

Zur Reinheit handelsüblicher Adenosin-5'-triphosphat-Präparate

Von Dr. HANNS SCHMITZ

Institut für experimentelle Krebsforschung der Universität
Heidelberg

Unterschiedliche Ergebnisse bei der Verwendung von handelsüblichem Adenosin-5'-triphosphat (ATP) in biochemischen Untersuchungen werfen die Frage nach der Reinheit der verwendeten Substanz auf. Kürzlich beschrieb *Marrian*¹⁾ das Vorkommen eines neuen Nucleotids in einem käuflichen ATP-Präparat. Auf Grund verschiedener chemischer und enzymatischer Analysen wurde diese mittels Anionenaustauschchromatographie isolierte Verbindung als Adenosin-5'-tetraphosphat identifiziert. *Sacks* und *Lutwak*²⁾ fanden in Handels-ATP ebenfalls Verbindungen, die auf Grund ihres Verhaltens sowie ihrer chemischen Zusammensetzung weder als ATP noch als ADP oder AMP angesprochen werden können. Hier sollen Ergebnisse, die bei der Prüfung der Reinheit einiger in Deutschland im Handel befindlicher ATP-Präparate gefunden wurden, beschrieben werden.

Methode: ATP-di-natriumsalz wurde in Wasser gelöst und mit 0,001 n KOH neutralisiert. ATP-Ba wurde durch Zugabe berechneter Mengen von Na₂SO₄ in das Na-Salz übergeführt. Die neutralen Lösungen wurden an einen Anionenaustauscher (Dowex-1, HCOO⁻) adsorbiert und durch kontinuierlich ansteigende Konzentrationen von HCOOH und einer Mischung von HCOOH + HCOONH₄ eluiert. Einzelheiten der Versuchsanordnung vgl.^{3,4,5,6)}.

Ergebnisse: In Bild 1 ist ein Anionenaustauschchromatogramm eines untersuchten ATP-Präparates (Nr. 3 der Tab. 1)

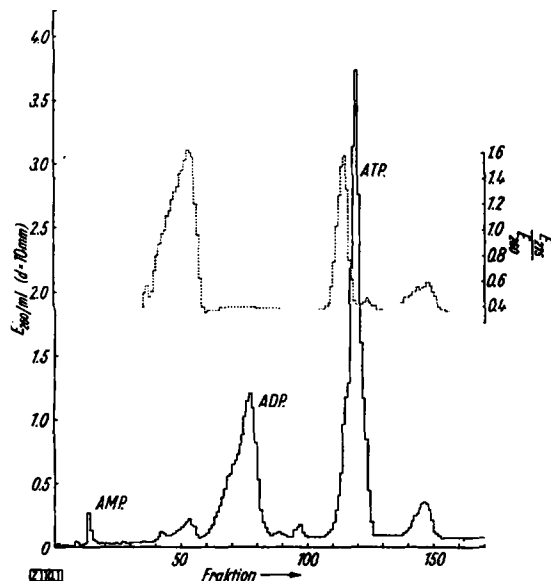


Bild 1

Als linke Ordinate ist die UV-Absorption bei 260 mμ (d = 10 mm) der auf der Abszissenachse aufgetragenen Fraktionen angegeben. Als rechte Ordinate ist der E_{275}/E_{260} -Quotient aufgetragen. Die Fraktionen wurden mittels eines automatischen Fraktionssammlers getrennt. Jede Fraktion hatte ein Volumen von 4 ml. Austauschbett: 0,8 × 18 cm. Die Mischflasche enthält zu Beginn des Versuches 300 ml dest. Wasser. Die Reservoirflasche enthielt 4 n HCOOH (Fraktionen 1–82), die dann (Fraktionen 83–Schluß) durch eine Mischung von 4 n HCOOH + 1 n HCOONH₄ ersetzt wurde.

wiedergegeben. Das Bild zeigt, daß außer ATP, ADP und AMP noch andere UV-absorbierende Verbindungen vorhanden sind. Diese Fraktionen enthalten Ribose und Phosphorsäure in wechselnden Mengen. Unter den Bedingungen der Bestimmungsmethode weisen AMP, ADP und ATP einen E_{275}/E_{260} -Quotienten von 0,4 auf, während in diesem Chromatogramm zwei kleinere Maxima und die ersten Fraktionen des als ATP bezeichneten Maximums einen sehr hohen Quotienten besitzen. Die Identifi-

zierung dieser Fraktionen mit den Quotienten bis zu 1,6 ist noch nicht abgeschlossen. Tabelle 1 enthält eine Zusammenfassung der Ergebnisse von 8 Präparaten.

