

Fig. 1. Chromosomes from the feather base of a female chick showing a single metacentric sex chromosome.

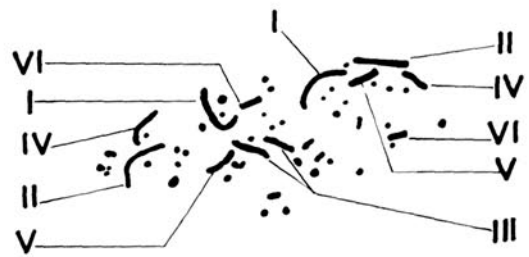


Fig. 2. Chromosomes from the feather base of a male chick showing two metacentric sex chromosomes.

spersed with numerable dot-like micro-chromosomes. A critical examination of the macro-chromosomes reveals the following sets (Figure 1 and 2). The largest two pairs of the macro-chromosomes are J-shaped, each with a prominent smaller limb. Macro-chromosomes of the third pair are rod-shaped and those of the fourth are again J-shaped with a diminutive smaller limb. The chromosomes of the fifth pair are the only metacentric elements in the macro-chromosome complement and these are the sex chromosomes. In the mitotic plates from the male birds (Figure 2) there are two metacentric sex chromosomes, while in the female there is only a single unpaired element (Figure 1). The chromosomes of the sixth pair appear as small rods.

Sexing of the newly hatched chicks can thus be easily done on the basis of paired or unpaired nature of the metacentric sex chromosome. Mitotic divisions from the above mentioned source are easily available and the hypotonic

water pretreatment (MAKINO and NISHIMURA²) prevents effectively the clumping to which the avian chromosomes are so susceptible.

Zusammenfassung: Beschreibung einer cytologischen Methode zur Bestimmung des Geschlechts junger Küken auf der Basis von gepaarten oder ungepaarten Geschlechtschromosomen.

A. KRISHAN

Department of Zoology, Panjab University, Chandigarh (Punjab, India), November 6, 1961.

² S. MAKINO and I. NISHIMURA, *Stain tech.* 27, 1 (1952).

³ I am deeply indebted to Dr. G. P. SHARMA, Panjab University, Chandigarh, for his kind supervision, helpful suggestions and laboratory facilities.

PRO EXPERIMENTIS

Zur Reproduzierbarkeit der Rf in der Dünnschicht-Chromatographie^{1,2}

In der Dünnschichtchromatographie wird bei gegebenem Fließmittel die relative Wanderungsgeschwindigkeit einer Substanz durch folgende Faktoren beeinflusst:

- (1) Qualität des Adsorbens.
- (2) Aktivierungsgrad der Schicht.
- (3) Schichtdicke.
- (4) Qualität des Fließmittels (Reinheitsgrad der Komponenten und Alter der Mischung).
- (5) Sättigungsgrad der Kammer.

(6) Technik (aufsteigende, horizontale oder absteigende Chromatographie).

(7) Laufstrecke und Entfernung des Startpunktes vom Eintauchspiegel («immersion line»).

(8) Aufgetragene Substanzmenge.

(9) Temperatur.

Diese Parameter haben jedoch verschiedenes Gewicht und sollen deshalb im folgenden kurz diskutiert werden. Hält man die wichtigen unter ihnen konstant, so resultieren durchaus reproduzierbare Rf.

¹ Der Ausdruck Rf-Wert ist bei häufiger Wiederholung umständlich. Wir gebrauchen an seiner Stelle: das Rf (Singular), die Rf (Plural).

² Die Mittel zur Durchführung dieser Arbeit verdanken wir Arbeitsbeschaffungskrediten des Bundes (M.B.) sowie einer Studienbeihilfe vom Land Baden-Württemberg (A.N.).

