

einfachsten Falles, d. h. bei der kinetischen Energie Null und für den untersten Grundzustand des betrachteten Bruchstücks ermitteln läßt.

Schließlich kommt bei AP-Messungen an mehratomigen Molekülen häufig hinzu, daß eine gewisse Ionensorte bei zwei oder mehreren ganz verschiedenen Dissoziationsprozessen entstehen kann. Nicht immer liegen die AP-Werte dieser Ionensorte bei den verschiedenen Dissoziations-

prozessen so weit auseinander, daß sie in der Kurve für den Ionenintensitätsanstieg auch deutlich zu trennen sind. Ein günstiger Fall ist in Bild 9 dargestellt. Bei der Dissoziation von H_2S entsteht S^+ sowohl bei der Dissoziation zu $S^+ + H_2$ als auch zu $S^+ + 2 H^{12}$). Der letztere Prozeß hat vermutlich einen erheblich höher liegenden AP-Wert. Die Trennung der AP-Werte der beiden Prozesse ist hier gut möglich.

Eingeg. am 1. Juni 1953 [A 513]

Methode zur quantitativen Photometrie im kurzweligen UV und Anwendung zur Analyse von Nucleotiden und Nucleosiden

Von Dr. KURT WALLENFELS und WALTER CHRISTIAN

Aus dem biochemicalen Laboratorium Tutzing der C. F. Boehringer & Soehne GmbH. Mannheim-Waldhof

Für Messungen im kurzweligen UV ($\lambda \sim 260 \text{ m}\mu$) kann bei Verwendung einer Quecksilberniederdrucklampe mit Hilfe eines Schott-Filters und eines Strahlungsfängers, der aus einer Leuchtstoffschicht besteht, die Wellenlänge $253,7 \text{ m}\mu$ isoliert werden, so daß quantitative Messungen in diesem Bereich durchgeführt werden können.

Für die Arbeiten mit Nucleinsäuren, Nucleotiden, Nucleosiden, Purinen und Pyrimidinen ist die spezifische Eigenschaft dieser Verbindungen, ein ausgeprägtes Maximum der Lichtabsorption bei etwa $260 \text{ m}\mu$ zu besitzen, von ganz besonderer Bedeutung. Der Messung der Extinktion dieser Bande ist wegen der Schnelligkeit und Einfachheit für die quantitative Bestimmung der genannten Verbindungen stets der Vorzug zu geben, wenn sie prinzipiell möglich ist. Während man im langwelligen UV und im sichtbaren Bereich des Spektrums durch Kombination von geeigneten Spektrallampen mit Filtern eine Reihe definierter Linien isolieren und für die quantitative Photometrie benutzen kann, gab es bisher für das kurzwellige häufig benötigte UV ($\lambda \sim 260 \text{ m}\mu$) keine solche einfache Möglichkeit. Für das quantitative Arbeiten in diesem Bereich war daher ein kostspieliger Monochromator erforderlich. Wir möchten über eine Methode berichten, mit der es mit einfachen Mitteln gelingt, im kurzweligen UV zu photometrieren, und einige Anwendungsbeispiele der Methode geben.

Prinzip der Methode

Es wurde eine Quecksilber-Niederdrucklampe als Lichtquelle, welche die Linie $253,7 \text{ m}\mu$ in möglichst hoher Intensität emittiert, und ein für diese Wellenlänge möglichst spezifischer Strahlungsfänger verwendet. Als Lichtquelle eignet sich z. B. eine Röhre, wie sie für die Raumtemperaturverteilung vertrieben wird. Bild 1 zeigt die Intensitäten der verschiedenen Linien, welche von der Entkeimungslampe¹⁾ emittiert werden. Wir benutzen eine Mineral-Light-Lampe der U.V. Prod. Inc. South Pasadena

