej, natomiast wariant ostatni znacznie je przewyższa. Stosuje się go na ogół w tych przypadkach, gdy ma się do czynienia z mieszaniną związków trudno rozdzielających się na chromatogramie. Ujemną stroną chromatografii spływowej ciągłej jest brak kontroli nad migracją najszybciej migrującego związku w badanej mieszaninie. Ustalenie właściwego czasu rozwijania chromatogramów, w którym następuje optymalny rozdział związków badanej substancji w danym układzie rozwijającym, a jednocześnie najszybciej wędrujący składnik pozostaje jeszcze na bibule, jest bardzo istotne w tego rodzaju badaniach. Można by, co prawda, na podstawie wielu doświadczeń ustalić dla całego tego procesu odpowiedni czas rozwijania chromatogramów, praktyka wykazuje jednak, że wyniki mogą być z wielu względów niepowtarzalne. Na szybkość migracji badanych związków w procesie ich chromatograficznego rozdziału wpływa wiele parametrów, między innymi temperatura pomieszczenia, w którym ten proces się odbywa².

Przedmiotem niniejszego artykułu jest zastosowanie odpowiednich układów rozwijających w procesie chromatograficznego rozdziału cukrów prostych przy użyciu techniki spływowej ciągłej, z jednoczesnym zastosowaniem odpowiednich czynników kontrolnych, pozwalających śledzić czas migracji najszybciej wędrującego cukru, to znaczy 1-ramnozy. Cukier ten, jak wykazuje literatura przedmiotu oraz własne badania, w przeważającej części układów rozwijających wędruje najszybciej, i to zarówno w technice wstępującej, jak i spływowej. Jako czynniki kon-

$$^1 R_O = \frac{\text{odległość od środka plamy do miejsca startu związku X}}{\text{odległość od środka plamy do miejsca startu związku O}}$$

gdzie: X — badany związek, O — wzorcowy związek. Typowym przykładem może być np. współczynnik podziału $R_{Glik.}$ stosowany w bibulowej chromatografii rozdzielczej cukrów prostych:

$$R_{Glik.} = \frac{\text{odległość przebyta przez badany cukier}}{\text{odległość przebyta przez cukier wzorcowy}}$$

Takim związkiem wzorcowym w chromatografii cukrów prostych bywa często d-glikoza. Zob.: *Chromatografia*, pod red. J. Opieńskiej-Blauth, A. Waksmundzkiego i M. Kańskiego, PWN, Warszawa 1957, s. 381 i 597.

² Zob. *ibid.*, s. 377—378.

trojne zastosowano dostępne barwniki organiczne, zarówno rozpuszczalne w wodzie, jak i w alkoholu etylowym. W trakcie badań porównano szybkość migracji 1-ramnozy i odpowiednio dobranych barwników, których migracja w technice spływowej powinna być taka sama lub nieco szybsza. Odpowiednio dobrany barwnik, dobrze widoczny w trakcie migracji na bibule chromatograficznej jako barwna plama, jest właśnie czynnikiem kontrolnym pozwalającym ustalić każdorazowo właściwy czas rozwijania chromatogramów.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

WYBÓR UKŁADÓW ROZWIJAJĄCYCH

W pracach doświadczalnych stosowano następujące układy rozpuszczalników:

1. Octan etylu + lod. kwas octowy + woda (3:1:3)³.
2. N-butanol + pirydyna + woda (5:3:1)⁴.
3. Octan etylu + pirydyna + woda (3,6:1:1,15)⁵.
4. Octan etylu + pirydyna + woda + 80-procentowy kwas octowy (8:3:8:0,5)⁶.

CHARAKTERYSTYKA POSZCZEGÓLNYCH UKŁADÓW ROZWIJAJĄCYCH

1. Układ pierwszy — octan etylu + lod. kwas octowy + woda (3:1:3) — ma odczyn kwaśny; pH fazy organicznej świeżo przygotowanego układu wynosi 2,3⁷. Składniki tego układu nie łączą się ze sobą całkowicie, stąd też po wleciu ich do rozdzielacza należy całość energicznie wytrząsnąć i pozostawić na kilka godzin do całkowitego rozdzielenia się dwóch faz — fazy górnej, zwanej organiczną, i fazy dolnej, zwanej fazą wodną. Po całkowitym rozdzieleniu się tych dwóch faz dolną ostrożnie zlewa się z rozdzielacza do zlewki i stosuje się do nasycenia komory w czasie chromatografowania, górnej zaś używa się do rozwijania chromatogramów.

Ze względu na małą lepkość octanu etylu układ ten charakteryzuje szybka migracja na bibule. Wadą tego układu jest jego mała trwałość:

³ Wg M. A. Jermyn, F. A. Isherwood, *Biochem. J.*, 44, 402 (1949).

⁴ Z. Brochwicz, *Gumy roślinne jako spoiwa malarzkie w świetle dawnych traktatów, ich własności oraz identyfikacja w zabytkowych polichromiach*, Materiały Zachodniopomorskie, t. 9, (Szczecin) 1963, s. 534, przyp. 158.

⁵ Wg P. Colombo, D. Corbetta, A. Pirotta, G. Ruffini, A. Sartori, *J. Chromatogr.*, t. 3, 1960, nr 4, s. 343—350.

⁶ Wg M. Pietrusiewicz, E. Pidek, *Nowy układ do chromatograficznego rozdzielania glikozaminy, glikozy, galaktozy, mannozy, arabinozy i ramnozy*, *Chemia Analityczna*, 1962, nr 7 (1007).

⁷ Pomiar pH wykonał mgr G. Jaworski w Zakładzie Technologii i Techniki Sztuk Plastycznych Instytutu Zabytkoznawstwa i Konserwatorstwa UMK w Toruniu.

pod wpływem zawartego w nim kwasu octowego octan etylu ulega hydrolizie, przez co układ ten z upływem czasu zmienia swoje właściwości. Mimo szybkiej migracji na bibule nie uzyskuje się po jednokrotnym rozwinięciu najlepszego rozdziału cukrów prostych. Po 24 godzinach rozwijania techniką wstępującą na paskach bibuły chromatograficznej Whatman nr 1, o długości 48 cm, rozdział cukrów prostych jest niezbyt dobry, a wartości R_f są stosunkowo niskie. W literaturze przedmiotu układ ten zaleca się stosować do jednokrotnego rozwijania cukrów prostych⁸. Nasze doświadczenia wykazały, że ich lepszy rozdział na chromatogramach uzyskuje się wtedy, gdy są one rozwinięte techniką wstępującą w wymienionym układzie 3—5-krotnie⁹. Ponieważ każde rozwijanie trwa przeciętnie 24 godziny, w sumie więc, jeśli stosujemy rozwijanie trzykrotne, cały ten proces trwa trzy doby.

