

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 Marrian¹⁾ 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 Lutwak²⁾ 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 einem 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)

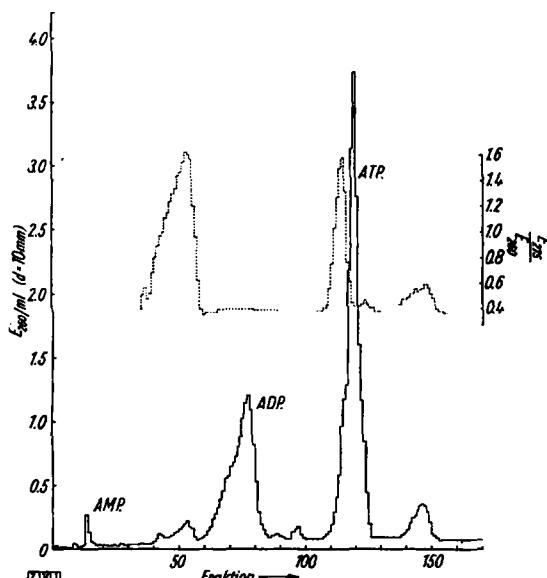


Bild 1

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 E₂₇₀/E₂₆₀-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 enthielt 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 E₂₇₀/E₂₆₀-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 Nucleotid-e
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 Präparats 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-Na, 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 enthalten, 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 Slaters⁷⁾ erinnert, der in käuflicher ATP mehr säurelabiles Phosphat fand, als ihrem Gehalt an ATP und ADP entsprach.

Ein eing. am 31. Mai 1954 [Z 110]

Zum Aufsatz „Katalyse durch Ionen austauscher“

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

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