(1) Wie bei der Papierchromatographie von der Papiersorte³, so sind bei der Dünnschichtchromatographie die Rf von der Qualität des Schichtmaterials⁴ abhängig. Wir haben bei verschiedenen Lieferungen des Kieselgel G («Merck») grosse Unterschiede festgestellt*. Sollten diese durch eine bessere Kontrolle der Fabrikationsbedingungen nicht zu beheben sein, so besteht die Möglichkeit, die einzelnen Chargen durch leicht bestimmbare, theoretisch begründete Konstanten zu eichen. Wir werden in einer separaten Arbeit darauf zurückkommen⁵.

(2) Der Aktivierungsgrad der Schicht (Erhitzungsdauer⁶ und Temperatur) bedingt Affinitätsschwankungen innerhalb ein und derselben Lieferung des Schichtmaterials. Dies mag teilweise auf einem indirekten Effekt beruhen: bei hoher Temperatur aktivierte Schichten^{7,8} sind zweifellos mehr oder weniger hygroskopisch und daher bei Verwendung wasserfreier Fließmittel schon durch Feuchtigkeitsspuren veränderlich.

(3) Der Einfluss der Schichtdicke ist umstritten^{4,9-12}. Sicher ist, dass sie längs einer Platte konstant sein muss. Diese letztere Bedingung ist bei der Anwendung von schmalen Platten (200 × 50 mm) trotz Streichgerät häufig nicht erfüllt; die Folge ist ungleichmässige Bewegung des Fließmittels, damit Verzerrung der Flecken und eine Verschiebung ihrer Lage, die Rf-Angaben sinnlos macht¹³. Gleichmässige Schichten auf schmalen Platten dürften dagegen nach einer neuen, von Duncan entwickelten Technik erzielt werden¹⁴. Auf grösseren Platten (200 × 200 mm) ist die mit dem Stahlschen Streichgerät bereitete Schicht sowohl gleichmässig als auch von Platte zu Platte im Rahmen des Notwendigen reproduzierbar. STAHL hat Schichtdicken zwischen 0,2 und 0,3 mm miteinander verglichen und keinen Einfluss auf das Rf festgestellt¹¹. Manuell hergestellte¹⁵ oder aufgesprühte^{16,17} Schichten gewährleiten keine einheitliche Schichtdicke und sind deshalb nur mit Vorbehalt anwendbar.

(4) Es ist schon von der Papierchromatographie her bekannt¹⁸ und theoretisch verständlich, dass die Qualität des Fließmittels eine sehr grosse Rolle spielt. Auch bei sorgfältiger Kontrolle der Komponenten von Lösungsmittelgemischen können sich von Fall zu Fall Unterschiede ergeben, die auf nachträglicher Veränderung der Mischung beruhen. Wichtige Fehlerquellen sind partielles Verdunsten und chemische Reaktionen. Veränderungen durch partielles Verdunsten sind besonders leicht bei Anwendung der bedeckten Platte¹⁹ vermeidbar, wenn nur die für ein einziges Chromatogramm benötigte Fließmittelmenge in den Fließmittelbehälter eingefüllt wird. Chemischen Veränderungen kann man begegnen, indem man stets frische Gemische verwendet.

(5) Aus der Papierchromatographie ist bekannt, dass der Sättigungsgrad der Kammeratmosphäre das Rf wesentlich beeinflusst²⁰. Verdampft das Fließmittel während der chromatographischen Trennung von der Schicht, so wird die Fließmittelmenge vergrössert, welche zur Benetzung der vorgegebenen Strecke zwischen Start und Front benötigt wird. Die Dauer des Substanztransportes wird dadurch ebenfalls grösser und als Folge davon beobachtet man grössere Rf. Die Verdampfungsgeschwindigkeit nimmt von den Plattenrändern gegen die Plattenmitte etwas ab. Für sich allein ist dies erfahrungsgemäss ohne grossen Einfluss auf das Substanzverhalten; die Laufstrecken am Plattenrand und in der Plattenmitte unterscheiden sich nicht wesentlich. Bewirkt indessen der Verdampfungsunterschied Änderungen in der Zusammensetzung von Fließmitteln, die aus Komponenten verschiedener Polarität bestehen, so können sehr grosse Randeffekte auftreten^{11,21}. Sie lassen sich vermeiden, wenn man die Kammerwände mit Filterpapier ausschlägt («Kammer-