W trakcie badań nad przydatnością tego układu do rozwijania chromatogramów techniką spływową ustalono, że po jednym rozwinięciu rozdział cukrów nie jest również najlepszy. Zastosowanie rozwijania wielokrotnego, podobnie jak to robiono w technice wstępującej, nie poprawiło efektów rozdziału cukrów prostych, uzyskano bowiem gorsze wyniki niż po wielokrotnym rozwijaniu techniką wstępującą.

2. Układ drugi — n-butanol + pirydyna + woda (5:3:1) — ma odczyn słabo zasadowy. Jego pH tuż po przygotowaniu wynosi 7,4¹⁰. Składniki tego układu dobrze mieszają się z sobą, nie trzeba więc przygotowywać ich w rozdzielaczu. Trwałość układu jest duża i jak wykazały własne doświadczenia, można go z powodzeniem stosować nawet w ciągu czterech tygodni¹¹.

Ze względu na dużą lepkość tego układu szybkość jego migracji na bibule Whatman nr 1 w technice wstępującej jest dwukrotnie mniejsza niż w układzie poprzednim, a więc czas rozwijania chromatogramów jest dwukrotnie dłuższy. W układzie tym rozdzielają się szczególnie dobrze oligosacharydy, dwucukrowce redukujące oraz dobrze d-galaktoza i d-glikoza. Chromatogramy rozwijane w tym układzie rozpuszczalników wykazują w technice wstępującej duże wartości R_f cukrów prostych już po ich jednokrotnym rozwinięciu. Wielokrotne rozwijanie w technice wstępującej jest w tym przypadku zbyteczne, ponieważ nie uzyskuje się zwiększenia efektywności w samym rozdziale cukrów prostych. Może ono być jedynie stosowane w celu polepszenia rozdziału oligosacharydów.

W badaniach własnych wykonano próby rozwijania chromatogramów

⁸ Zob.: *Papierchromatographie in der Botanik*, pod red. H. F. Linskensa, Springer-Verlag, Berlin—Göttingen—Heidelberg 1959, s. 92; I. M. Hais, K. Macek, *Handbuch der Papierchromatographie*, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1958, s. 279.

⁹ Z. Brochwicz, op. cit., s. 534—536.

¹⁰ Patrz przyp. 7.

¹¹ Z. Brochwicz, op. cit., s. 536.

i rozdzielania cukrów prostych techniką spływową¹². Chromatogramy rozwijano jedno- i wielokrotnie (2-, 3-, 4-krotnie). Przeciętny czas rozwijania na paskach bibuły o długości 40 cm wynosił przeciętnie 9—10 godzin w temperaturze 20°C. Po jednokrotnym rozwinięciu uzyskano wyniki niezadowalające, nie było bowiem wyraźnego rozdziału cukrów prostych. Stosunkowo najlepszy rozdział uzyskano na chromatogramach rozwiniętych trzy- i czterokrotnie.

3. Układ trzeci — o składzie: octan etylu + pirydyna + woda (3,6:1:1,15) — jest układem o odczynie bardzo słabo kwaśnym; pH jego fazy organicznej wynosi 6,2¹³. Poszczególne jego składniki nie mieszają się całkowicie z sobą, dlatego też przygotowuje się go w rozdzielaczu. Po kilku godzinach następuje wyraźny podział na dwie fazy. Fazę górną — organiczną stosuje się do rozwijania chromatogramów, natomiast dolną — wodną do nasycenia komory w czasie trwania procesu chromatografowania.

W chromatografii wstępującej najlepsze wyniki w rozdziale cukrów prostych uzyskuje się wtedy, gdy chromatogramy rozwijane są wielokrotnie.

W chromatografii spływowej na paskach bibuły chromatograficznej Whatman nr 1, o długości 40 cm, w ciągu 7—8 godzin czoło rozpuszczalnika spływa na odległość 32—33 cm. Na chromatogramie rozwiniętym jednokrotnie uzyskuje się na ogół wysokie wartości R_f cukrów prostych, ze względu jednak na krótki czas migracji układu rozwijającego nie uzyskuje się zadowalającego rozdziału. Plamy cukrów prostych położone są zbyt blisko siebie. Rozwijanie wielokrotne (2- i 3-krotne) nie poprawiło właściwie efektu rozdziału cukrów prostych.

4. Układ czwarty — o składzie: octan etylu + pirydyna + woda + 80-procentowy kwas octowy (8:3:8:0,5) — jest układem nieco bardziej kwaśnym od poprzedniego, bowiem jego pH (faza organiczna) wynosi 5,3¹⁴. Podobnie jak poprzedni wymaga przygotowania w rozdzielaczu, ponieważ jego składniki nie mieszają się całkowicie ze sobą. Po rozwarstwieniu w rozdzielaczu górną fazę, podobnie jak poprzednio, stosuje się do rozwijania chromatogramów, natomiast fazę dolną — wodną do nasycenia komory chromatograficznej.

Jest to układ, w którym po jednokrotnym rozwinięciu chromatogramów techniką wstępującą uzyskuje się względnie dobry rozdział cukrów prostych. Rozwijanie wielokrotne efekty te wyraźnie polepsza.

W technice spływowej jedno- i wielokrotnej wyniki rozdziału cukrów prostych nie są w pełni zadowalające.

¹² Ibid., s. 537—538.

¹³ Patrz przyp. 7.

¹⁴ Patrz przyp. 7.

BARWNIKI ORGANICZNE UŻYTE DO BADAŃ

Do badań użyto następujących barwników organicznych syntetycznego pochodzenia, stosowanych w chemii jako wskaźniki (zastosowano barwniki rozpuszczalne w wodzie oraz te, które rozpuszczają się w alkoholu etylowym):

I. Barwniki rozpuszczalne w wodzie:

- | | |
|------------------------|------------------------------|
| 1) żółcień brylantowa, | 12) zielen jodowa, |
| 2) żółcień akrydynowa, | 13) zielen malachitowa, |
| 3) oranż metylowy, | 14) indygokarmin, |
| 4) safranina, | 15) błękit ksylenowy, |
| 5) benzopurpuryna, | 16) błękit metylenowy, |
| 6) fuksyna kwaśna, | 17) błękit bromofenolowy, |
| 7) fuksyna zasadowa, | 18) fiolet krystaliczny, |
| 8) czerwień Kongo, | 19) fiolet Lautha (tionina), |
| 9) floksyna, | 20) fiolet krezyłowy, |
| 10) zielen brylantowa, | 21) nigrozyna. |
| 11) zielen świetlna, | |

II. Barwniki rozpuszczalne w 96-procentowym alkoholu etylowym:

- | | |
|-------------------------|-----------------------------|
| 1) czerwień p-metyłowa, | 6) alizaryna, |
| 2) eozyna, | 7) kwas rozolowy, |
| 3) erytrozyna, | 8) czerwień chlorofenolowa, |
| 4) pąs 3B (Sudan IV), | 9) błękit bromotymolowy, |
| 5) czerwień fenolowa, | 10) fiolet metylowy. |

Barwniki wymienione w pierwszej grupie przygotowano do badań jako 0,1-procentowe roztwory wodne, natomiast w drugiej grupie — jako 0,1-procentowe roztwory alkoholowe. Roztwory te przechowywano w temperaturze pokojowej w szczelnie zamkniętych butelkach.