Nr.	Hersteller	AMP	ADP	ATP	fremde Nucleotide
1	Bayer**)	12	16	65	4
2	Schuchardt**)	6,4	36,8	49	7,8
3	Henning	2	22	60	15
4	Waldhof	1,7	20	72,5	5,3
5	Waldhof (ATP ³²)	2	17	75	5
6	Deutsche Laevosan-Ges.	5	10	80	3
7	unbekannt	40	26	17	15
8	Pabst (USA)	6	7	77	5

Tabelle 1

Zusammensetzung einiger ATP-Präparate*)
(Angaben in Prozent)

*) Alle Analysen wurden an der Trockensubstanz des jeweiligen Präparates ausgeführt und betreffen nicht etwa für therapeutische Zwecke im Handel befindliche ATP-Lösungen.

**) Diese beiden Präparate wurden uns von Prof. Dr. Herken, Pharmakol. Inst. der Freien Universität Berlin, zur Prüfung auf ihren Reinheitsgrad übersandt.

Erwartungsgemäß enthielten alle analysierten Präparate neben ATP einen mehr oder minder großen Gehalt an ADP und AMP. Die Anwesenheit der beiden letztgenannten Verbindungen ist zum Teil durch unsachgemäße Lagerung (Zerfall zu ADP und AMP bei Zimmertemperatur) und auch durch Temperatureinwirkungen beim Versand zu erklären. Andererseits ist ATP-Na₂ eine so starke Säure, daß selbst unter größeren Vorsichtsmaßnahmen (Aufbewahrung im Tiefkühlfach) eine langsame Hydrolyse stattfindet. Für biochemische Untersuchungen wesentlich schwerwiegender zu bewerten erscheint jedoch der Befund, daß alle untersuchten Präparate außer AMP, ADP und ATP noch andere Nucleotide enthielten. In einem Falle wurde wie von *Marrian* Adenosin-5'-tetraphosphat gefunden. Aus anderen Präparaten konnten Nucleotide, die als Basen Guanin, Cytosin und Uracil enthielten, isoliert werden. Aus einem Präparat wurden auch kleine Mengen einer Substanz isoliert, die spektrophotometrisch mit Harnsäure identisch ist. Inwieweit die genannten Verbindungen biochemische Untersuchungen unerkannt beeinflussen können sei hier nicht erörtert. Es soll aber darauf hingewiesen werden, daß z. B. die Freisetzung von anorganischem Phosphat aus Adenosin-5'-tetraphosphat durch die ATP-ase von Myofibrillen um den Faktor 2 kleiner ist, als wenn ATP als Substrat verwendet wird. Es sei auch an die Beobachtung (*Slaters*⁷⁾) erinnert, der in käuflicher ATP mehr säurelabiles Phosphat fand, als ihrem Gehalt an ATP und ADP entsprach.

Eingeg. am 31. Mai 1954 [Z 110]

Zum Aufsatz „Katalyse durch Ionenaustauscher“

Von Dipl.-Chem. F. HELFFERICH,
Göttingen

Nach der Drucklegung des Aufsatzes in dieser Zeitschrift 66, 241 [1954] wurden mir noch folgende Einzelangaben über einige technische Verfahren zugänglich gemacht:

Veresterung von Adipinsäure mit Dodecylalkohol bei 120 °C in einer Kolonne. Säure und Alkohol werden am Kopf der Kolonne, Benzol von 80 °C in der Mitte der Kolonne eingespeist. Am Kopf destillieren Benzol und Wasser ab, der Ester wird in quantitativer Ausbeute unten abgezogen. In gleicher Weise wird bei 80 °C Stearinsäure mit Äthanol verestert (DBP. 878348, I.G.-Farbenindustrie, 1942).

Hydrolyse von Sebacinsäure-dimethylester, Bernsteinsäure-dimethylester, Essigsäureäthylester, Ölsäuremethylester, katalysiert durch H⁺-beladenen Kationenaustauscher in einer Kolonne. Eine Emulsion des Esters in verdünnter Schwefelsäure wird am Kopf der Kolonne eingespritzt, in der Mitte der

¹⁾ D. H. *Marrian*, *Biochim. Biophys. Acta* 13, 278 [1954].

²⁾ J. *Sacks* u. L. *Lutwak*, *Federation Proc.* 12, 468 [1953].

³⁾ R. B. *Hurlbert*, H. *Schmitz*, A. *Brumm* u. V. R. *Potter*, *J. Biol. Chemistry* 1954, im Druck.

⁴⁾ H. *Schmitz*, R. B. *Hurlbert* u. V. R. *Potter*, ebenda 1954, im Druck.

⁵⁾ H. *Schmitz*, V. R. *Potter*, R. B. *Hurlbert* u. D. M. *White*, *Cancer Res.* 14, 66 [1954].