übersättigung»¹¹, «Kammersättigung»²²) noch besser wird die Annäherung an das Dampfdruckgleichgewicht, wenn die Kammer vor dem Einbringen der Platten zusätzlich geschüttelt wird. Der Grad der Kammersättigung beeinflusst das Rf eventuell noch über einen anderen Mechanismus. Bei zusammengesetzten Fließmitteln entwickelt sich längs des Chromatogramms infolge von Frontalanalyse ein Konzentrationsgradient. Dieser Erscheinung wirkt aber die Diffusion aus der Gasphase entgegen^{23,24}. Bei hoher Kammersättigung entstehen deshalb flachere Gradienten als bei geringer Sättigung; mit der Steilheit des Gradienten verschieben sich zwangsläufig auch die betroffenen Rf.

(6) Unterschiede im chromatographischen Verhalten, welche auftreten, wenn man von aufsteigender Chromatographie zu horizontaler¹⁹ oder absteigender Chromatographie übergeht, dürften unter anderem ebenfalls auf einer Änderung des Gradienten beruhen. Ein schöner Vergleich zwischen aufsteigender und absteigender Papierchromatographie findet sich bei BUNGENBERG DE JONG und HOOGEVEEN²³. Diese Autoren nennen als Hauptgrund für die Rf-Unterschiede das Auftreten von Konvektionsströmungen in der Gasphase; aus dem Papier oder aus der Schicht verdunstetes Fließmittel sinkt nach unten. Bei absteigender Chromatographie wird dadurch der Transport von Fließmittelkomponenten durch den Dampfraum in der Fließrichtung begünstigt. Hier kann also ein Konzentrationsgradient, welcher durch Frontalanalyse des Fließmittels entstanden ist, besser ausgeglichen werden als beim aufsteigenden Verfahren.

(7) Gelegentlich bemerkt man bei Verwendung von Fließmitteln, welche aus mehreren Komponenten zusammengesetzt sind, eine Abhängigkeit des Rf von der Lauf-

* Wie wir hören, soll die Firma Merck bald ein standardisiertes Kieselgel liefern können, das diese Mängel nicht mehr aufweist.

³ R. POHLOUDEK-FABINI und H. WOLLMANN, *Pharmazie* 15, 590 (1960).

⁴ R. TSCHESCHE, F. LAMPERT und G. SNATZKE, *J. Chromatography* 5, 217 (1961).

⁵ M. BRENNER und G. PATAKI, *Helv. chim. Acta*, in Vorbereitung.

⁶ J. H. DHONT und C. DE ROY, *Analyst* 86, 527 (1961).

⁷ R. KUHN, H. WEIGANDT und H. EGGE, *Angew. Chemie* 73, 580 (1961).

⁸ E. CHERBULIEZ, B. BAEHLER und J. RABINOWITZ, *Helv. chim. Acta* 43, 1871 (1960).

⁹ R. JASPERSEN-SCHIB, *Pharm. Acta helv.* 36, 141 (1961).

¹⁰ G. MACHATA, *Mikrochim. Acta* 1960, 79.

¹¹ E. STAHL, *Arch. Pharm.* 292, 411 (1959); *Pharmazie* 11, 633 (1956).

¹² A. SEHER, *Fette, Seifen* 61, 345 (1959).

¹³ M. BRENNER, A. NIEDERWIESER und G. PATAKI, *Exper.* 17, 145 (1961).

¹⁴ C. R. DUNCAN, *J. Chromatography*, im Druck.

¹⁵ Vgl. z.B. G. PASTUSKA, *Z. analyt. Chemie* 179, 355, 427 (1961); G. PASTUSKA und H. TRINKS, *Chem. Z.* 85, 535 (1961); L. MECKEL, H. MILSTER und U. KRAUSE, *Textilpraxis* 10, 1032 (1961).