METODYKA BADAŃ

Dla każdego układu rozwijającego przygotowano najpierw po trzy wielopaskowe arkusze bibuły chromatograficznej Whatman nr 1 o wymiarach 33×35 cm. Szerokość arkusza wynosiła w tym przypadku 33 cm, a jego wysokość 35 cm. Na arkuszach tych wykreślono ołówkiem paski o szerokości 3 cm wzdłuż wysokości arkusza. Linię startową oznaczono ołówkiem na wysokości 4 cm od dolnego brzegu arkusza. Na podzielone w ten sposób trzy arkusze naniesiono wszystkie badane barwniki, a na ostatni pasek każdego arkusza — wzorcowe cukry proste w ilości po 20 mikrogramów.

Wszystkie trzy arkusze rozwijano jednocześnie w komorach chromatograficznych „Chropa” prod. NRD, przystosowanych do chromatografii dwukierunkowej. Przez rozwijanie trzech arkuszy jednocześnie uzyskano w przybliżeniu te same warunki migracji układu rozwijającego

oraz bardzo bliskie wartości R_f cukrów prostych, a szczególnie l-ramnozy jako cukru najszybciej wędrującego.

Roztwory poszczególnych barwników наносono w ilości po 20 mikrogramów, a na ostatni pasek kwas glikuronowy i wodne roztwory następujących cukrów prostych:

- | | |
|-----------------|-----------------|
| 1) d-galaktozy, | 5) l-arabinozy, |
| 2) d-glikozy, | 6) d-rybozy, |
| 3) d-mannozy, | 7) l-ramnozy. |
| 4) d-fruktozy, | |

Wodne roztwory cukrów i ich pochodnych przygotowano do badań w stężeniach 0,1-procentowych i наносono na bibułę jako wzorce w takiej ilości, aby stężenie każdego z nich wynosiło na linii startu po 20 mikrogramów.

Roztwory poszczególnych barwników, zarówno wodne, jak i alkoholowe, наносono w ilości po 0,02 ml. Wielkość plam poszczególnych barwników na miejscu startu wahała się w granicach 3—4 mm średnicy.

Do наносzenia zarówno roztworów barwników, jak i roztworów cukrów użyto pipety do hemoglobinometru. Stosowano wielokrotne наносzenie roztworu i suszenie za pomocą zwykłej suszarki fryzjerskiej.

Wielopaskowe arkusze rozwijano najpierw techniką wstępującą w poszczególnych układach rozpuszczalników, przy czym w każdym z nich stosowano rozwijanie tylko jednokrotne. Po dojściu czoła rozpuszczalnika do odpowiedniej wysokości arkusze wyjmowano z komory, suszono w temperaturze pokojowej pod wyciągiem w dygestorium, następnie plamy barwników obrysowywano ołówkiem. W promieniach UV zaznaczano ołówkiem bardzo dokładnie linię czoła rozpuszczalnika. W dalszym toku postępowania odcinano wzdłuż arkusza pasek z naniesionymi cukrami prostymi i wywoływano go ftalanem aniliny¹⁵. Po wywołaniu pasek ten

¹⁵ *Papierchromatographie in der Botanik*, s. 93: „0,93 g aniliny i 1,66 g kwasu ftalowego rozpuszcza się w 5 ml H₂O i dodaje do tego 95 ml acetonu. Chromatogramy wywołuje się przez zanurzenie bibuły w tym roztworze, po czym ogrzewa się w temperaturze 100—110°C w ciągu 10 minut. Aldoheksozy dają żółtobrunatne plamy, aldopentozy — czerwobrunatne, kwasy uronowe — pomarańczowe”. Cukry występujące na bibule w małych stężeniach można dodatkowo identyfikować w promieniach UV, szczególnie aldoheksozy, metylopentozy (l-ramnoza) i kwasy uronowe, dają one bowiem charakterystyczną fluorescencję po wywołaniu chromatogramów tym odczynnikiem. Odczynnik ten jest mało trwały i powinien być przygotowany każdorazowo przed wywołaniem nowych chromatogramów. W literaturze przedmiotu do przygotowania odczynnika poleca się stosować jako rozpuszczalnik n-butanol nasycony wodą. W naszej praktyce badawczej w miejsce n-butanolu stosuje się aceton, ponieważ w tym przypadku nie ma obawy, że w trakcie wywoływania chromatogramów mogą ulec rozmyciu plamy poszczególnych cukrów. W przypadku stosowania odczynnika rozpuszczonego w n-butanolu nasyconym wodą, wywołanie chromatogramów przez ich zanurzenie w roztworze odczynnika może spowodować rozmycie plam.

doklemano do pozostałej części arkusza z barwnikami. Obrysowywano ołówkiem plamy cukrów i obliczano następujące wartości R_f :

- wartości R_f plam poszczególnych barwników;
- wartości R_f l-ramnozy jako cukru najszybciej migrującego we wszystkich wymienionych układach rozwijających;
- wartość $R_{Ramn.}$ dla tych plam barwników, których lokalizacja na chromatogramach rozwiniętych techniką wstępującą, a więc i szybkość migracji oraz wartość R_f , były bliskie wartości R_f l-ramnozy¹⁶.

Do dalszych badań, w których stosowano już wyłącznie technikę spływową, zakwalifikowano tylko te barwniki, których wartości R_f były bliskie wartości R_f l-ramnozy. W trakcie rozwijania chromatogramów rejestrowano dokładnie zabarwienie poszczególnych plam barwników, ponieważ w zależności od pH układu rozpuszczalników barwa ich może ulegać zmianie.

