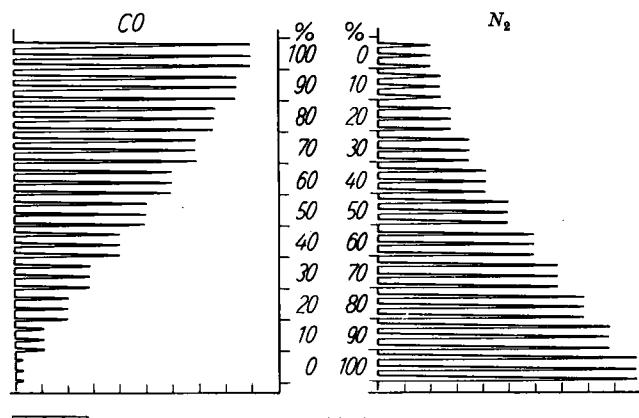
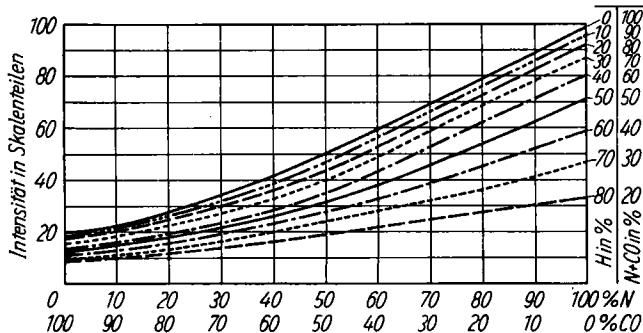


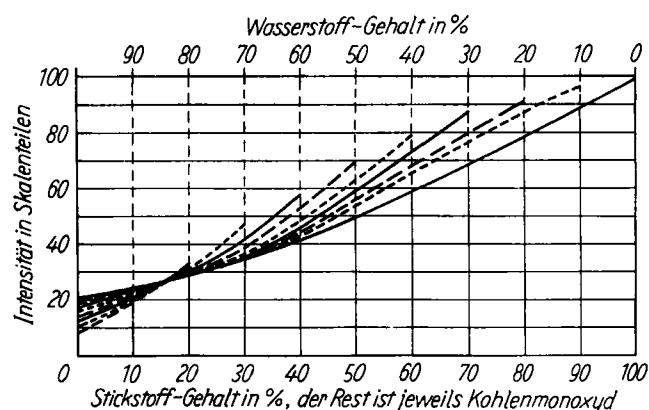
saugt und in ein Ölmanometer von 0,35 l Inhalt gedrückt. Von dort strömte es über ein Eckventil in das Entladungsrohr. Die Abb. 10 und 11 zeigen Eichkurven für Kohlenmonoxyd und Stickstoff. Die Intensität des Kohlenmonoxyds ist von dem Gehalt der beiden anderen Gase nur wenig abhängig und entspricht dem Partialdruck des Kohlenmonoxyds. Bei der Gasanalyse in Metallen kann man voraussichtlich diese Einflüsse vernachlässigen. Beimengungen von 0 bis 30 % Wasserstoff verringern bei hohen CO-Gehalten den Anstieg der Kurve, besonders im binären Gemisch. Die Eichkurven verlaufen in diesen Sonderfällen weniger steil. Treten hohe Wasserstoff-Gehalte neben geringen Kohlenmonoxyd-Gehalten auf, erhöht sich die Steilheit der Eichkurve bzw. die Intensität der CO-Bande. Die Intensität der Stickstoff-Banden wird durch steigenden Wasserstoff-Gehalt allgemein erhöht. Zur Auswertung dieser Eichkurven bedarf es der Bestimmung mindestens



A 948.9 Abb. 9  
Registrierkurven für CO und N (Konzentrationsreihen)



A 948.10 Abb. 10. Eichkurve für Kohlenmonoxyd



A 948.11 Abb. 11. Eichkurve für Stickstoff

eines der beiden anderen Partner. Die Eichungen für CO und N<sub>2</sub> liefern eine Varianz von 1 %. Bei der Messung des Wasserstoffs mittels des Gesamtlights beträgt sie 5 %.

