

Note

Verbesserung einer Routinemethode zur quantitativen Bestimmung von Adenosintriphosphat und seinen Abbauprodukten im Muskel post mortem

KARL POTTHAST

Institut für Chemie und Physik der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach (B.R.D.)

(Eingegangen am 21. März 1973; geänderte Fassung eingegangen am 23. August 1973)

ATP und seine Abbauprodukte ADP, AMP, IMP*, Inosin und Hypoxanthin lassen sich mit alkoholisch-ammoniakalischen Fliessmitteln auf Kieselgel HF₂₅₄-Schichten durch eindimensionale Dünnschichtchromatographie trennen und auf Grund der im optischen Test auftretenden Fluoreszenzlösung mit einem für die Auswertung von Dünnschichtplatten geeignetem Fluorimeter (Anregung 270 nm, Emission 520 nm) quantitativ auswerten¹.

Als Alternative zur fluorimetrischen Auswertung bietet sich die in Remission gemessene UV-Absorption an, die in zunehmendem Massen bei der quantitativen Bestimmung dünnschichtchromatographischer Trennungen angewendet wird. Diese Art der Absorptionsmessung empfiehlt sich deswegen, weil die aufgetrennten Substanzen wegen der Undurchlässigkeit der üblichen Trägerplatten im ultravioletten Spektralbereich im durchfallenden Licht nicht bestimmt werden können.

Jork² hat vergleichende Untersuchungen über Absorptionsmessungen in Remission und Transmission durchgeführt. Auf Grund dieser Ergebnisse sind Absorptionsmessungen in Remission wegen der geringeren Lichtstreuung in nicht-transparenten Proben weniger störanfällig und daher für die quantitative Analyse von grösserem Wert. Diese Ergebnisse decken sich mit unseren Erfahrungen. Die von uns mit einem Zeiss-Chromatogramm-Spektralphotometer (Zeiss, Oberkochen, B.R.D.) durchgeföhrten Untersuchungen ergaben ein hohes Mass an Reproduzierbarkeit. Die geringere Störanfälligkeit erwies sich besonders bei digitaler Auswertung von Vorteil. Es zeigte sich jedoch, dass die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sehr stark von den im folgenden zu besprechenden Voraussetzungen abhängt.

MATERIAL UND METHODE

Die Trennung von ATP und seinen Abbauprodukten wird auf 0.3 mm dicken Trägerschichten aus Kieselgel HF₂₅₄ nach Stahl durchgeführt. Als Fliessmittel dient ein Gemisch aus Äthylenglykol-Monoäthyläther-Isoamylalkohol-Oktylalkohol-NH₃-Wasser (70:30:10:45:30)**. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgt

* Erklärung der Abkürzungen: ATP= Adenosintriphosphat; ADP= Adenosindiphosphat; AMP= Adenosinmonophosphat; IMP= Inosinmonophosphat.

** Alle Substanzen wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, B.R.D., bezogen.

aufsteigend über eine Laufstrecke von 17 cm bei Kammersättigung. Nach Beendigung der Chromatographie wird das Chromatogramm während 10 min im Trockenschrank bei 105° getrocknet und anschliessend bis zur Abkühlung auf Raumtemperatur im Exsiccator aufbewahrt. Durch eine Nachentwicklung mit Diäthyläther wird eine die quantitative Auswertung des Hypoxanthins störende blaue Fluoreszenz in die Fliessmittelfront verschoben, ohne dass die R_f -Werte von ATP, ADP, IMP, AMP, Inosin und Hypoxanthin beeinflusst werden.