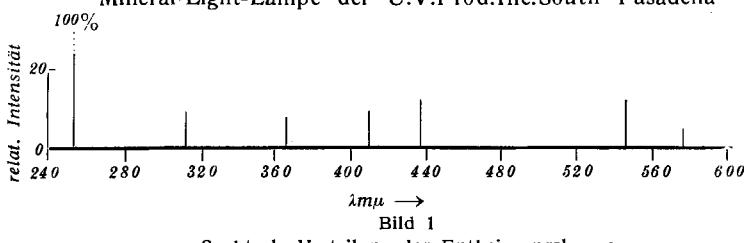


Bild 1
Spektrale Verteilung der Entkeimungslampe

¹⁾ Philips TUV 15 W. Die Wirksamkeit der Entkeimungslampe beruht ja auf einer möglichst intensiven Strahlung im Bereich der maximalen Absorption der Nucleinsäuren.

(California). Ein Schott-Filter UG 5 schaltet aus dem Licht dieser Lampe das langwellige UV und sichtbare Licht weitgehend aus. An störenden Wellenlängen sind dann noch die Linien 303, 313 und $334 \text{ m}\mu$ enthalten. Die Ausschaltung dieser Linien gelingt vollständig durch eine mit einer Leuchtstoffschicht überzogene Glasplatte, wobei der Leuchtstoff so gewählt wurde, daß er durch die Linie $253,7 \text{ m}\mu$ sehr stark, durch die Linien 303, 313 und 334 aber nicht in nennenswertem Umfang angeregt wird. Bild 2 zeigt das Absorptions-(Anregungs-)Spektrum eines $Zn-(SiO_4)_2$ -Leuchtstoffes mit MnO_2 -Zusatz²⁾. Die Absorption

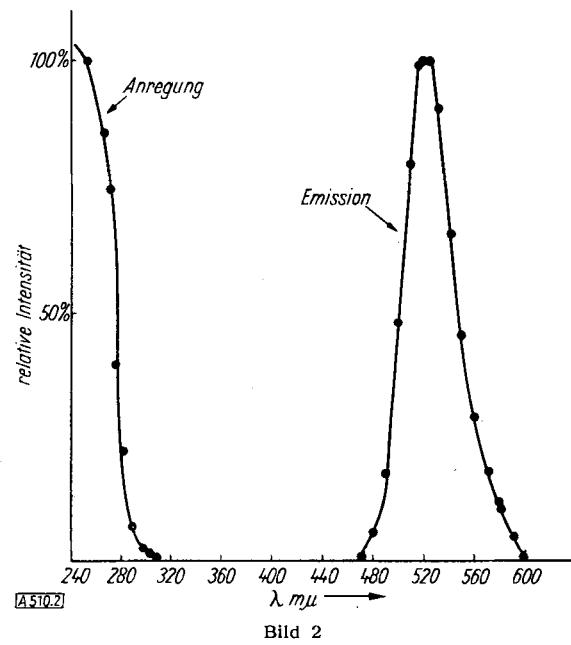


Bild 2
Absorptions- und Emissionsspektrum des Leuchtstoffes

beträgt bei $300 \text{ m}\mu$ nur noch etwa 1 % derjenigen bei $260 \text{ m}\mu$. In der Leuchtstoffschicht wird nun das kurzwellige UV in sichtbares Licht umgewandelt. Das Emissionsspektrum des Leuchtstoffes ist ebenfalls in Bild 2 dargestellt. Das vom Leuchtstoff emittierte Licht passiert

²⁾ Dr. Klasens, Eindhoven, danken wir für seine Unterstützung.

die Glasschicht, auf welcher der Leuchtstoff angebracht ist, ungeschwächt, während das nichtabsorbierte UV der genannten Wellenlängen in der Glasplatte und einem zur Sicherheit noch eingefügten Farbglasfilter vollständig absorbiert wird. Das Sekundärlicht, welches Leuchtstoff und Filterkombination liefern, ist also das ausschließliche Produkt der absorbierten Strahlung von der Wellenlänge 253,7 m μ , so daß die quantitative Messung dieses Sekundärlichtes die Intensität des mit der Wellenlänge 253,7 m μ in die Leuchtstoffschicht eingestrahlten Lichtes zu bestimmen erlaubt.