WYNIKI BADAŃ NAD MIGRACJĄ BARWNIKÓW I CUKRÓW PROSTYCH UZYSKANE W POSZCZEGÓLNYCH UKŁADACH ROZPUSZCZALNIKÓW

W poszczególnych układach rozpuszczalników uzyskano następujące wyniki:

- Układ: octan etylu + lod. kwas octowy + woda (3:1:3)

W wyniku rozwijania techniką wstępującą z 31 barwników zastosowanych do badań tylko niewiele wykazało szybkość migracji zbliżoną do tempa migracji l-ramnozy. Większość barwników migruje bądź wolniej niż l-ramnoza, bądź też ich migracja jest znacznie szybsza. Zarówno jedne, jak i drugie barwniki wyeliminowano z dalszych badań i pozostawiono tylko te, które w technice spływowej mogły okazać się przydatne. Wartości R_f wybranych barwników i l-ramnozy na chromatogramach rozwiniętych w tym układzie techniką wstępującą ilustruje tabela 1.

TABELA 1

Wartości R_f barwników na chromatogramach rozwiniętych jednokrotnie techniką wstępującą w układzie: octan etylu + kwas octowy + woda (3:1:3) w ciągu 24 godzin, zakwalifikowanych do dalszych badań techniką spływową ciągłą w tym samym układzie rozpuszczalników

Lp.	Rodzaj barwnika	Wartość R_f barwnika	Wartość R_f l-ramnozy	Wartość $R_{Ramn.}$ dla barwnika	Kolor barwnika w trakcie rozwijania chromatogramu
1	2	3	4	5	6
1	Błękit ksylenowy	0,14	0,18	0,78	niebieski
2	Czerwień feolowa	0,28	0,18	1,56	żółtocytrynowy
3	Błękit metylenowy	0,29	0,18	1,61	niebieskozielonkawy
4	Oranz metylowy	0,37	0,18	2,06	różowoczerwony
5	Fiolet krezyłowy	0,49	0,18	2,72	fioletowy
6	Żółcień brylantowa	0,51	0,18	2,83	żółty

¹⁶ Patrz przyp. 1.

Barwniki wyszczególnione w tabeli 1 naniesiono następnie na linię startu na wielopaskowych arkuszach bibuły chromatograficznej Whatman nr 1 o długości 56,5 cm. Szerokość poszczególnych pasków na tych arkuszach wynosiła 4 cm. Linię startową wykreślono na wysokości 6 cm od górnego brzegu arkusza. Barwniki, podobnie jak poprzednio, nanoszono w ilości po 0,02 ml roztworu każdy. Na ostatnim pasku jako wzorzec naniesiono roztwór 1-ramnozy w ilości 20 mikrogramów.

Chromatogramy zanurzone w rynienkach umieszczonych w górnej części komory „Chropa”, przystosowanej do rozwijania jednokierunkowego. Zanurzone w rynienkach arkusze obciążono specjalnymi rurkami szklanymi, zatopionymi z obydwu końców i zawierającymi wewnątrz pręt mosiężny o grubości 12 mm.

Zastosowano rozwijanie ciągłe. Na dnie szklanej komory chromatograficznej umieszczono odpowiedniej wielkości pakiet z ligniny, z którym stykał się zwisający z rynienki arkusz bibuły; w pakiecie tym zbierał się nadmiar rozpuszczalnika spływającego z bibuły. Chromatogram rozwijano w ciągu 12 godzin. Po wyjęciu arkusza bibuły z komory ostatni pasek z 1-ramnozą odcięto i wywołano ftalanem aniliny. Wyniki uzyskane na chromatogramach ilustruje tabela 2.

TABELA 2

Szybkość migracji wybranych barwników i 1-ramnozy na chromatogramach rozwiniętych techniką spływową ciągłą w układzie: octan etylu + kwas octowy + woda (3:1:3) w ciągu 12 godzin

Lp.	Rodzaj barwnika	Odległość od startu do środka plamy	Wartość $R_{Ramn.}$ dla barwnika	Uwagi
1	2	3	4	5
1	Błękit ksylenowy	124 mm	1,02	migracja barwnika bardzo bliska migracji 1-ramnozy
2	Czerwień fenolowa	220 mm	1,79	migracja barwnika zbyt szybka w stosunku do migracji 1-ramnozy
3	Błękit metylenowy	246 mm	2,00	migracja barwnika zbyt szybka w stosunku do migracji 1-ramnozy
4	Oranż metylowy	288 mm	2,34	migracja barwnika zbyt szybka w stosunku do migracji 1-ramnozy
5	Fiolet krezyłowy	400 mm	3,25	migracja barwnika zbyt szybka w stosunku do migracji 1-ramnozy
6	Żółcień brylantowa	421 mm	3,42	migracja barwnika zbyt szybka w stosunku do migracji 1-ramnozy

Jak wynika z tabeli 2 jedynym barwnikiem, który można uznać za optymalnie przydatny, jest błękit ksylenowy, który w technice spływowej wędruje nieco szybciej niż 1-ramnoza. Wartość podziału tego barwnika w stosunku do 1-ramnozy ($R_{Ramn.}$) wynosi 1,02. Warto przy tym zazna-

czyć, że współczynnik ten na chromatogramach rozwiniętych techniką wstępującą wynosi 0,78 (tab. 1, rubr. 5), a więc barwnik ten w technice spływowej migruje nieco szybciej niż w technice wstępującej. Pozostałe barwniki, wymienione w tabelach 1 i 2 w pozycjach 2—6, z uwagi na ich migrację, znacznie szybszą od migracji l-ramnozy, nie mogą być stosowane jako czynnik kontrolny w chromatografii spływowej ciągłej cukrów prostych.

Ponieważ w ciągu 12 godzin przesunięcie się l-ramnozy od linii startu w dół jest niezbyt duże, dodatkowo wykonano rozwijanie w dłuższych okresach, a mianowicie w ciągu 30 i 42 godzin. Uzyskano w ten sposób dłuższą drogę migracji cukrów prostych i lepszy ich rozdział.

Chromatogram przedstawiający migrację l-ramnozy i rozdział pozostałych cukrów prostych, po rozwinięciu go w ciągu 42 godzin techniką spływową ciągłą, ilustruje rysunek 2. Stwierdzono, że przedłużenie czasu rozwijania techniką spływową ciągłą w tym układzie rozpuszczalników prawie w ogóle nie wpływa na zwiększenie szybkości migracji błękitu ksylenowego w stosunku do tempa migracji l-ramnozy. Wartości $R_{Ramn.}$ dla błękitu ksylenowego w poszczególnych okresach rozwijania przedstawiają się następująco: 12 godzin — 1,02; 30 godzin — 1,03; 42 godziny — 1,04.