¹⁶ M. TÜRLEH und O. HÖGL, *Mitt. Lebensmitteluntersuch. Hyg.* 52, 123 (1961).

¹⁷ V. ČERNÝ, J. JOSKA und L. LABLER, *Coll. Czech. Chem. Comm.* 26, 1658 (1961).

¹⁸ J. M. HAYS und K. MACEK, *Handbuch der Papierchromatographie* (Fischer Verlag, Jena 1958), Bd. I, p. 141. Zur Temperaturabhängigkeit der Rf vgl. auch J. GASPARIČ, J. BORECKÝ, K. OBRUBA und J. HANZLIK, *Coll. Czech. Chem. Comm.* 26, 2950 (1961).

¹⁹ M. BRENNER und A. NIEDERWIESER, *Exper.* 17, 237 (1961).

²⁰ J. JAKUBEK, *Coll. Czech. Chem. Comm.* 24, 616 (1959).

²¹ E. DEMOLE, *J. Chromatography* 1, 30 (1958).

²² E. STAHL und P. J. SCHORN, *Z. physiol. Chem.* 325, 263 (1961).

²³ H. G. BUNGENBERG DE JONG und J. TH. HOOGEVEEN, *Proceedings (Amsterdam)*, Series B 64, 1 (1961).

²⁴ H. G. BUNGENBERG DE JONG und J. TH. HOOGEVEEN, *Proceedings (Amsterdam)*, Series B 64, 18, 167 und 183 (1961).

strecke. BUNGENBERG DE JONG und HOOGEVEEN²³⁻²⁵ untersuchten dieses Phänomen ausführlich bei der Chromatographie von Phosphatiden auf unbehandeltem und SiCl_4 -behandeltem Papier. Es beruht ebenfalls auf Frontalanalyse des Fließmittels. Die Grösse des Effektes hängt, wie man leicht zeigen kann, bei einem gegebenen System von der Distanz zwischen Startpunkt und Eintauchspiegel («immersion line») ab. Für die Praxis folgt daraus, dass man das Verhältnis der Strecken

$$\frac{\text{Eintauchspiegel} - \text{Startpunkt}}{\text{Eintauchspiegel} - \text{Front}}$$

konstant halten muss.

(8) In der Papierchromatographie sind die Rf nicht stark von der aufgetragenen Substanzmenge abhängig^{3,18}. Ihr Einfluss kann auch in der Dünnschichtchromatographie vernachlässigt werden, solange die aufgetragene Menge einen gewissen Grenzwert nicht überschreitet. Dieser Grenzwert ist substanzabhängig und sollte von Fall zu Fall bestimmt werden^{13,17,26,27}.

(9) Das chromatographische Verhalten wird bei der Dünnschichtchromatographie von der Temperatur weniger verändert²⁸ als bei der Papierchromatographie¹⁸. Wir untersuchten den Einfluss der Temperatur auf die Dünnschichtchromatographie von 9 Aminosäuren im Fließmittel Phenol/Wasser (75:25 g/g). Es ist erstaunlich, dass eine Temperaturerhöhung von 18 auf 38°C noch keine signifikante Veränderung der Rf-Mittelwerte aus je 8 Rf-Einzelwerten hervorruft (t-Test, statistische Sicherheit 95%). Bei 18 weiteren Aminosäuren scheint dies ebenfalls zuzutreffen; für eine statistische Prüfung liegt hier nicht genug Material vor. Zu bemerken ist indessen, dass sich die Standardabweichung des Rf im obigen Beispiel durch die Temperaturerhöhung nahezu verdoppelt.