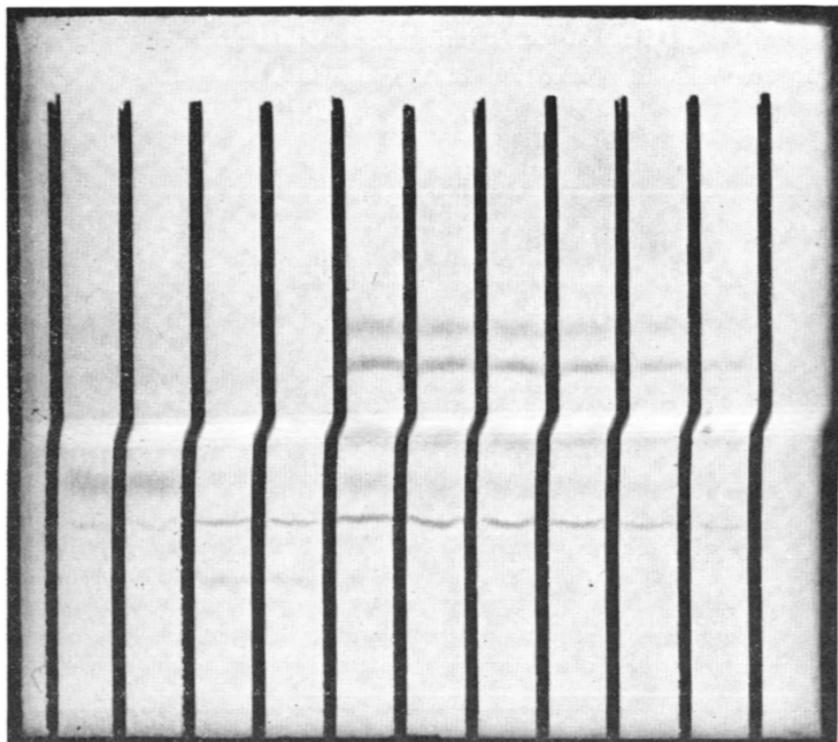


Fig. 1. Chromatographische Trennung eines Modellgemisches mit steigender mittlerer Konzentration von ca. 0.2-2 μ mol (Streifen 1-6), eines Extraktes schlachtfrischer (Streifen 7 und 8) und abgehängter Rindermuskulatur (Streifen 9 und 10). Von unten nach oben: ATP, ADP, IMP, AMP, Inosin und Hypoxanthin.

Die sauber getrennten Zonen lassen sich mit Hilfe des Dünnschichtscanners quantitativ auswerten (Fig. 1). Die von den Substanzen verursachte Fluoreszenz-löschung oder UV-Absorption ist konzentrationsabhängig. Sie wird von einem Schreiber als logarithmische Ortskurve registriert, kann aber auch durch einen Integrator mit logarithmischer Funktion digital ausgewertet werden. Zur qualitativen Beurteilung eignen sich UV-Lampen mit kurzwelligem Licht.

Ausser den von Hand beschichteten Platten wurden Fertigplatten der Firmen Merck (I), Macherey-Nagel u. Co. (II) und Woelm (III) getestet. Die DC-Platten (I) und (II) konnten ohne Änderung der Arbeitsvorschrift, die DC-Platten (III) nach Korrektur des Fliessmittel-Gemisches auf ein Verhältnis von 30:10:70:30:30 verwendet werden.

Um gut reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde die Methode nach folgenden Gesichtspunkten standardisiert:

Herstellung der Dünnschichtplatten

27 g Kieselgel HF₂₅₄ werden mit 60 ml Wasser und 4 ml Methanol 10 min lang sorgfältig im Mörser verrührt. Diese Zeit ist erforderlich, um ein möglichst homogenes Trägermaterial zu erzielen.

Zur Aufbereitung des Kieselgels sind Homogenisatoren, die eine Zerkleinerung der Kieselgelpartikel verursachen ungeeignet, da sich, bedingt durch die feinere Körnung, Verzögerungen in den Entwicklungszeiten der Chromatogramme und Änderungen der R_f -Werte einstellen. Diese Nachteile sind nach Stahl³ auf eine Erhöhung der inneren Reibungskräfte des Fließmittels in dem feineren Kapillarsystem zurückzuführen.

Für die Herstellung unserer Dünnschichtplatten verwendeten wir das "Unoplan-Beschichtungsgerät Typ P" der Firma Shandon (Shandon Scientific Co., London, Great Britain). Der Vorteil dieses Gerätes beruht darauf, dass die Oberfläche der Trägerplatten durch pneumatisches Anpressen gegen die Unterkante seitlicher Anschlagleisten gleichmäßig ausgerichtet wird; andererseits hat das Streichgerät den Nachteil, dass es beim Ziehen über die Platten leicht verkantet und so Unebenheiten in der Trägerschicht zurücklässt. Die Beseitigung dieses Umstandes gelang uns durch Konstruktion einer 15 cm langen Gleitschiene, mit der sich das in eine Aussparung eingesetzte Streichgerät gleichmäßig über die Glasplatten ziehen lässt. Diese Verbesserung erleichtert die Herstellung von Dünnschichtplatten gleichbleibender und sehr guter Qualität.

Vergleichende Untersuchungen mit Trägerschichten von 0.25 und 0.30 mm Stärke ließen Vorteile der dickeren Schicht erkennen: die Zonen waren kompakter, die Trennungen schärfer. Weiter zeigte sich, dass es unvorteilhaft ist, die Dünnschichtplatten durch Trocknung bei höheren Temperaturen zu aktivieren. Dünnschichtplatten, die über Nacht bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet wurden, wiesen die besten Trenneigenschaften auf.