### Bestimmung der Gase in Metallen

Zum Vergleich mit dem Heißextraktionsverfahren wurde das Spektralgerät mit der Gas-Sammeleinrichtung unmittelbar an das Heißextraktionsgerät angeschlossen. Dabei stellte sich heraus, daß die Hauptfehlerquellen des Heißextraktionsverfahrens nicht bei der Analyse, sondern bei der Extraktion liegen. Bei 30 Parallelmessungen an einem Stahl mit 0,015 % Sauerstoff in beiden Apparaturen wurde für die volumetrische Analyse für Sauerstoff eine Varianz von 11 %, für Stickstoff von 27 % gefunden. Dieser wird volumetrisch indirekt als Restgas bestimmt, was den höheren Fehler erklärt. Bei der Spektralmessung ergab sich für Sauerstoff eine Varianz von 8 %, für Stickstoff 17 %. Bei den Eichmessungen lagen die Fehler sehr viel niedriger. Schnelligkeit und Empfindlichkeit des Spektralverfahrens werden es erlauben, diesem Fehler nachzugehen. Durch mehrere Analysen während einer Extraktion läßt sich deren Ablauf verfolgen. Das Ziel, eine Analyse kleiner Gasmengen so schnell auszuführen, daß das Verfahren zur Überwachung von Schmelzen dienen kann, ist auf dem geschilderten Wege zu erreichen. Läßt man die Zeit für die Herstellung einer Probe außer Acht, so benötigt eine Einzelbestimmung einschließlich Einwaage und Auswertung 4 min, bei Bedienung des Gerätes durch zwei Personen 2½ min Zeit.

Einbegangen am 9. März 1959

[A 948]

## Trennung von Phosphorsäureestern durch Ionenaustausch-Chromatographie

Von Priv.-Doz. Dr. HANNS SCHMITZ und G. WALPURGER\*)  
Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, Marburg/L.

Es werden die Möglichkeiten und Grenzen der chromatographischen Trennung von Phosphorsäureestern aus sauren Gewebeextrakten untersucht. Zur Erfassung nicht oder wenig UV-absorbierender Metabolite erweist sich die zusätzliche Phosphat-Bestimmung in den Fraktionen als hilfreich. Gemeinsam eluierte, oder nur ungenügend getrennte Verbindungen können in den meisten Fällen mit Hilfe des optischen Testes sowie anderer Analysen einzeln und quantitativ erfaßt werden. Dies bedeutet, daß eine Kombination der Methoden der Ionenaustausch-Chromatographie mit denen der Enzymchemie für die Bestimmung möglichst vieler Stoffwechselprodukte zur Zeit den größten Erfolg verspricht.

### Einleitung

Unsere bisherigen Untersuchungen hatten das Ziel, in säurelöslichen Gewebe-Extrakten freie Nucleotide mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie nachzuweisen. Die Identität der Verbindungen wurde nach Re-chromatographie durch Bestimmung ihrer Phosphat- und Ribose-

Anteile, Aufnahme der Absorptionsspektren im UV-Bereich (215–300 m $\mu$ ) und falls erforderlich, durch weitere Analysen sichergestellt<sup>1, 2</sup>). In ähnlichen Untersuchungen an der Flugmuskulatur der Heuschrecke wurde damit begonnen, die Fraktionen der Chromatogramme auch auf ihren Gehalt an Phosphorsäure und Phosphorsäure-ester, die nicht Nucleotide sind, zu untersuchen<sup>3</sup>).

<sup>1</sup>) H. Schmitz, R. B. Hurlbert u. V. R. Potter, J. biol. Chemistry 209, 41 [1954].

<sup>2</sup>) H. Schmitz, Biochem. Z. 325, 555 [1954].

<sup>3</sup>) H. Schmitz, J. J. Saukkonen u. Th. Bücher, unveröffentl.

## Ergebnisse

Aus Abb. 1 gehen die Positionen der untersuchten Phosphorsäureester und einiger Nucleotide im Ionenaustausch-Chromatogramm hervor. Die Abbildung besteht aus zwei übereinandergelegten Chromatogrammen. Die Berechtigung zu dieser Darstellung ergibt sich aus Tabelle 1, die die Kongruenz der Gipelfraktionen von AMP, ADP und ATP in den beiden Chromatogrammen zeigt.

Chromatogramm	AMP	ADP	ATP
1	63	603	1204
2	64	605	1202

Tabelle 1. Kongruenz der Gipelfraktionen von AMP, ADP und ATP in den für Abb. 1 benutzten Chromatogrammen

Die in Abb. 1 gegebene Übersicht wird durch die Chromatogramme der Abb. 2 bis 4 ergänzt und verdeutlicht. Abb. 2 zeigt die Ergebnisse einer gesonderten Chromatographie von Äthanolamin-phosphat, Adenosin-5'-monophosphat, Sedoheptulose-7'-phosphat und Propandiol-phosphat. In Abb. 1 verschwinden die beiden zuletzt genannten Phosphorsäureester bzw. lehnen sich sehr eng an andere phosphat-haltige Verbindungen an. Chromatographiert man säurelösliche Extrakte aus der Flugmuskulatur von Heuschrecken, so erscheint Argininphosphat an der gleichen Stelle wie Äthanolamin-phosphat<sup>3</sup>.

