

## ZUR REPRODUZIERBARKEIT DER $R_F$ IN DER IONENAUSTAUSCHER-DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE AUF POLYÄTHYLENIMIN-CELLULOSE\*

G. PATAKI UND H. ZÜRCHER

Analytische Abteilung, Chromatographisches Laboratorium, ROBAPHARM AG, Basel (Schweiz)

### SUMMARY

*The reproducibility of  $R_F$  values in ion-exchange chromatography on poly(ethyleneimine) cellulose layers*

The reproducibility of  $R_F$  values of nucleotides and related compounds on poly(ethyleneimine) cellulose layers has been investigated. The standard deviations of the  $R_F$  values are approximately of the same order of magnitude as those generally found in thin-layer chromatography. PEI-cellulose layers have proved to be stable for three months at room temperature. On the other hand, the separation of compounds is influenced by the quality of the layer.

Polyäthylenimin (PEI)-Cellulose Schichten nach RANDEATH<sup>2,3</sup> eignen sich vorzüglich zur Trennung von Nucleinsäure-Derivaten (für Zusammenfassung vgl.

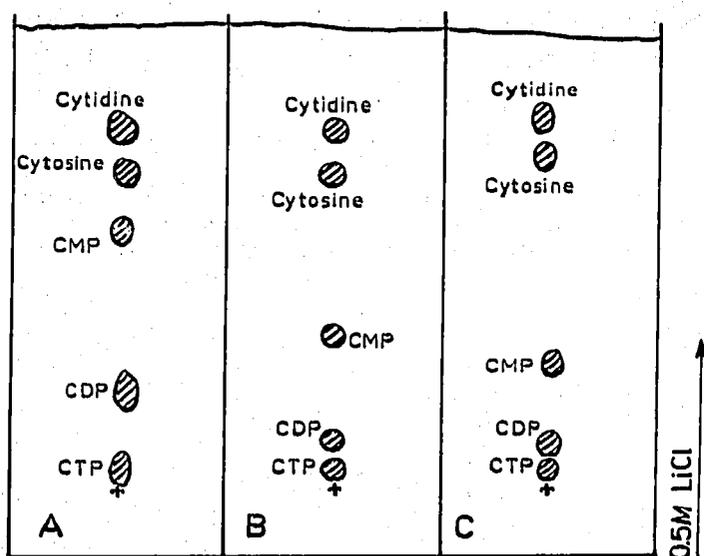


Fig. 1. Trennung von Nucleoderivaten auf (A) PEI-Cellulose Platte-(Merck), (B) PEI-Cellulose Folie (hergestellt im eigenen Laboratorium) und (C) PEI-Cellulose Folie (Macherey & Nagel). Alle Experimente unter identischen Bedingungen. Fließmittel: 0.5 M HCl.

\* 5. Mitteilung in der Reihe *Dünnschichtchromatographie von Nucleinsäure Basen, Nucleosiden, Nucleotiden und verwandten Verbindungen*. Für die 4. Mitt. vgl. Lit. 1.

PATAKI<sup>4</sup>). Wir haben in unserem Laboratorium einerseits die Trennung von Nucleotiden und verwandten Verbindungen auf PEI-Cellulose Schichten verschiedener Provenienz untersucht, andererseits beschäftigten wir uns mit der Reproduzierbarkeit der Dünnschichtchromatographie auf PEI-Cellulose.

Wie Fig. 1 zeigt, ist die Substanztrennung stark abhängig von der Qualität des Schichtmaterials: Man erkennt, dass die Trennung derselben Substanzen unter identischen Bedingungen auf Merck-PEI-Cellulose Platten (links), auf Macherey Nagel-PEI-Cellulose Folien (rechts) bzw. auf PEI-Cellulose Folien, welche in unserem Laboratorium bereitet wurden (in der Mitte) verschieden ist. Es gibt, unseres Wissens, keine Angaben in der Literatur über die Reproduzierbarkeit der  $R_F$  auf PEI-Cellulose. Eine solche Untersuchung erschien uns für die Praxis wesentlich, da man in der Regel Trägerschichten im eigenen Laboratorium durch Imprägnierung von Cellulose mit Polyäthyleniminhydrochlorid herstellt und hierbei, zwangsläufig von Zeit zu Zeit, übrigens selbst bei industrieller Herstellung, immer wieder neue Ansätze des Imprägnierungsmittels benutzen muss. Es galt einerseits, die Reproduzierbarkeit von Schichten desselben Herstellungsansatzes zu untersuchen, andererseits mussten auch Chromatogramme an PEI-Cellulose Schichten durchgeführt werden, welche durch Imprägnierung von Cellulose mit verschiedenen Polyäthyleniminhydrochlorid-Ansätzen bereitet wurden. Ferner untersuchten wir die Stabilität von PEI-Cellulose Schichten, d.h. den Einfluss der Lagerung der Schicht bei Zimmertemperatur auf die  $R_F$ -Werte.