2. Układ: n-butanol + pirydyna + woda (5:3:1)

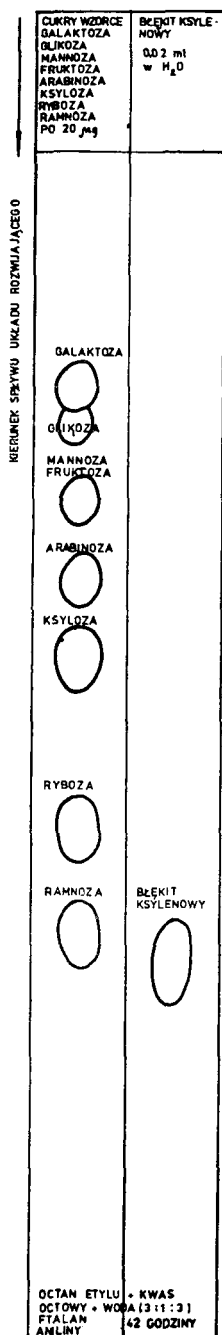
Wielopaskowe arkusze bibuły o długości 35 cm z naniesionymi rozтворami barwników oraz z l-ramnozą na ostatnim pasku arkusza rozwijano w niniejszym układzie jednokrotnie techniką wstępującą w ciągu 24 godzin. Pasek z l-ramnożą odcięto od pozostałej części arkusza i wywołano ftalanem aniliny. Na podstawie wyników uzyskanych na chromatogramach do dalszych badań zakwalifikowano barwniki wyszczególnione w tabeli 3.

Pozostałe barwniki, których użyto do badań, ale nie wyszczególniono w niniejszej tabeli ze względu na wartości R_f , wyraźnie różniące się od

TABELA 3

Wartości R_f barwników na chromatogramach rozwiniętych jednokrotnie w układzie: n-butanol + pirydyna + woda (5:3:1) techniką wstępującą w ciągu 24 godzin i zakwalifikowanych do dalszych badań techniką spływową ciągłą w tym samym układzie rozpuszczalników

Lp.	Rodzaj barwnika	Wartość R_f barwnika	Wartość R_f l-ramnozy	Wartość $R_{Ramn.}$ dla barwnika	Kolor barwnika w trakcie rozwijania chromatogramu
1	2	3	4	5	6
1	Błękit bromofenolowy	0,37	0,48	0,78	niebieskofioletowy
2	Czerwień fenolowa	0,46	0,48	0,96	żółtocytrynowy
3	Fiolet krezyłowy	0,53	0,48	1,10	jasnofioletowy
4	Czerwień p-metylowa	0,55	0,48	1,15	żółtopomarańczowy



R_f l-ramnozy, zostały z dalszych badań wyeliminowane. Barwniki wymienione w tabeli 3 oraz cukry wzorce poddano badaniom za pomocą techniki spływowej ciągłej. Naniesiono je na arkusz bibuły chromatograficznej Whatman nr 1 o długości 56,5 cm i rozwijano w tym układzie techniką spływową ciągłą w ciągu 22 godzin. Kontrolę czasu rozwijania oparto przede wszystkim na szybkości migracji czerwieni p-metylowej i fioletu krezyłowego, które — jak wynika z tabeli 3 — wędrują w tym układzie najszybciej. Z chwilą, kiedy barwniki te zbliżyły się na odległość ca 12 cm od dolnego brzegu arkusza, rozwijanie przerwano. Pasek z naniesioną mieszaniną cukrów prostych po odcięciu wywołano ftalanem aniliny. Uzyskane wyniki ilustrują tabela 4 oraz rysunek 3.

Rys. 2. Rozdział cukrów prostych i barwników kontrolnych w układzie: octan etylu + kwas octowy + woda (3:1:3)

TABELA 4

Szybkość migracji wybranych barwników oraz 1-ramnozy na chromatogramach rozwiniętych techniką spływową ciągłą w układzie n-butanol + pirydyna + woda (5:3:1) w ciągu 24 godzin

Lp.	Rodzaj barwnika	Odległość od startu do środka plamy	Wartość $R_{\text{Ramn.}}$ dla barwnika	Uwagi
1	2	3	4	5
1	Błękit bromo-fenolowy	265 mm	1,01	migracja barwnika prawie taka sama jak migracja 1-ramnozy
2	Czerwień fenolowa	323 mm	1,24	barwnik jeszcze może być użyty jako czynnik kontrolny
3	Fiolet krezyłowy	357 mm	1,37	migracja barwnika zbyt szybka w stosunku do migracji 1-ramnozy
4	Czerwień p-metylowa	329 mm	1,26	barwnik jeszcze może być użyty jako czynnik kontrolny

Jak wynika z tabeli 4, barwnikiem najbardziej przydatnym do kontrolowania czasu migracji 1-ramnozy w tym układzie rozpuszczalników jest błękit bromofenolowy, którego szybkość migracji jest prawie identyczna z tempem migracji 1-ramnozy. $R_{\text{Ramn.}}$ dla błękitu bromofenolowego wynosi 1,01. Za przydatne można by również uznać następujące dwa barwniki, a mianowicie: czerwień fenolową ($R_{\text{Ramn.}} = 1,24$) i czerwień p-metylową ($R_{\text{Ramn.}} = 1,26$), natomiast fiolet krezyłowy, z uwagi na znacznie szybszą migrację od migracji 1-ramnozy ($R_{\text{Ramn.}} = 1,37$), należałoby raczej odrzucić.

Na chromatogramach rozwiniętych w tym układzie rozpuszczalników techniką spływową ciągłą w ciągu 16 godzin wartości $R_{\text{Ramn.}}$ dla wymienionych barwników wynoszą: błękit bromofenolowy — 1,15, czerwień fenolowa — 1,33, fiolet krezyłowy 1,52, czerwień p-metylowa — 1,33. Wartości te nasuwają wniosek, że przy dłuższym czasie rozwijania wartości $R_{\text{Ramn.}}$ w tym układzie rozpuszczalników maleją, w przeciwieństwie do układu poprzedniego, w którym wartości te były stałe.

3. Układ: octan etylu + pirydyna + woda (3,6:1:1,15)

Wielopaskowe arkusze bibuły Whatman nr 1 o długości 35 cm, z naniesionymi jak poprzednio roztworami barwników oraz z 1-ramnożą jako wzorcem, rozwinięto jednokrotnie w ciągu 24 godzin w temperaturze 20°C ($\pm 1^\circ$). Po wyjęciu z komory i wysuszeniu odcięto pasek z 1-ramnożą i wywołano ftalanem aniliny.