Der in Abb. 1 mit G-6-P, F-6-P und  $\alpha$ -GP bezeichnete Doppelgipfel wurde mehrmals re-chromatographiert. Dabei ergab sich eine sehr enge Aufeinanderfolge von Glucose-6-phosphat (G-6-P) und Fructose-6-phosphat (F-6-P), wobei letzteres als „Schulter“ von Glucose-6-phosphat zu erkennen war. Mit diesem Ergebnis steht der in Abb. 3 wiedergegebene Befund im Einklang, dem eine enzymatische Bestimmung von Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat in den Fraktionen 171–225 (je 6 aufeinanderfolgende Fraktionen zu einer vereinigt) zugrunde liegt.

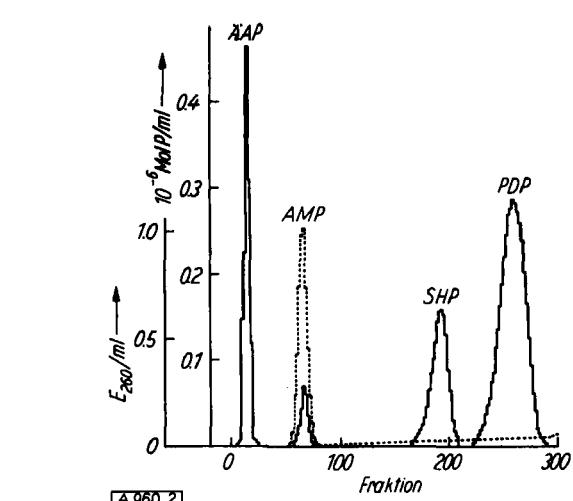
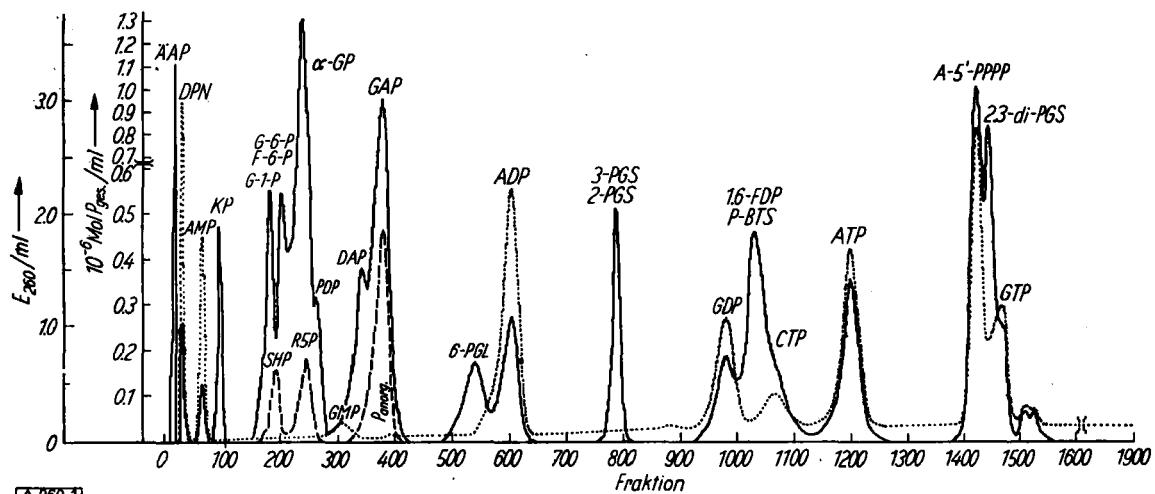


Abb. 2. Chromatographie von Äthanolaminphosphat, Adenosin-5'-monophosphat, Sedoheptulose-7'-monophosphat und Propandiol-phosphat. — Elutionsbedingungen und Abkürzungen vgl. Legende zu Abb. 1

nen war. Mit diesem Ergebnis steht der in Abb. 3 wiedergegebene Befund im Einklang, dem eine enzymatische Bestimmung von Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat in den Fraktionen 171–225 (je 6 aufeinanderfolgende Fraktionen zu einer vereinigt) zugrunde liegt.