Folgende *Arbeitsvorschrift* trägt den genannten Umständen Rechnung und hat sich in unserem Labor bewährt:

Innerhalb einer Versuchsreihe wird Kieselgel G aus ein und derselben Lieferung (Merck AG., Darmstadt) verwendet; man bereitet die Chromatoplaten (200 × 200 mm), wie früher beschrieben^{13,26}, und trocknet über Nacht an der Luft. Die Substanzproben (0,5–5 µg in 0,5 µl) werden 15 mm vom unteren Plattenrand entfernt aufgetragen; der Abstand zum seitlichen Rand betrage mindestens 15 mm und jener zwischen den Flecken wenigstens 8 mm. Vor dem Einstellen in die Trennkammer wartet man, bis das Lösungsmittel von der Platte vollständig verdampft ist, meistens genügen dazu einige Minuten²⁹. Als Fließmittel werden nur Lösungsmittel definierter Qualität und nur frisch bereitete Gemische verwendet. Man füllt 100–120 ml in die *lückenlos* mit Filterpapier ausgekleidete Trennkammer (Firma C. Desaga, Heidelberg) und schüttelt nochmals kräftig um, bevor die Platten vorsichtig eingestellt werden. Die Raumtemperatur sei vor und während der Chromatographie möglichst konstant³⁰. Die übliche Laufstrecke beträgt 10 cm; ist sie grösser oder kleiner, so vermerkt man dies bei der Rf-Angabe³¹. Das fertige Chromatogramm wird zur Revelation mit möglichst wenig Reagens-Lösung besprüht, um eine nachträgliche Verschiebung der Substanzflecken zu vermeiden. Dies ist besonders wichtig, wenn stark eluierende Reagenslösungen verwendet werden.

Zur Prüfung der Rf, die nach obiger Arbeitsvorschrift erhalten werden, haben wir anhand von insgesamt etwa 850 Rf-Einzelwerten von 42 Substanzen aus verschiedenen Verbindungsklassen (Aminosäuren, Peptide, 3-Phenyl-2-thiohydantoine, 2,4-Dinitrophenylaminosäuren und 2,4-Dinitrophenylamine) Standardabweichungen (\bar{s}_{Rf}) und daraus eine mittlere Standardabweichung (\bar{s}_{Rf}) bestimmt.

Für jede Substanz k wurde aus n Rf_k-Beobachtungen ($8 \leq n \leq 18$), die n Chromatogrammen auf n verschiedenen, aber mit Kieselgel identischer Qualität beschichteten Platten in einem passenden Fließmittel entnommen worden waren, nach (1) ein Rf_k-Mittelwert und nach (2) die Standardabweichung der Einzelwerte berechnet. Aus der Gesamtheit aller Standardabweichungen (total 60) ergab sich nach (3) der gesuchte Mittelwert der Standardabweichungen.

$$\begin{aligned} \bar{Rf}_k &= \frac{\sum Rf_k}{n} & s_{Rf_k} &= \sqrt{\frac{\sum (Rf_k - \bar{Rf}_k)^2}{n-1}} & \bar{s}_{Rf} &= \frac{\sum s_{Rf_k}}{60} \\ (1) & & (2) & & (3) \end{aligned}$$

Eine entsprechende Prüfung der horizontalen Technik¹⁹ an 160 Rf-Einzelwerten (10 Substanzen) lieferte ein \bar{s}_{Rf} aus 20 Standardabweichungen. Ferner erhielten wir für die absteigende Papierchromatographie auf der Basis von rund 2000 Rf-Einzelwerten von 16 Carbonsäuren in 6 verschiedenen «Chromatographischen Systemen»^{3,32} ein \bar{s}_{Rf} aus 108 Standardabweichungen. Schliesslich haben wir aus der Literatur 6 Standardabweichungen von Aminosäure-Rf in Zirkular-Papierchromatogrammen entnommen³³ (143 Rf-Einzelwerte, 3 Substanzen) und daraus ebenfalls den Mittelwert \bar{s}_{Rf} bestimmt.