Z 31 barwników wytypowano tylko te, których współczynnik podziału $R_{\text{Ramn.}}$ nie przekraczał jedności, doświadczenie bowiem wykazało, że barwniki takie w technice spływowej wędrują znacznie szybciej i ich wartość $R_{\text{Ramn.}}$ przekracza jedność. Barwniki wytypowane do dalszych

badania i ich współczynniki podziału ilustruje tabela 5. Pozostałe barwniki, nie wyszczególnione w tabeli 5, nie zostały zakwalifikowane do dalszych badań ze względu na bardzo zróżnicowaną migrację w stosunku do 1-ramnozy.

TABELA 5

Wartości R_f barwników na chromatogramach rozwiniętych jednokrotnie w ciągu 24 godzin techniką wstępującą w układzie: octan etylu + pirydyna + woda (3,6:1:1,15) i zakwalifikowanych do dalszych badań w technice spływowej ciągłej

Lp.	Rodzaj barwnika	Wartość R_f barwnika	Wartość R_f 1-ramnozy	Wartość $R_{Ramn.}$ dla barwnika	Kolor barwnika w trakcie rozwijania chromatogramu
1	2	3	4	5	6
1	Fiolet krezyłowy	0,32	0,34	0,94	niebieskofioletowy
2	Błękit bromofenolowy	0,30	0,34	0,88	niebieskofioletowy
3	Czerwień fenolowa	0,37	0,43	1,08	czerwony
4	Fiolet Lautha (tionina)	0,25	0,34	0,73	niebieski

Na wielopaskowe arkusze bibuły chromatograficznej Whatman nr 1 naniesiono barwniki wymienione w tabeli 5, a na ostatnim pasku cukry wzorce w ilości po 20 mikrogramów. Linie startową wykreślono w odległości 6 cm od górnego brzegu arkusza. Arkusz rozwijano techniką spływową ciągłą w ciągu 24 godzin w temperaturze 20°C ($\pm 1^\circ$). W trakcie rozwijania chromatogramu zauważono, że barwniki te tworzą dwie pary, jeśli chodzi o szybkość ich migracji. Pierwszą, szybciej wędrującą parę, stanowiły czerwień fenolowa i fiolet krezyłowy, drugą zaś parą, wędrującą wolniej, okazały się fiolet Lautha (tionina) oraz błękit bromofenolowy. Rozwijanie chromatogramu zakończono z chwilą, gdy pierwsza, szybciej wędrująca para barwników dotarła do dolnego brzegu arkusza bibuły.

Pasek z cukrami prostymi wywołano ftalanem aniliny. Uzyskane wyniki wartości $R_{Ramn.}$ poszczególnych barwników ilustruje tabela 6 oraz rysunek 4.

Również i w tym układzie rozpuszczalników, podobnie jak w poprzednim, daje się zauważyć tę samą prawidłowość, a mianowicie barwniki, które w chromatografii wstępującej mają współczynnik podziału $R_{Ramn.}$ poniżej jedności (tab. 5, rubr. 5), wędrują w technice spływowej ciągłej szybciej od 1-ramnozy i ich wartości $R_{Ramn.}$ są większe od jedności.

4. Układ: octan etylu + pirydyna + woda + 80-procentowy kwas octowy (8:3:8:0,5)

W analogicznych warunkach chromatografowano w tym układzie wszystkie barwniki, o których mowa wyżej.

TABELA 6

Szybkość migracji wybranych barwników oraz l-ramnozy na chromatogramach rozwiniętych techniką spływową ciągłą w układzie octan etylu + pirydyna + woda (3,6:1:1,15) w ciągu 24 godzin

Lp.	Rodzaj barwnika	Odległość od startu do środka plamy	Wartość $R_{Ramn.}$ dla barwnika	Uwagi
1	2	3	4	5
1	Czerwień fenolowa	484 mm	1,21	para barwników wędrująca
2	Fiolet krezyłowy	489 mm	1,22	szybciej
3	Fiolet Lautha (tionina)	438 mm	1,09	para barwników wędrująca wolniej od dwóch poprzednich
4	Błękit bromofenolowy	455 mm	1,13	

Wielopaskowe arkusze o długości 35 cm z naniesionymi roztworami barwników oraz z l-ramnozą rozwijano najpierw w tym układzie jednokrotnie techniką wstępującą w ciągu 8 godzin w temperaturze 20°C ($\pm 1^\circ$). Pasek z l-ramnożą wywołano ftalanem aniliny. Na podstawie wyników uzyskanych na chromatogramach rozwiniętych techniką wstępującą do dalszych badań zakwalifikowano barwniki zestawione w tabeli 7. Pozo-

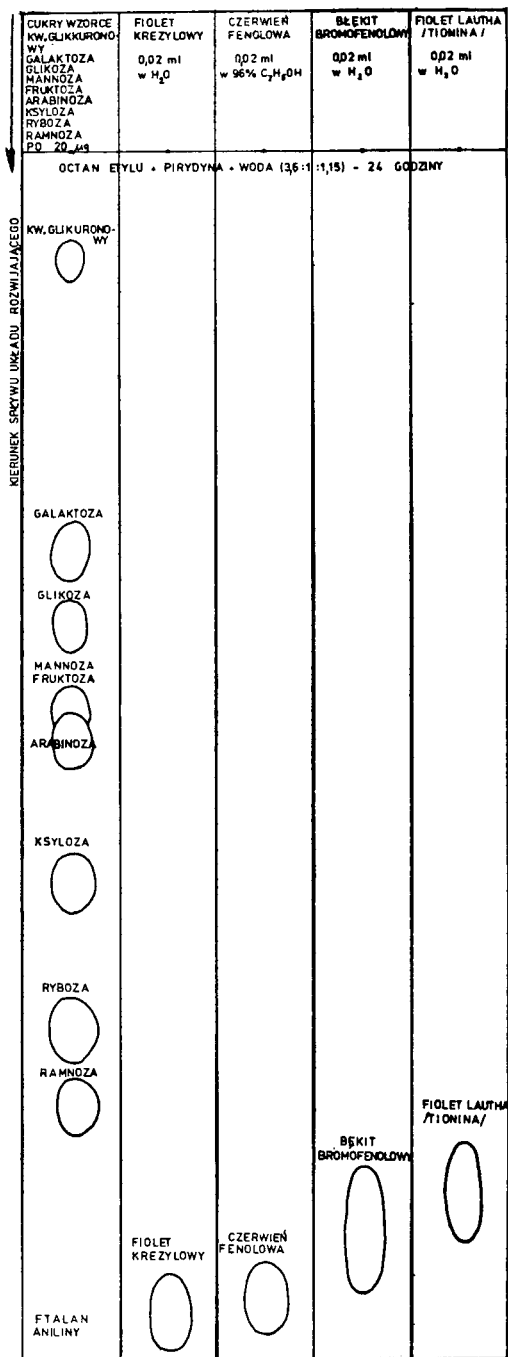
TABELA 7

Wartość R_r barwników na chromatogramach rozwiniętych jednokrotnie techniką wstępującą w układzie: octan etylu + pirydyna + woda + 80-procentowy kwas octowy (8:3:8:0,5) w ciągu 8 godzin i zakwalifikowanych do dalszych badań w technice spływowej ciągłej