Zur Identifizierung des in Abb. 1 mit 1,6-FDP und P-BTS bezeichneten Phosphatgipfels wurde analog verfahren. Die enzymatische Analyse dieser Fraktionen zeigt (Abb. 4), daß der Hauptanteil des Phosphoenol-pyruvates vor Fructose-1,6-diphosphat erscheint.



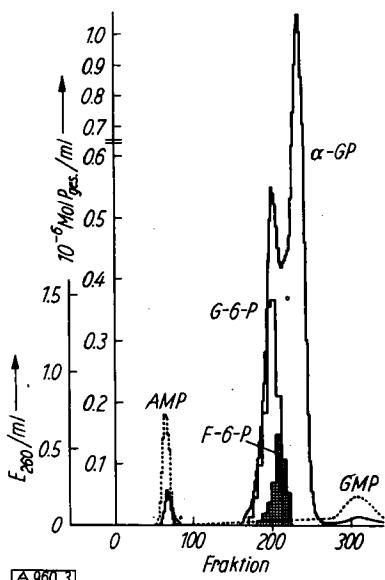
.... = Extinktion bei 260 m $\mu$ ; — und - - - = Phosphatwerte, Elutionsgeschwindigkeit: 1 ml/min. Die Reservoirflasche enthielt:

Faktion	1–284	1 n HCOOH	Faktion	700–1145	3 n HCOOH + 0,1 n HCOONH <sub>4</sub>
Fraktion	285–558	2 n HCOOH	Fraktion	1146–1277	3 n HCOOH + 0,2 n HCOONH <sub>4</sub>
Fraktion	559–699	3 n HCOOH	Fraktion	1278–1460	4 n HCOOH + 0,4 n HCOONH <sub>4</sub>
			Faktion	1461–Ende	4 n HCOOH + 1,0 n HCOONH <sub>4</sub>

Abkürzung	Phosphorsäureester	Gipelfraktion	Abkürzung	Phosphorsäureester	Gipelfraktion
AAP	Äthanolaminphosphat	16	Panorg.	anorgan. Phosphat	380
DPN	Diphosphopyridin-nucleotid	28	6-PGL	6-Phosphoglukonat	540
AMP	Adenosin-5'-monophosphat	66	ADP	Adenosin-5'-diphosphat	606
KP	Kreatinphosphat	94	3-PGS	3-Phosphoglycerat	788
SHP	Sedoheptulose-7'-phosphat	194	2-PGS	2-Phosphoglycerat	788
G-1-P	Glucose-1-phosphat	182	GDP	Guanosin-5'-diphosphat	982
G-6-P	Glucose-6-phosphat	202	1,6-FDP	1,6-Fructose-diphosphat	1036
F-6-P	Fructose-6-phosphat	202	P-BTS	Phosphoenol-pyruvat	1036
$\alpha$ -GP	$\alpha$ -Glycerophosphat	238	CTP	Cytidin-5'-triphosphat	1068
R-5-P	Ribose-5-phosphat	246	ATP	Adenosin-5'-triphosphat	1202
PDP	1,2-Propandiol-1-phosphat	262	A-5'-PPPP	Adenosin-5'-tetraphosphat	1426
GMP	Guanosin-5'-monophosphat	308	2,3-di-PGS	2,3-Diphosphoglycerat	1448
DAP	Dihydroxyacetophosphat	343	GTP	Guanosin-5'-triphosphat	1470
GAP	Glycerinaldehydphosphat	378			

Abb. 1. Elutionsfolge von Phosphorsäureestern im Ionenaustausch-Chromatogramm

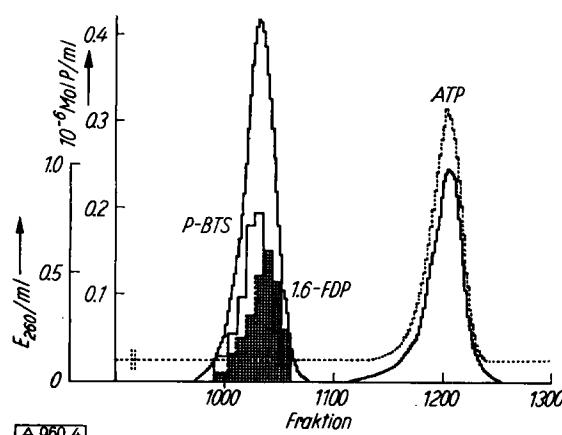
In Tabelle 2 sind die Ergebnisse von Phosphat-Bestimmungen einzelner Ester vor der Adsorption und nach der Elution einander gegenüber gestellt. Ein Vergleich der Summen von adsorbiertem und eluiertem Phosphat zeigt die