Bild 3 stellt die Anordnung dar, wie wir sie für die Absorptionsmessungen benützen.

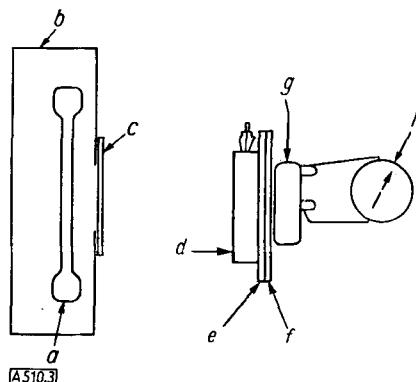


Bild 3

Versuchsanordnung. a) Mineral-Light-Lampe b) Lampengehäuse, c) Schott-Filter UG 5, d) Absorptionsküvette, e) Leuchtstoffplatte, f) Sperffilter, g) Photozelle, h) Galvanometer

Herstellung der Leuchtstoffplatte

Leuchtstoff S 17³) oder Zn(SiO₄)₂ + Mn von Philips¹⁾ werden in einer Lösung von Subitogen in Chloroform suspendiert und mit einem Zerstäuber, wie man ihn zum Besprühen von Papierchromatogrammen benützt, auf eine Glasplatte langsam aufgesprüht, bis eine gleichmäßige, jedoch dünne Schicht entstanden ist. Nachdem das Lösungsmittel vollständig verdunstet ist, ist die Leuchtstoffplatte gebrauchsfertig.

Quantitative Messungen

Adenin-Eichkurve: Bild 4 und Tab. 1 zeigen, daß die Extinktion zwischen 10 % und 90 % Lichtabsorption der Adenin-Konzentration proportional ist, d. h. die Intensitätsmessung wird durch kein Fehlerlicht, das längerwellig als 300 m μ ist, gestört⁴⁾.

Tab. 2 gibt eine Zusammenstellung der Extinktionen verschiedener Adenin-Verbindungen und anderer Basen.

Konz. [mg/cm ³] · 10 ⁻²	log $\frac{J_0}{J}$	$\frac{1}{c} \frac{1}{d} \log \frac{J_0}{J}$ [cm ³ /cm mg]
0,158	0,073	92,6
0,268	0,120	89,6
0,456	0,205	89,8
0,775	0,345	89,2
1,318	0,586	88,8
2,240	1,025	91,2
3,810	1,683	88,6

$$\epsilon'_{254} = 89,8 \frac{\text{cm}^3}{\text{cm} \cdot \text{mg}}$$

$$\epsilon_{254} = 17,0 \cdot 10^3 \frac{\text{cm}^3}{\text{mMol} \cdot \text{cm}}$$