Lp.	Rodzaj barwnika	Wartość R_r barwnika	Wartość R_r l-ramnozy	Wartość $R_{Ramn.}$ dla barwnika	Kolor barwnika w trakcie rozwijania chromatogramu
1	2	3	4	5	6
1	Fiolet krezyłowy	0,21	0,24	0,88	fioletowy
2	Czerwień fenolowa	0,26	0,24	1,08	żółty
3	Safranina	0,32	0,24	1,33	czerwony

stałe barwniki, użyte do badań i nie wyszczególnione w tabeli 7, ze względu na zbyt wolną lub szybką migrację w stosunku do migracji l-ramnozy zostały wyeliminowane z dalszych badań.

Barwniki wymienione w tabeli 7 oraz cukry proste jako wzorce naniesiono na czteropaskowy arkusz bibuły chromatograficznej Whatman nr 1 o długości 56,5 cm i rozwijano w tym układzie techniką spływową ciągłą w ciągu 30 godzin w temperaturze 20°C ($\pm 1^\circ$). Kontrolę rozwijania tego chromatogramu oparto przede wszystkim na szybkości migracji czerwieni fenolowej: z chwilą, kiedy zbliżała się ona do dolnego brzegu



Rys. 4. Rozdział cukrów prostych oraz barwników kontrolnych w układzie: octan etylu + pirydyna + woda (3,6:1:1,5)

arkusza bibuły, na odległość ca 12 cm, rozwijanie przerywano. Pasek z cukrami prostymi wywołano ftalanem aniliny. Uzyskane wyniki ilustruje tabela 8 i rysunek 5.

TABELA 8

Szybkość migracji wybranych barwników oraz l-ramnozy na chromatogramach rozwiniętych techniką sphywowa ciągła w układzie: octan etylu + pirydyna + woda + 80-procentowy kwas octowy (8:3:8:0,5) w ciągu 30 godzin

Lp.	Rodzaj barwnika	Odległość od startu do środka plamy	Wartość $R_{Ramn.}$ dla barwnika	Uwagi
1	2	3	4	5
1	Fiolet krezyłowy	338 mm	1,04	szybkość migracji barwnika jest prawie identyczna z migracją l-ramnozy, w związku z czym jest on najbardziej przydatny dla tego układu rozpuszczalników
2	Czerwień fenolowa	381 mm	1,17	barwnik nieprzydatny
3	Safranina	404 mm	1,22	barwnik nieprzydatny

Z przeprowadzonych badań wynika, że w powyższym układzie rozpuszczalników można wykorzystywać w chromatografii sphywowej cukrów prostych jako czynniki kontrolne następujące barwniki: fiolet krezyłowy i czerwień fenolową. Za użyciem tej pary barwników jednocześnie przemawia to, że szybkość ich migracji jest najbardziej zbliżona do migracji l-ramnozy (nieznacznie ją przewyższa). Poza tym użycie na chromatogramach tych barwników jednocześnie, na dwóch różnych paskach, daje pełną gwarancję zakończenia procesu rozwijania chromatogramów we właściwym czasie. Jak wynika z tabeli 8, czerwień fenolowa migruje nieco szybciej niż fiolet krezyłowy, stąd też, jeśli spłynie ona z rozpuszczalnikiem z arkusza bibuły, pozostaje jeszcze jeden barwnik jako czynnik kontrolny pozwalający uchwycić właściwe zakończenie procesu rozwijania.

PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ I WNIOSKI

Przeprowadzone badania wykazały, że stosując odpowiednio dobrane barwniki (wskaźniki), o szybkości migracji zbliżonej do tempa migracji l-ramnozy, można do rozdzielania cukrów prostych występujących w hydrolizatach węglowodanowych spoiw malarskich stosować z powodzeniem chromatografię sphywowa ciągła. Barwniki te pozwalają w trakcie rozwijania chromatogramów w szklanych komorach chromatograficznych

CUKRY WZORCE KW. GLIKOPROSTY GALAKTOZA GLUKOZA MANNOZA FRUKTOZA ARABINOZA KSYLOZA RYBOZA RAMNOZA PO 20 mg	SAFRANINA 0,02 ml w H ₂ O	CZERNIEK FENOLOWA 0,02 ml = 95% C ₂ H ₅ OH	FIOLET KREZYLOWY 0,02 ml w H ₂ O
KW. GLIKOPROSTY			
GALAKTOZA			
GLUKOZA			
MANNOZA + FRUKTOZA			
ARABINOZA			
KSYLOZA			
RYBOZA			
RAMNOZA			
	SAFRANINA	CZERNIEK FENOLOWA	FIOLET KREZYLOWY
	OCIAN ETYLU + PIRYDYNA + (8:3:0,5:8)	80% KW OCTOWY + WODA - 30 GODZIN	
FTALAN ANILINY			

REKUNEK SPŁYWU UNRADU ROZWIJAJĄCEGO

Rys. 5. Rozdział cukrów prostych oraz barwników kontrolnych w układzie: octan etylu + pirydyna + 80-procentowy kwas octowy + woda (8:3:0,5:8)

kontrolować szybkość migracji l-ramnozy na bibule. Kiedy dolna część plamy barwnika znajdzie się w odległości 5—6 cm od dolnego brzegu bibuły, rozwijanie należy przerwać, aby nie dopuścić do spłynięcia l-ramnozy wraz z rozpuszczalnikiem do pakietu ligniny ułożonego na dnie komory.

Chromatografia spływowa ciągła pozwala na rozciągnięcie migracji cukrów prostych, a tym samym na uzyskanie lepszego ich rozdziału.