A 960.3

Abb. 3. Enzymatische Differenzierung der Fraktionen 171–225 des in Abb. 1 wiedergegebenen Chromatogrammes. Abkürzungen vgl. Legende zu Abb. 1

vollständige Wiedergewinnung des adsorbierten Materials an. Die meisten der in unseren Versuchen verwendeten Phosphatester sind enzymatisch gewonnen worden und waren zum Teil noch mit anderen, ebenfalls Phosphorsäure enthaltenden Verbindungen verunreinigt. Daher sind die Phosphat-Gehalte der Fraktionen des Adsorbates nicht in jedem Fall mit denen des Eluates vergleichbar.



A 960.4

Abb. 4. Enzymatische Differenzierung der Phosphoenol-pyruvat und 1,6-Fructose-diphosphat enthaltenden Fraktionen des in Abb. 1 wiedergegebenen Chromatogrammes. Abkürzungen vgl. Legende zu Abb. 1

	μM Phosphat adsorb.	μM Phosphat eluiert
Glucose-6-phosphat .....	17,5	
Fructose-6-phosphat .....	14,3	76,9
α-Glycerophosphat .....	45,1	
Dihydroxyacetone-phosphat .....	44,1	
Glycerinaldehyd-phosphat .....	14,9	59,0
Phosphoenol-pyruvat .....	22,1	
1,6-Fructose-diphosphat .....	17,9	40,0
3-Phospho-glycerat .....	18,5	
6-Phospho-gluconat .....	19,4	
2,3-Diphospho-glycerat .....	39,3	
Summe .....	253,1	255,1

Tabelle 2

Vergleich der adsorbierten und eluierten Menge einiger Phosphatester auf der Basis ihres Phosphat-Gehaltes

Verbindung	Konzentration im Eluat	
	a. d. Basis des Gesamt-phosphates	enzymatisch
Glucose-6-phosphat .....	16,8	19,1
Fructose-6-phosphat .....	13,7	6,9
Glycerinaldehyd-phosphat .....	14,3	8,0
Dihydroxyacetone-phosphat .....	29,2	4,4*)
Phosphoenol-pyruvat .....	21,2	15,4
1,6-Fructose-diphosphat .....	17,2	12,5
3-Phosphoglycerat .....	19,7	15,6

\*) 19 μM des adsorbierten Dihydroxyacetone-phosphats wurden enzymatisch als Lactat bestimmt\*: 19 μM Lactat, 19,3 μM anorg. Phosphat.

Tabelle 3. Vergleich der Konzentrationen von Phosphorsäureestern in den Eluat-Fraktionen auf der Basis ihrer Phosphat-Gehalte mit den enzymatisch ermittelten Werten

Stärkere Unterschiede ergeben sich zwischen den enzymatisch bestimmten Phosphat-Konzentrationen in den Eluatfraktionen und den Konzentrationen, die auf der Basis des Gesamtphosphats berechnet werden. Wie aus Tabelle 3 ersichtlich ist, liegen — außer bei Glucose-6-phosphat — die enzymatisch ermittelten Werte tiefer. Diese Unterschiede sind zum Teil durch unvollständige chromatographische Abtrennung und durch Verluste, die bei der Aufarbeitung (Gefriertrocknung, Wiederaufnahme) eintreten, zu erklären. Zum Teil sind sie auch durch die unterschiedliche Säurelabilität der Phosphatester bedingt. So standen z. B. die über Nacht eluierten Fraktionen bis zu 16 Stunden bei Zimmertemperatur (ca. 20 °C), ehe sie analysiert wurden. Wie sehr Temperatur und Zeit die quantitative Bestimmung labiler Verbindungen beeinflussen können, zeigt Tabelle 4 am Beispiel von Kreatinphosphat.