⁶⁾ H. *Schmitz*, *Naturwiss.* 41, 120 [1954]; *Biochim. Biophys. Acta* 14, 160 [1954].

⁷⁾ E. C. *Slater*, *Biochemic. J.* 53, 157 [1953].

Kolonnen wird Wasserdampf eingeblasen. Die wäßrige Lösung der Säure läuft unten ab. (B. 6409, I.G.-Farbenindustrie, 1943; Patentanmeldung zurückgezogen).

Herstellung grobstückiger Austauscher zur Verwendung als Katalysatoren in technischen Anlagen durch Verkleben von Körnern normaler Größe mit pigmentfreiem Formaldehydharz-Lack oder durch Kondensieren mit Formaldehydharz-Preßpulver bei 160 °C und 0,25 atü (DBP. 877744, I.G.-Farbenindustrie, 1944).

Ich danke der Patentabteilung der Farbenfabriken Bayer, die mich in freundlicher Weise unterstützt hat.

Eingel. am 6. Mai 1954 [Z 107]

Anreicherung von Elementspuren¹⁾

Von Prof. Dr. C. MAHR und Dipl.-Chem. H. KLAMBERG

Universität Marburg

Anorganische Abteilung des Chemischen Institutes

Liegt ein zu bestimmendes Element in sehr verdünnter Lösung vor und enthält die Lösung gleichzeitig andere Stoffe in wesentlich höherer Konzentration, so ist fast immer eine Anreicherung erforderlich.

Einen neuen Weg zur Anreicherung fanden wir in einem der Rundfilter-Papierchromatographie nachgebildeten Verfahren. Es ist sehr einfach und führt ohne Wartung zum Ziel. Man benutzt ein Rundfilter F (Bild 1) der für Papierchromatographie gebräuchlichen Sorte S + S 2045b von ca. 11 cm Durchmesser, das zwischen

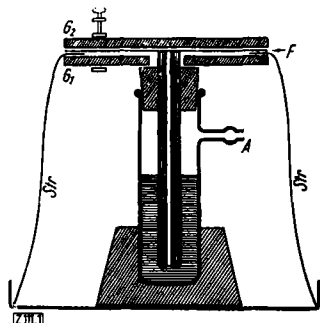


Bild 1

Schema der Versuchsanordnung zur Anreicherung von Elementspuren (G₁ und G₂ Glasplatten, F Rundfilter, Str Filtrierpapierstreifen)

einer durchbohrten und einer zweiten Glasplatte G₁ und G₂ eingelegt wird, die ihrerseits von drei Schraubklemmen mit geringem Druck zusammengehalten werden. Legt man die Scheiben so auf den Gummistopfen, der die Kapillare trägt, daß das Papier mit leichtem Druck auf der Endfläche der Kapillare aufliegt und stellt durch Hineinblasen bei A Kontakt mit der im Saugröhrchen befindlichen Analysenflüssigkeit her, so wird die Lösung durch die Kapillarkräfte des Papiers weiter nachgesaugt, die Lösungsmittelfront wandert durch das ganze Filter und die Flüssigkeit tropft schließlich durch die mit dem Filter in die Glasplatten ein-

¹⁾ Vgl. diese Ztschr. 66, 329 [1954].