Tabelle 1
Extinktion von Adenin bei verschiedenen Konzentrationen

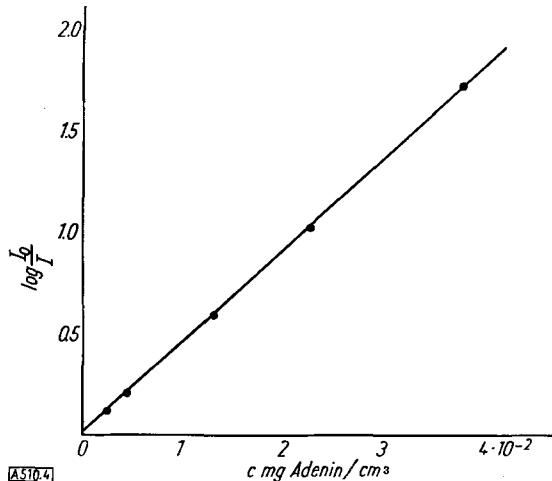


Bild 4. Extinktion von Adenin

Bestimmung der Komponenten eines Leberhydrolysates⁷⁾

1.) Elektrophorese: 10 mm³ Leberextrakt werden als Streifen auf ein Papierband von 4-30 cm in der Mitte aufgetragen und bei pH 5,5 und 400 V der Elektrophorese unterworfen. Die bei 254 m μ absorbierenden Stoffe lassen sich durch die Mineral-Light-Lampe lokalisieren, sie wandern als schmales Band, getrennt von den übrigen Bestandteilen des Extraktes. Das bei 254 m μ absorbierende Band wird ausgeschnitten und mit 3 cm³ n/10 HCl extrahiert. Nucleosid-Gehalt: d = 0,5 cm, $\log \frac{J_0}{J_{254}}$ = 0,103.

10 mm³ Extrakt enthalten eine 14 γ Adenosin entsprechende Menge von spezifisch absorbierenden Stoffen, welche durch anschließende Papierchromatographie identifiziert werden können.

2.) Papierchromatographie: Drei bei 254 m μ absorbierende Streifen aus Elektropherogrammen werden mehrmals mit Wasser extrahiert, die vereinigte Lösung wird eingedampft und der Rückstand in 50 mm³ Wasser aufgenommen. Die Gesamtmenge wird durch mehrmaliges Aufbringen von je 5 mm³ auf den Startpunkt des

Substanz	Summenformel	Molgewicht	Lösungsmittel	ϵ'_{254}	ϵ_{254}
Adenin	C ₆ H ₅ N ₅ · 3 H ₂ O	189	n/10 HCl	89,8	17,0 · 10 ³
Adenosin	C ₁₀ H ₁₅ O ₄ N ₅	267	n/10 HCl	49,3	13,2 · 10 ³
Adenosin-5-phosphat ⁸⁾	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₇ P	348	n/10 HCl	38,3	13,3 · 10 ³
Adenosin-Diphosphat-Ba ⁶⁾	Ba _{1,6} (C ₁₀ H ₁₅ O ₁₀ N ₅ P ₂) · 4 H ₂ O	702	n/10 HCl	19,7	13,8 · 10 ³
Adenosin-Triphosphat-Ba ⁶⁾	Ba ₂ (C ₁₀ H ₁₅ O ₁₃ N ₅ P ₃) · H ₂ O	850	n/10 HCl	15,8	13,4 · 10 ³
Adenyl-thiomethylpentose ⁸⁾	C ₁₁ H ₁₅ O ₈ N ₅ S	297	n/10 HCl	45,9	13,6 · 10 ³
Hefenkleinsäure (Merck)			n/10 HCl	11,3	
Guanosin	C ₁₀ H ₁₅ O ₅ N ₅	283	n/10 HCl	42,2	11,9 · 10 ³
Xanthin	C ₆ H ₄ O ₂ N ₄	152	n/10 HCl	25,4	38,6 · 10 ³
			n/10 NaOH	48,4	7,4 · 10 ³

Tabelle 2. Extinktionen verschiedener Adenin-Verbindungen

³⁾ Von Prof. A. Schleede, Ladenburg a. N., freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

⁴⁾ Zur Abweichung der molaren Extinktion des Adenins vgl. die Verschiebung dieser Bande: O. Warburg, W. Christian u. A. Giese, Biochem. Z. 232, 157 [1953].

⁵⁾ Präparate der Schwarz Laboratories Inc. New York.

⁶⁾ Wir danken Prof. F. Weygand, Tübingen, für dieses Präparat.

⁷⁾ Präparat der Deutschen Laevosan Gesellschaft, C. F. Boehringer u. Soehne G. m. b. H. u. Co.

Chromatogramms gebracht und mit dem Lösungsmittel (n-Butanol, Wasser, Ameisensäure) chromatographiert.

4

Die Lokalisation mittels der Mineral-Light-Lampe zeigt vier Flecken, Bild 5, welche ausgeschnitten werden. Nach Extraktion mit je 3 cm^3 n/10 HCl werden die Extinktionen ($d=0,5 \text{ cm}$) für $254 \text{ m}\mu$ gemessen, Tab. 3.