Temp. während Adsorption u. Elution	Temp. und Zeit zw. Elution u. Einfrieren		eingesetztes Kreatinphosphat [μM]	wiedergewonnenes Kreatinphosphat [μM]	% Zerfall
	Temp.	Zeit			
20 °C	20 °C	8 h	15,0	1,5	90
20 °C	20 °C	15 min	13,5	10,0	26
0–2 °C	0–2 °C	8 h	14,0	10,5	25
0–2 °C	0–2 °C	15 min	14,0	11,2	20

Tabelle 4. Einfluß von Temperatur und Zeit auf die Stabilität von Kreatinphosphat

Für die Bestimmung des Kreatinphosphates aus säurelöslichen Gewebeextrakten spielen diese Abbauvorgänge jedoch keine Rolle, da sie erst nach der Elution eintreten und die Gesamtmenge an Kreatinphosphat durch Phosphat- und Kreatin-Bestimmungen an den entsprechenden Fraktionen eindeutig ermittelt werden kann. Andererseits ergibt sich die Frage nach dem Verlust an Kreatinphosphat, der bei der Extraktion des Gewebes mit Perchlorsäure entsteht. Auf Grund von Versuchen an reinem Kreatinphosphat, das unter den für die Gewinnung von säurelöslichen Gewebeextrakten üblichen Bedingungen mit Perchlorsäure behandelt wurde, ermittelten wir einen Verlust von 12–15%, dem ein entsprechendes Auftreten von „wahrem“ anorganischem Phosphat entsprach. Dieser Zerfall muß also bei der Angabe der Kreatinphosphat-Gehalte von Geweben berücksichtigt werden. Analoge Versuche mit ATP, UTP und GTP ergaben einen Verlust von 0 bis 2%.

### Diskussion

Unsere Untersuchungen wurden vor allem mit dem Ziel einer gleichzeitigen Auftrennung von Nucleotiden und anderen Phosphorsäureestern, wie sie in säurelöslichen Gewebeextrakten enthalten sind, vorgenommen. Die bisher

\*) H. Weil-Malherbe in H. M. Rauen (Hrsg.): Biochem. Taschenbuch, Springer Verlag, Berlin 1956, S. 136.

beschriebenen Versuche<sup>5-13</sup>) zur Trennung von Phosphorsäureestern dienten vorwiegend zur Präparation und Reinigung einzelner Verbindungen. Unsere Ergebnisse zeigen, daß einer quantitativen, in einem Analysengang durchzuführenden Trennung von möglichst vielen, in biologischen Systemen vorkommenden Phosphorsäureestern durch Ionenaustausch-Chromatographie erhebliche Grenzen gesetzt sind. Als besonders hinderlich erweist sich die teilweise Überlappung von Phosphorsäureestern mit Nucleotiden. Dies wirkt sich bei der Auswertung von Chromatogrammen auf Nucleotide nur wenig aus, da deren Konzentration allein aus der UV-Absorption der entsprechenden Fraktionen errechnet werden kann. Phosphorsäureester, die nicht Nucleotide sind, lassen sich aber zum großen Teil enzymatisch qualitativ und quantitativ erfassen, so daß Störungen durch nur ungenügend oder nicht abgetrennte Verbindungen vermieden werden. Weitere Möglichkeiten zur Differenzierung ergeben sich durch zusätzliche Analysen, z. B. auf Ribose, Glucose und Fructose durch photometrische Auswertung der Farbreaktionen mit Orcin, Anthron und Diphenylamid.

Mehrere Versuche zur Abtrennung von Acetylphosphatschlügen fehl. Dies liegt wahrscheinlich daran, daß es während der Adsorption bei nahe dem Neutralpunkt liegendem  $p_H$ -Wert zerfällt. Glyceryl-phosphoryl-cholin und Glyceryl-phosphoryl-äthanolamin, zwei Verbindungen, die besonders in der Mark- bzw. Rindensubstanz der Niere von durstenden Hunden<sup>14</sup>) in hoher Konzentration vorkommen, bleiben am Anionenaustauscher wegen ihrer Ladung nicht haften, können aber aus dem Durchlauf isoliert werden<sup>15</sup>).

Ein besonderer Vorteil des beschriebenen Verfahrens liegt darin, daß Verbindungen, die nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommen, angereichert und damit der enzymatischen Bestimmung mit Hilfe des optischen Testes zugänglich werden. Auch andere, nicht phosphorylierte und sich der enzymatischen Bestimmung im Gesamtextrakt entziehende Metabolite können in wenigen Fraktionen angereichert und dadurch erfaßbar werden<sup>16, 17</sup>).

Trotz der erwähnten Nachteile der säulenchromatographischen Trennung dürfte die Kombination der Ionenaustausch-Chromatographie mit den Methoden der Enzymchemie zur Zeit die beste Möglichkeit zur Erfassung des Status der Metabolite eines Gewebes bieten.