geklemmten 3–4 Filtrierpapierstreifen Str ab. In einigen Stunden strömen ca. 3–5 ml Flüssigkeit durch Kapillare und Filter. Durch Imprägnieren des Papiers mit einem das gesuchte Element ausfallenden Reagenz suchten wir zu erreichen, daß der betr. Stoff festgehalten wird und damit den R_f-Wert 0 erhält. Damit das Imprägnierungsmittel nicht ausgewaschen werden kann, setzten wir es der zu analysierenden Lösung selbst zu. Der gesuchte Stoff befindet sich dann nach dem Versuch als Fleck in der Mitte der Filterscheibe. In einer Eisen(III)-salz-Lösung z. B. der Verdünnung 1:10⁷ (0,1 mg Fe/l) ist auch mit den empfindlichsten Reagenzien kein Eisen nachzuweisen. Läßt man die Lösung nach NaOH-Zusatz jedoch durch das Filter wandern, so scheidet sich Eisenhydroxyd an der Auflagestelle der Kapillare scharf begrenzt ab, wenn mehr als ca. 2 µg Eisen hindurchtraten; bei Mengen von Bruchteilen eines µg ist die Eisenanreicherung noch durch Entwickeln mit Kaliumcyanoferrat(II) nachzuweisen. Bei etwas größeren Mengen wurden auch aus sehr verd. Lösungen quantitative Abscheidungen erhalten. Da man sich, selbst bei der angegebenen Verdünnung, immer noch weit über dem Löslichkeitsprodukt des Eisenhydroxyds befindet, ist anzunehmen, daß das Hydroxyd schon kolloid in der Lösung vorliegt. Es wird dann beim Eintritt der Lösung in das Papier ausgeflockt. Die Ausflockung positiv geladener Sole an Filtrierpapier ist schon früh beobachtet worden. Bei unserer „Punkt-Flockung“ (1 mm²) gesammelter Niederschlag kann mit einer kleinen Scheibe des Filters ausgestanzt werden und entweder direkt oder nach Versetzen des Scheibchens gelöst werden. Die um den Faktor 10–100 konzentrierte Lösung kann mikrochemisch oder spektralanalytisch weiter untersucht werden. Im Gegensatz zu Sahlbom²⁾ fanden wir, daß auch negativ geladene Sole am Papier ausgeflockt werden. 1:5·10⁶ verd. Bleisalz-Lösungen, die auch in einigen um Schichtdicke mit H₂S keine erkennbare Braunfärbung mehr ergeben, zeigen bei der Punktflockung noch braune, scharf begrenzte Sulfid-Ausscheidungen. Die Erscheinung ist aber nicht auf solche gelartigen Niederschläge beschränkt, wie das Verhalten von Bleisulfat zeigt, das aus übersättigten Lösungen immer deutlich kristallin ausfällt: 1:10⁶ verd. und mit Schwefelsäure oder Sulfat versetzte Bleisalz-Lösungen, die während der Versuchsdauer keinen sichtbaren Niederschlag geben, scheiden bei der Punktflockung das Bleisulfat aus, das nach dem Entwickeln mit Ammoniumsulfid als brauner Fleck erkennbar ist. Legt man das Filter nach dem Hindurchtreten der beabsichtigten Menge stark verdünnter Bleisulfat-Lösung auf eine andere Kapillare und läßt 20–30 min reine Kaliumsulfat-Lösung hindurchfließen, so werden die Salze aller Elemente, die lösliche Sulfate bilden, weggespült. Dadurch ist die Abtrennung der Bleispuren von Kupfer, Arsen usw. möglich, auch wenn die Menge dieser Elemente das mehrhundertfache beträgt. Daß auch komplex zusammengesetzte Niederschläge abgeschieden werden, kann am Thallium gezeigt werden. Aus Lösungen, deren Verdünnung jenseits der Grenze sichtbarer Fällung liegt, läßt sich das Thallium als [Tl(TCA)₄](ClO₄)³⁾ niederschlagen (TCA = Thiocarbamid) und u. a. vom 200fachen Überschuß an Arsen trennen.

Dem Verfahren scheint ein großer Anwendungsbereich zuzukommen. Durch Abänderung der Apparatur konnten wir inzwischen die Verdünnungsgrenze weiter heraufsetzen, beim Eisen z. Zt. auf 1:10⁸. Auch liegt die Verwendung nichtwäßriger Lösungen nahe. Über weitere Ergebnisse soll später berichtet werden.

Eingel. am 25. Mai 1954 [Z 111]

²⁾ N. Sahlbom, Kolloidchem. Beihefte 2, 79 [1910/11].

³⁾ C. Mahr u. H. Klamberg, Mikrochemie 40, 390 [1953].

Versamlungsberichte

GDCh-Ortsverband Marl

am 12. April 1954

S. SKRAUP, Würzburg: Neuere Untersuchungen zur Schwefelung ungesättigter Verbindungen.

Einwirkung wäßriger Polysulfid-Lösungen verknüpft zwei Molekeln aliphatischer Äthylen-Derivate mit einem unsubstituierten H-Atom in α-Stellung mittels Schwefel-Brücke, welche ein oder mehrere Schwefel-Atome enthalten kann. So geschwefelte Ölsäure liefert, mit Glycerin verestert, einen „vollsynthetischen“ Faktis, entsprechend den Ansichten des Vortr. über deren Konstitution¹⁾.

¹⁾ Vgl. diese Ztschr. 64, 360 [1952].

So eingeführter, zweifellos von vornherein gebundener, Schwefel erweist sich, nach den Konvenienzmethoden der Kautschukindustrie bestimmt, als „freier“ Schwefel und nach des Vortr. Versuchen als „aktiv“ zur Bindung weiteren Äthylen-Derivates. In homogenem System führt die Behandlung mit Polysulfid zu einem für jedes untersuchte Äthylen-Derivat charakteristischen Gleichgewicht zwischen organisch gebundenem und restlichem Polysulfid-Schwefel. Die von diesen beiden Feststellungen aus weitergeführten Untersuchungen zum Problem des aktiven oder auch „freien“ Schwefels in Vulkanisaten werden im besonderen auch die im Arbeitskreis des Vortr. wieder stark hervortretende Klasse der Thiosulfoxyde R₂S–S zu berücksichtigen haben.

—S. [VB 562]