Die Reproduzierbarkeit der  $R_F$  auf PEI-Cellulose Schichten, welche unter identischen Bedingungen, unter Verwendung derselben Cellulose und desselben Ansatzes des Imprägnierungsmittels hergestellt wurden, ist in Tabelle I dargestellt. Die Standardabweichungen ( $^sR_F$ ) entsprechen grössenordnungsmässig den allgemeinen Erfahrungen in der DC<sup>5-7</sup>.

Wie Tabelle II zeigt, ist die Streuung der  $R_F$ -Werte, bei der Verwendung von verschiedenen PEI-Cellulose Ansätzen, ausserordentlich gering: Hierbei wurden sowohl die "äusseren" Bedingungen (wie z.B. Temperatur: 22-24°; relative Luft-

TABELLE I

$R_F$ -WERTE<sup>a</sup> AUF PEI-CELLULOSE SCHICHTEN, WELCHE UNTER IDENTISCHEN BEDINGUNGEN, UNTER VERWENDUNG DESSELBEN AUSGANGSMATERIALS UND DESSELBEN ANSATZES DES IMPRÄGNIERUNGSMITTELS BEREITET WURDEN (CHROMATOGRAPHIE JEWEILS UNTER IDENTISCHEN BEDINGUNGEN)

Substanz	$R_F$ -Mittelwert	$^sR_F$ <sup>b</sup>	Anzahl der Messungen <sup>c</sup>
CTP	0.022	0.005	10
CDP	0.077	0.008	10
CMP	0.318	0.025	10
Cytosin	0.719	0.006	10
Cytidin	0.813	0.008	10

<sup>a</sup> Fliessmittel: 0.5 M LiCl; Sandwich-Kammer; 25 ml Fliessmittel; Laufstrecke: 10 cm; Auftragsstelle: 3 cm vom unteren Rand.

$$^b \ ^sR_F = \sqrt{\frac{(\bar{R}_F - R_F)^2}{n - 1}}$$

<sup>c</sup>  $R_F$ -Bestimmung auf zehn verschiedenen Chromatogrammen.

TABELLE II

$R_F$ -WERTE AUF PEI-CELLULOSE SCHICHTEN, WELCHE UNTER VERWENDUNG VERSCHIEDENER ANSÄTZE DES IMPRÄGNIERUNGSMITTELS BEREITET WURDEN

$R_F$ -Werte <sup>a</sup>					
Ansatz <sup>b</sup>	CTP	CDP	CMP	Cytosin	Cytidin
I	0.022	0.077	0.318	0.719	0.813
II	0.022	0.085	0.331	0.724	0.814
III	0.022	0.082	0.309	0.723	0.817
IV	0.023	0.081	0.334	0.746	0.837
V	0.023	0.077	0.373	0.778	0.860
VI	0.023	0.077	0.337	0.737	0.830
$R_F$ -Mittelwert	0.023	0.080	0.334	0.738	0.829
$sR_F$	0.0003	0.0034	0.022	0.022	0.018

<sup>a</sup>  $R_F$ -Mittelwert, bestimmt auf zehn verschiedenen Chromatogrammen des jeweiligen Ansatzes (vgl. Tabelle I).

<sup>b</sup> Die Schichten wurden unter Verwendung verschiedener Polyäthyleniminhydrochlorid-Ansätze bereitet, und die Chromatogramme (bei jedem Ansatz zehn) der verschiedenen Ansätze an verschiedenen Tagen durchgeführt.

feuchtigkeit: 41–48%) als auch die Chromatographiertechnik konstant gehalten.