3

In demselben Chromatogramm wurde zum Vergleich Adenosin aufgetragen. Nach der chromatographischen Verteilung ergab sich nur ein Fleck, welcher ausgeschnitten und mit n/10 HCl extrahiert wurde. Die Extinktionsmessung zeigte Übereinstimmung zwischen der im Adenosinfleck bestimmten und der aufgetragenen Menge. Die Mengen der einzelnen Komponenten wurden als Adenosin gerechnet. Nach Identifizierung eines Fleckes und Benutzung des dieser Substanz entsprechenden ϵ -Wertes läßt sich leicht die wirkliche im Gemisch enthaltene Menge einer einzelnen Komponente errechnen.

Startpunkt

A 510.5

Bild 5
Papierchromatogramm eines Leberextraktes

Fleck	$\log \frac{J_0}{J}$	$c[\gamma/\text{cm}^3]$	γ Adenosin/Fleck
1	0,030	1,22	3,66
2	0,030	1,22	3,66
3	0,221	8,98	27,0
4	0,089	3,61	10,8

Tabelle 3

Auswertung des Papierchromatogramms. Summe der Flecke: $45,12 \gamma$; auf Startpunkt aufgetragen: $42,2 \gamma$. (Gesamtmenge aus 30 mm^3 Leberextrakt)

Analytische Verfolgung einer Chromatographie am Ionenaustauscher nach W. G. Cohn und C. G. Carter⁸⁾

Ionenaustauscher: Amberlite IRA 400.

Schichtdicke 3 cm, 1 cm^2 -Rohr.

⁸⁾ J. Amer. Chem. Soc. 72, 4273 [1950].

Zuschriften

Extraktion organischer Gifte aus Leichenteilen mit Ultraschall

Von Dipl.-Chem. W. K A T T E und Prof. Dr. habil. W. S P E C H T
Aus dem Bayerischen Landeskriminalamt München

In Anlehnung an andere bereits großtechnisch angewandte Ultraschallextraktionen wurde versucht, aus entsprechend vorbereitetem Organmaterial Giftstoffe zu isolieren. Hierzu wurden die fein zermahlenen Leichenteile zunächst bei entsprechendem pH fermentativ (Pepsin, Trypsin und Lipase) gespalten und vor allem die beim Verfahren nach Stas-Otto vielfach störenden Begleitstoffe wie Eiweiße und Fette weitgehend abgebaut^{1, 2)}. Die zumeist dünnflüssigen Aufschlußlösungen wurden einmal direkt, zum anderen nach Zusatz der 4-5-fachen Menge Alkohol bei 40-42 °C 1 h beschallt. Daneben liefen unter gleichen Bedingungen Kontrollansätze, die nicht mit Ultraschall behandelt wurden, aber auch solche, die ohne fermentative Vorbehandlung in alkoholischem Milieu Ultraschallwirkung ausgesetzt wurden. Als Schallquelle diente ein Quarzschwinger, dessen Schallkopf eine Gesamtleistung von ca. 45 Schallwatt erzeugte und bei einer Fre-

¹⁾ W. Kott: Der Nachweis des Strychnins in Organen, Naunyn-Schmiedebergs Archiv f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 162, H. 1/3 [1931].

²⁾ A. Mayer u. P. Dropmann: „Die Anwendbarkeit der Pepsinverdauung als Aufschlußverfahren für den Nachweis organischer Gifte“. Dtsch. Apotheker-Ztg., Südd. Apotheker-Ztg. Nr. 44, S. 836-837 [1952].