Nachstehend sind die Mittelwerte der Rf-Streuungen bei den verschiedenen chromatographischen Techniken zusammengestellt:

	Anzahl	
	\bar{s}_{Rf}	s_{Rf}
Dünnschichtchromatographie: aufsteigend	0,016	60
horizontal ¹⁹	0,014	20
Papierchromatographie: absteigend	0,018	96
zirkular	0,014	6

Im Hinblick auf diese Daten können wir die Ansicht nicht teilen, wonach die Rf in der Dünnschichtchromatographie schlechter reproduzierbar seien als in der Papierchromatographie^{9,34-36}. Im allgemeinen wird man wohl bei beiden Verfahren mit etwa derselben Reproduzierbar-

²³ H. G. BUNGENBERG DE JONG und J. TH. HOOGEVEEN, Proceedings (Amsterdam), Series B 63, 228, 243 und 383 (1960).

²⁴ M. BRENNER und A. NIEDERWIESER, Exper. 16, 378 (1960).

²⁷ Die Rf von Zuckern (E. STAHL und U. KALTENBACH, J. Chromatography 5, 351 (1961)) sind bei Beladungen bis 10 µg, jene von Peptiden, 2,4-Dinitrophenylaminosäuren und 2,4-Dinitrophenylaminen bei Beladungen bis zu etwa 25 µg praktisch konstant.

²⁸ H. JATZKEWITZ und E. MEHL, Z. physiol. Chem. 320, 251 (1960).

²⁹ Säuren, Basen und Salze, die hierbei zurückbleiben, können die Chromatographie stören.

³⁰ Bei Verwendung viskoser Fließmittel ist es zeitsparend, zum Beispiel bei 40°C zu arbeiten.

³¹ Erreicht die Front das Ende der Laufstrecke (Plattenrand oder Begrenzung durch einen Querstrich), so wandern die Substanzen noch eine Weile weiter, indem der Fließmittelstrom nicht sofort aufhört. Die Rf können dabei bis zu 10 % zunehmen. Es ist also in dieser Beziehung besondere Vorsicht geboten! Vgl. ²⁶.

³² Wir danken den Herren Prof. Dr. R. POHLOUDEK-FABINI und Dr. H. WOLLMANN, Pharmazeutisches Institut der Universität Greifswald, für die freundliche Angabe dieser Zahlen.

³³ A. SAIFER und I. ORESKES, Anal. Chem. 25, 1539 (1953).

³⁴ H. LEHNER und J. SCHMUTZ, Helv. chim. Acta 44, 444 (1961).

³⁵ E. G. WOLLISH, M. SCHMALL und M. HAWRYLYSHYN, Anal. Chem. 33, 1138 (1961).

³⁶ K. SCHLÖGL, H. PELOUSEK und A. MOHAR, Monatsh. Chem. 92, 533 (1961).

keit rechnen dürfen. Wir glauben indessen, dass man in Veröffentlichungen R_f -Mittelwerte angeben und die Anzahl der zugrundeliegenden Einzelmessungen vermerken sollte.

Summary. Conditions are discussed which influence R_f on thinlayer chromatograms, and directions are given to guarantee good reproducibility. Variance of R_f on thin-

layer chromatograms is of the same order of magnitude as on paper chromatograms.

M. BRENNER, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI
und A. R. FAHMY

*Institut für Organische Chemie der Universität Basel
(Schweiz), 4. Dezember 1961.*

CONGRESSUS

Switzerland

11th International Conference on High-Energy Physics

CERN, Geneva, July 4–11, 1962

Sponsored by International Union of Pure and Applied Physics (IUPAP).

Enquiries: Scientific Conference Secretariat (E. W. D. STEEL) CERN, Geneva 23 (Switzerland).

Great Britain

Third International Reinforced Plastics Conference

London, November 28–30, 1962

Previous conferences organised by the Federation were held in Brighton in 1958 and in London in 1960.

The organising committee is now inviting the submission of papers for the conference and will welcome suggested titles, with short synopses, for consideration. These should be sent to The British Plastics Federation, 47–48 Piccadilly, London, W.1.

An outline of the programme, and the exact venue of the conference, will be announced later.