## Experimenteller Teil

### a) Ionenaustauschchromatographie

Für die säulenchromatographische Trennung wurden von jedem Ester (handelsübliche oder von anderen Instituten zur Verfügung gestellte Präparate) etwa 10–20  $\mu\text{M}$  eingesetzt (ohne Berücksichtigung des auf der Basis des Gesamtphosphates angegebenen Reinheitsgrades). Den vereinigten Lösungen der Phosphorsäureester wurden einige Nucleotide beigefügt, um ihre Lokalisierung in Chromatogrammen aus Gewebeextrakten zu erleichtern. Um vergleichbare, d. h. möglichst deckungsgleiche Chromatogramme zu erhalten, wurde stets in gleicher Weise chromatographiert: Die Ausgangslösung wurde mit Rücksicht auf alkalifähige Verbindun-

- <sup>5</sup>) E. Bulbitz u. E. Kennedy, *J. biol. Chemistry* 211, 963 [1954].
- <sup>6</sup>) S. Aronoff, *Arch. Biochem. Biophysics* 32, 237 [1951].
- <sup>7</sup>) G. R. Barlett u. A. A. Marlow, *J. Lab. clin. Med.* 42, 188 [1953].
- <sup>8</sup>) R. M. McGready u. W. Z. Hassid, *J. Amer. chem. Soc.* 66, 560 [1944].
- <sup>9</sup>) B. L. Horecker, P. Z. Smyrniosis u. J. E. Seegmiller, *J. biol. Chemistry* 193, 383 [1951].
- <sup>10</sup>) D. P. Groth, G. C. Mueller u. G. A. Le Page, ebenda 199, 389 [1952].
- <sup>11</sup>) W. L. Byrne u. H. A. Lardy, *Biochim. biophysica Acta* 14, 495 [1954].
- <sup>12</sup>) M. Goodman, M. S. Atomic Energy Comm., National Science Foundation, Washington D. C., MCRL 1967, 80 [1952].
- <sup>13</sup>) J. X. Khyu u. W. E. Cohn, *J. Amer. chem. Soc.* 75, 1153 [1953].
- <sup>14</sup>) K. J. Ullrich, *Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere* 262, 551 [1956].
- <sup>15</sup>) H. Schimassek, D. Kohl u. Th. Bücher, *Biochem. Z.* 331, 87 [1959].
- <sup>16</sup>) H. Busch, R. B. Hurlbert u. V. R. Potter, *J. biol. Chemistry* 717, 196 [1952].
- <sup>17</sup>) Th. Bücher u. Mitarb., unveröffentlicht.

gen auf  $p_H$  6–6,5 eingestellt und an den basischen Austauscher Dowex 2X10,  $\text{HCOO}^-$ , 200 bis 400 mesh adsorbiert (Austauschertbett: 1 cm Ø, 36 cm Länge). Die kontinuierliche Elution wurde im Prinzip wie früher beschrieben<sup>1</sup>) durchgeführt, jedoch statt Preßluft eine elektrisch betriebene Schlauchpumpe benutzt.

Der kontinuierliche Konzentrationsanstieg wurde mit einem Mischflaschen-System erreicht, bei dem bis zu vier Vorratsflaschen, die Ameisensäure bzw. Ameisensäure und Ammoniumformiat enthalten, über einen vierfach umschaltbaren Quetschhahn mit einem gemeinsamen Zuleitungsschlauch verbunden werden können. Das Prinzip dieses Quetschhahnes beruht darauf, daß eine Achse mit zwei in Längsrichtung um etwa 4 cm auseinanderliegenden Einkerbungen versehen ist, die um  $90^\circ$  gegeneinander versetzt sind. Schläuche aus den Vorratsflaschen werden auf der Höhe der Einkerbungen fest gegen die Achse gepreßt (je zwei einander gegenüber). So kann nur aus dem Schlauch Lösung in den zum Austauscher führenden gemeinsamen Zuleitungsschlauch gelangen, der in einer Kerbe liegt. Durch Drehen der Achse um jeweils  $90^\circ$  kann man die Vorratsflaschen nacheinander an die Säule anschließen. Ein automatischer Wechsel zwischen den Vorratsflaschen wird durch einen Mitnehmer erreicht, der sich am Tellergestell des Fraktionssammlers befindet und der ein am Ende der Achse befestigtes Kreuz bei der gewünschten Fraktion um  $90^\circ$  dreht. Aus den Vorratsflaschen gelangt die Lösung in eine Mischflasche (zu Beginn des Versuches mit 500 ml Wasser gefüllt) mit Magnetrührwerk und von dort aus über eine Pumpe auf die Säule. Die aktuelle Konzentration in der Mischflasche und den Fraktionen läßt sich berechnen.