Aufgetragen wurden $2,5 \text{ cm}^3$ einer Hefeextraktfraktion, die mit Wasser auf 100 cm^3 verdünnt waren. Es wurde mit Wasser, n/10 Essigsäure, n/10 Ameisensäure, 0,02 n NaCl + 0,01 n HCl, 0,2 n NaCl + 0,01 n HCl und 1 n HCl eluiert und die Fraktionen mittels eines automatischen Kollektors in Mengen von je $12,5 \text{ cm}^3$ gesammelt. In diesen wurden nach geeigneter Verdünnung die Extinktionen für die Wellenlänge $254 \text{ m}\mu$ gemessen, Bild 6. Die jeweils

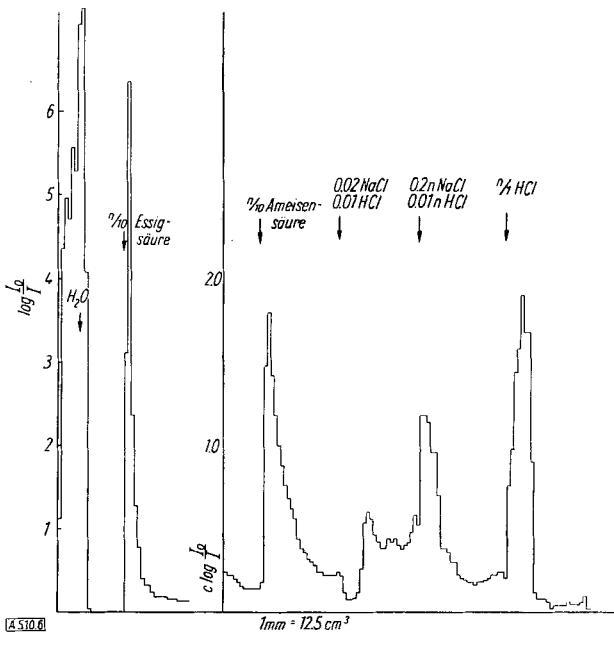


Bild 6
Elutionskurve einer Hefeextraktion

einem Maximum der Elutionskurve entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und papierchromatographisch oder durch biologischen Test identifiziert. Durch Benutzung der in Tab. 2 angegebenen ϵ -Werte läßt sich die im Hefeextrakt enthaltene Menge der einzelnen Basen bzw. Nucleotide ermitteln.

Eingeg. am 18. Juni 1953 [A 510]

quenz von 1000 kHz arbeitete. Nach der Schalleinwirkung wurden die Ansätze zentrifugiert und die Lösungen weiter bearbeitet. Die mit Ultraschall behandelten Proben waren deutlich klarer und leichter aufzubereiten als die entsprechenden Kontrollansätze. Ferner waren die durch Ultraschallextraktion erhaltenen Kristallisate sichtlich reiner und die Ausbeuten wesentlich höher, als bei den entsprechenden Kontrollversuchen. Es gelang sogar, leicht zersetzbare Barbitursäure-Derivate — wie Evipan — durch Ultraschallextraktion in wägbarer Menge zu isolieren und durch Schmelzpunktbestimmung zu identifizieren. Die mit Ultraschall behandelten Proben wiesen Giftausbeuten auf, die bei 50-90% — bezogen auf die enthaltene Giftmenge — lagen, während die Kontrollansätze nur 8-50% des jeweiligen Giftstoffes zu isolieren gestatteten. Die im Ultraschallverfahren ausgemittelten Kristalle waren teilweise so rein, daß sie direkt zur Schmelzpunktbestimmung herangezogen werden konnten. Die Ultraschallbehandlung der üblichen Stas-Otto-Ansätze allein, insbesondere aber das kombinierte Verfahren der Ferment- und Ultraschallbehandlung bietet vor allem auch bei alkalisch reagierenden Pflanzengiften den Vorteil der höheren Giftausbeute und einer außergewöhnlich hohen Reinheit der erhaltenen Kristalle. Die neuen Verfahrenswege weisen zusätzliche Vorteile gegenüber der bisherigen Arbeitsweise auf und verkürzen die übliche Methode wesentlich.

Nach Abschluß der umfangreichen Versuchsreihen wird über die Ergebnisse und deren Deutung an gleicher Stelle ausführlich berichtet.

Eingeg. am 6. August 1953 [Z 80]