Jak ten proces ma się do chromatografii wstępującej? W chromatografii wstępującej jednokierunkowej po jednokrotnym rozwinięciu chromatogramów uzyskuje się — w zależności od długości paska i czasu migracji — na ogół rozdzielanie cukrów prostych niezbyt zadowalający. Efekt ten poprawić można przez wielokrotne rozwijanie chromatogramów w tym samym lub w dwóch różnych układach rozpuszczalników¹⁷. W tym ostatnim przypadku uzyskuje się już rozdzielanie cukrów w pełni zadowalający, za wyjątkiem d-mannozy i d-fruktozy, które zazwyczaj tworzą wspólną plamę. Każde rozwijanie chromatogramów w technice wstępującej wielokrotnej, na paskach bibuły o długości 35 cm, trwa jednak 24 godziny, w sumie więc na trzykrotne rozwinięcie chromatogramów potrzeba 72 godziny. W tego rodzaju rozwijaniu chromatogramów, w dwóch różnych układach rozpuszczalników, należy mieć do dyspozycji dwie oddzielne komory chromatograficzne, dla każdego układu oddzielną.

Stosowanie jedno- i wielokrotnego rozwijania chromatogramów techniką spływową zwykłą (nieciągłą) jedno- i wielokrotnie, to znaczy taką,

¹⁷ Z. Brochwicz, M. Górznińska, P. Połom, J. Wiklendt, *Materiały i techniki średniowiecznych malowideł ściennych w kościele św. Jakuba w Toruniu*, Toruń 1988, s. 32—33. W pracy tej po raz pierwszy zakomunikowano o zastosowaniu tej metody w chromatograficznej analizie węglowodanowych spoiw malarskich w średniowiecznych malowidłach ściennych. Metodę tę wprowadziłem do badań jednak znacznie wcześniej, a mianowicie przy końcu lat siedemdziesiątych. Wyniki badań nie były wówczas jeszcze publikowane. Zgodnie z tą metodą chromatogramy rozwija się techniką wstępującą 3 razy po 24 godziny w następujących kolejno po sobie układach rozpuszczalników: 1) pierwsze rozwijanie w układzie: octan etylu + pirydyna + woda (3,6:1:1,15); 2) drugie rozwijanie w układzie: octan etylu + kwas octowy + woda (3:1:3); 3) trzecie rozwijanie w układzie pirydynowym, wymienionym w punkcie pierwszym. Rozwijanie trzykrotne ma na celu wydłużenie drogi migracji cukrów prostych oraz ich lepszy rozdzielanie. Zastosowanie dwóch różnych układów rozwijających ma między innymi polepszyć migrację kwasów uronowych, które występują w gumach roślinnych oraz w kleju z nasion lnu. Migracja tych kwasów w układzie pirydynowym jest słaba, natomiast w układzie drugim jest na tyle znaczna, że można je wyraźnie odróżnić od wielocukrowców jako pozostałych reszt niepełnej hydrolizy, co często się zdarza nawet w hydrolizatach wykonanych w ostrych warunkach. W układzie drugim słabo oddzielają się od siebie dwa podstawowe cukry, będące aldoheksosami, a mianowicie d-galaktoza i d-glukoza. Są one charakterystycznymi składnikami klejów roślinnych pochodzenia zbożowego (klej pszeniczny, jęczmienny, otrzymywane z ziaren zbożowych). W układzie pierwszym rozdzielanie tych cukrów jest zadowalające i w ten sposób można je bezbłędnie zidentyfikować.

w której czoło rozpuszczalnika nie spływa z bibuły, też nie daje właściwie w pełni zadowalających wyników. Znacznie lepsze rezultaty uzyskuje się wtedy, gdy stosuje się metodę spływowej chromatografii ciągłej. Zaletą tej metody jest niewielka ilość używanych rozpuszczalników (ca 150—200 ml), a więc i duża oszczędność odczynników, i przy tym mniejsza szkodliwość niektórych z nich dla zdrowia (np. pirydyny). Wadą tej metody jest to, że plamy cukrów prostych na chromatogramach są bardziej wydłużone niż na chromatogramach rozwiniętych techniką wstępującą. Nie można również stosować kilkakrotnego rozwijania ciągłego w jednym lub w dwóch następujących po sobie układach rozpuszczalników, doprowadziłoby to bowiem do spłynięcia z bibuły zarówno barwnika kontrolnego, jak i cukrów prostych. Byłoby to więc wielokrotne rozwijanie ciągłe, w ostatecznym efekcie nie kontrolowane.

Z przeprowadzonych prób jednoznacznie wynika, że do rozwijania chromatogramów z cukrami prostymi najbardziej nadają się następujące układy rozpuszczalników oraz wybrane do nich odpowiednie barwniki kontrolne:

1) układ: octan etylu + lod. kwas octowy + woda (3:1:3) oraz jako barwnik kontrolny 0,1-procentowy wodny roztwór błękitu ksylenowego;

2) układ: octan etylu + pirydyna + woda (3,6:1:1,15) oraz dwa kontrolne barwniki: 0,1-procentowy roztwór wodny fioletu Lautha (tioniny) i 0,1-procentowy roztwór wodny błękitu bromofenolowego;

3) układ: octan etylu + pirydyna + woda + 80-procentowy kwas octowy (8:3:8:0,5) oraz jako barwnik kontrolny 0,1-procentowy wodny roztwór fioletu krezyłowego.

Układ n-butanol + pirydyna + woda (5:3:1), z uwagi na wolniejszą migrację cukrów prostych i nie najlepszy ich rozdział na chromatogramach rozwiniętych techniką spływową ciągłą, należy uznać — w porównaniu z poprzednimi układami — za mniej przydatny w chromatograficznej analizie węglowodanowych spoiw malarskich.

Można przyjąć, że niezależnie od temperatury oraz czasu rozwijania chromatogramów szybkość migracji wybranych barwników w stosunku do tempa migracji l-ramnozy jest wielkością prawie stałą, bowiem różnice bywają nieznaczne.

Rozdział i dokładne ustalenie rodzaju plam cukrów prostych, po wywołaniu chromatogramów ftalanem aniliny, ustala się na podstawie $R_{\text{Ramn.}}$, to znaczy przez określenie stosunku drogi przebytej przez poszczególne cukry proste do drogi przebytej przez l-ramnozę. Odcinki migracji liczy się zawsze od miejsca startu do środka plamy określonego cukru prostego. Współczynnik podziału poszczególnych cukrów prostych w stosunku do l-ramnozy przedstawia następujący wzór:

$$R_{\text{Ramn.}} = \frac{\text{droga przebyta przez badany cukier prosty}}{\text{droga przebyta przez l-ramnozę}}$$

Ponieważ wszystkie cukry proste wędrują wolniej niż l-ramnoza, współczynnik podziału $R_{\text{Ramn.}}$ będzie zawsze wielkością poniżej jedności.

W przypadku, gdy w analizowanej substancji, będącej spoiwem malarskim, l-ramnoza jest nieobecna, wówczas zajdzie potrzeba zastosowania innego współczynnika podziału, np. $R_{\text{Glik.}}$.