### b) Einzelanalysen

Nucleotide wurden durch ihre Extinktion bei 260 und – falls notwendig – bei 275  $\text{m}\mu$  (gegen Wasser) bestimmt. Anorganisch bzw. organisch gebundenes Phosphat, Ribose und Hexose wurden wie beschrieben analysiert<sup>1</sup>). Bei enger Aufeinanderfolge oder beim Zusammenfallen zweier Verbindungen im Chromatogramm, wurden zur weiteren Charakterisierung die Methoden des optischen Testes benutzt<sup>18</sup>).

Äthanolaminphosphat und 6-Phosphogluconsäure wurden papierchromatographisch<sup>19</sup>) durch Vergleich der  $R_f$ -Werte mit denen authentischer Präparate ermittelt; an den Äthanolaminphosphat enthaltenden Fraktionen wurde außerdem eine Stickstoffbestimmung durchgeführt<sup>20</sup>).

Zur Charakterisierung des als Kreatinphosphat bezeichneten Gipfels wurde das „gesamte“ mit dem als „anorganisch“ bestimmten Phosphat verglichen. Entsprechend der durch Molybdatkatalysierten Hydrolyse des Kreatinphosphats betrug das Verhältnis beider Analysen stets 1:1 (maximale Abweichung: 4%). Außerdem wurde das Kreatinphosphat nach der von Furchtgott und Gubareff<sup>21</sup>) zu diesem Zweck angegebenen Modifikation der Phosphatbestimmung nach Fiske und Subbarow<sup>22</sup>) ermittelt. Der Kreatin-Anteil wurde nach Rosenberg und Mitarb.<sup>23</sup>) bestimmt; das Verhältnis zwischen dieser und der Phosphatbestimmung betrug 1:1 (maximale Abweichung: 3%).

Die routinemäßig durchgeführten Analysen an mehreren hundert Einzelfraktionen auf Extinktion und Phosphat-Gehalt konnten nur durch weitgehende Automatisierung bewerkstelligt werden. Daher benutzten wir ausschließlich automatische Pipetten, die entweder im Handel<sup>24</sup>) erhältlich sind, oder in diesem Institut von Herrn Dr. Schnitger konstruiert und hergestellt worden waren. Die für die Bestimmung des Gesamtphosphats notwendige Verschaltung des Untersuchungsgutes wurde durch die Konstruktion eines Thermostaten (Dr. Schnitger) mit den für diese Analyse nach Lowry und Mitarb.<sup>25</sup>) erforderlichen Temperaturen von 98 °C (Abdampfen des in den Proben enthaltenen Wassers), 180 °C (Veraschung) und 38 °C (Inkubation des Versuchsgutes mit Molybdat und Ascorbinsäure) erleichtert. Verschaltung und Entwicklung des Molybdänblau-Komplexes geschahen im selben Reagenzglas (Pyrex 16 mm × 90 mm); im Thermostaten konnten gleichzeitig 100 Proben inkubiert werden.

Die Extinktionsmessungen an den Fraktionen wurden durch die Verwendung einer Pumpe (Transferator)<sup>26</sup>) welche die Küvette füllte und wieder entleerte, wesentlich beschleunigt.

Eingegangen am 15. April 1959 [A 960]

- <sup>18</sup>) O. Warburg, *Enzymforschg.* 7, 210 [1938].
- <sup>19</sup>) E. Gerlach u. E. Weber, *Arch. exper. Path. u. Pharm.* 226, 9 [1955].
- <sup>20</sup>) Für die papierchromatographischen Analysen und die Bestimmungen des Stickstoffs danken wir Herrn Dr. H. Schimassek.
- <sup>21</sup>) R. F. Furchtgott u. T. de Gubareff, *J. biol. Chemistry* 223, 377 [1956].
- <sup>22</sup>) C. H. Fiske u. Y. Subbarow, ebenda 66, 375 [1925].
- <sup>23</sup>) H. Rosenberg, A. H. Ennor u. J. F. Morrison, *Biochem. J.* 63, 153 [1956].
- <sup>24</sup>) B. Braun, *Melsungen*.
- <sup>25</sup>) O. H. Lowry, N. R. Roberts, K. Y. Leiner, M. L. Wu u. A. L. Farr, ebenda 207, 1 [1954].
- <sup>26</sup>) Gilson, *Medical Electronics*, Madison, Wisc., USA.