Abschliessend soll noch über die Haltbarkeit von PEI-Cellulose Schichten bei Zimmertemperatur berichtet werden, da es hierüber keine Angaben gibt. RANDE-RATH<sup>2,3</sup> gibt lediglich an, dass PEI-Cellulose Schichten bei 0–4° im Dunkeln gelagert werden sollten. Zehn PEI-Cellulose Folien, welche gleichzeitig bereitet wurden, sind zur Haltbarkeitsprüfung benutzt worden. Sie wurden bei Zimmertemperatur (21–23°) im Dunkeln gelagert. In Intervallen von je elf Tagen wurde jeweils ein Chromato-

TABELLE III

HALTBARKEITSPRÜFUNG VON PEI-CELLULOSE SCHICHTEN (VGL. TEXT)<sup>a</sup>

Folie	CTP	CDP	CMP	Cytosin	Cytidin
1	0.030	0.225	0.465	0.765	0.860
2	0.025	0.085	0.325	0.695	0.775
3	0.030	0.095	0.330	0.715	0.820
4	0.040	0.155	0.430	0.700	0.795
5	0.045	0.165	0.460	0.715	0.810
6	0.020	0.085	0.340	0.725	0.820
7	0.020	0.090	0.370	0.735	0.825
8	0.035	0.085	0.370	0.715	0.790
9	0.030	0.085	0.340	0.720	0.825
10	0.020	0.080	0.345	0.725	0.825
$R_F$ -Mittelwert	0.030	0.115	0.378	0.721	0.815
$sR_F$	0.009	0.050	0.054	0.019	0.024

<sup>a</sup> Versuchsbedingungen wie in Tabelle I; Temperatur: 21–23°; relative Luftfeuchtigkeit: 33–55%.

gramm mit einem Testgemisch laufen gelassen. Der Zeitunterschied vom ersten bis zum letzten Chromatogramm betrug demnach rund hundert Tage. Die bei der genannten Versuchsreihe gewonnenen Ergebnisse sind in Tabelle III dargestellt. Da sich die Standardabweichungen in Tabelle III von denjenigen in Tabelle I nur geringfügig unterscheiden, erweisen sich PEI-Cellulose Schichten als bemerkenswert stabil.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Die Reproduzierbarkeit der  $R_F$  von Nucleotiden und verwandten Substanzen auf Polyäthylenimin-Cellulose Schichten wurde untersucht. Die Standardabweichungen entsprechen grössenordnungsmässig den allgemeinen Erfahrungen in der Dünnschichtchromatographie. Die PEI-Cellulose Schichten erwiesen sich bei Zimmertemperatur drei Monate lang stabil. Die Substanztrennung ist aber stark abhängig von der Qualität des Schichtmaterials.

#### LITERATUR

- 1 G. PATAKI UND A. NIEDERWIESER, *J. Chromatog.*, 29 (1967) 133.
- 2 K. RANDEATH, *Biochim. Biophys. Acta*, 61 (1962) 852.
- 3 K. RANDEATH UND E. RANDEATH, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 111.
- 4 G. PATAKI, in J. C. GIDDINGS UND R. A. KELLER (Herausgeber), *Advances in Chromatography*, im Druck.
- 5 M. BRENNER, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI UND A. R. FAHMY, *Experientia*, 18 (1962) 101.
- 6 G. PATAKI, *Ergeb. Labor. Med.*, 2 (1965) 163.
- 7 G. PATAKI, *Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie*, Walter De Gruyter, Berlin, 1966, S. 47ff.

#### DISCUSSION

HAEFELFINGER: The  $R_F$  values are given up to three digits after the decimal point. As it has been already stated, it is questionable whether  $R_F$  values can be presented with such an accuracy.

HAI: In my opinion, the average values have been calculated to the next lower decimal in order to obtain more correct estimates of the standard deviations which might increase if the means were rounded up.

PATAKI: There is no doubt that  $R_F$  values should not be given in publications up to 3 digits after the decimal point. However, the lecture under consideration deals especially with the *reproducibility of  $R_F$  values*, and in this case, in my opinion, particularly if standard deviations are to be calculated, the *mean  $R_F$  values must* be calculated up to 3 digits. As Dr. HAI also pointed out, in this way it is possible to estimate more accurate standard deviations. As a matter of fact, the  $R_F$  values given in Table III are not *means* but they are *single* values. They have been calculated up to 3 digits after the decimal point, in order to be able to estimate small changes from day to day.