Auftragen der Extrakte

Zum strichförmigen Auftragen geringer Analysenmengen kombinierten wir den Camag "Autoliner" (Camag, Muttenz, Schweiz) mit dem Desaga "Mikrodoser" (Desaga, Heidelberg, B.R.D.), einem Gerät, dessen wesentliche Vorteile auf einer gut reproduzierbaren Volumenmessung im Mikroliterbereich und einer besonderen Handlichkeit beruhen. Dieser Mikrodoser, der aus einer Halterung für eine Hamiltonspritze und einem batteriegetriebenen Synchronmotor besteht, wird an Stelle der für den "Autoliner" vorgesehenen Sprühpistole mit Hilfe eines durchbohrten Metallblocks über dem mobilen Plattentisch befestigt. Um die Gefahr einer Verschiebung des Mikrodosers über der Dünnschichtplatte und damit eine Beschädigung der Trägerschicht zu verringern, erfolgt die Bedienung des Gerätes über einen vorgesehenen Außenanschluss.

Quantitative Auswertung

In unserer früheren Veröffentlichung¹ haben wir ausgeführt, dass die quantitative Auswertung der Dünnschichtplatten durch die Aufteilung der Trägerschicht

in Streifen gleicher Breite den Arbeitsprozess wesentlich erleichtert. Sofern es möglich ist, die Breite der Streifen der Höhe des Messstrahles anzugeleichen, kann die Empfindlichkeit der quantitativen Bestimmung verbessert werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass in sehr schmalen Streifen entwickelte Chromatogramme durch starke Randeffekte nachteilig beeinflusst werden. Bei weniger als 9 mm Breite sind diese Störungen so gross, dass die quantitative Messung zu fehlerhaft wird.

Weiter ist darauf zu achten, dass die Streifen ausreichend weit voneinander getrennt sind, weil sonst die Vertiefung zwischen den Streifen auf Grund kapillareraktiver Kräfte das Fliessmittel wesentlich rascher leiten. Bei unseren Untersuchungen wurden die Dünnschichtplatten in 13 mm breite Streifen im Abstand von 3 mm eingeteilt. Da bei dieser Breite kaum Randstörungen auftraten, konnte der Messstrahl auf 12 mm Höhe ausgedehnt werden.

Bei der optischen Auswertung der Dünnschichtchromatogramme erwies sich die in Remission gemessene UV-Absorption als wertvolle Alternative zu der früher empfohlenen fluorimetrischen Methode. Der Vorteil der UV-Absorptionsmessung liegt in der Möglichkeit, die Konzentrationsbestimmung in den Absorptionsmaxima durchzuführen. Dies führt zumeist zu einer Erhöhung der Genauigkeit, da Stoffe mit anderen Absorptionsmaxima weniger stören. Gleichzeitig lassen sich durch Vergleich der bei verschiedenen Wellenlängen aufgenommenen Spektren qualitative Aussagen über die getrennten Substanzen machen, so dass die Richtigkeit der Analyse nicht allein durch die R_f -Werte bewiesen wird. Bei Routineuntersuchungen kann die Auswertung der Adenin- (Maximum bei 259 nm) und Hypoxanthinderivate (Maximum bei 249 nm) bei 254 nm durchgeführt werden. Bei dieser Wellenlänge ermittelte Eichkurven zeigten einen ähnlichen Verlauf wie bei der Fluoreszenzlösung¹. Für alle Nucleotide ergaben sich in den Bereichen von 0 bis etwa 2 μ g und von 3 bis 10 μ g lineare Konzentrationsverhältnisse.

Die Bestimmung von NADH und NADPH wird bei 340 nm durchgeführt. Zur Kontrolle der quantitativen Aussage erwies sich das Auftragen eines inneren Standards von Vorteil. Da Adenin und Hypoxanthin sehr sauber voneinander getrennt werden, wurde zur Bestätigung der quantitativen Ergebnisse eine definierte Menge Adenin mitbestimmt. Wir fanden 0.5 μ g Adenin als eine für diesen Zweck optimale Menge.

Die quantitative Bestimmung wurde durch die oben erwähnte digitale Auswertung — wir verwendeten den Integrator 'CRS 100 A' (Infotronics, Houston, Texas, U.S.A.) — wesentlich erleichtert. Sowohl für UV-Absorptionsmessungen als auch für Messungen der Fluoreszenzlösung sind Integratoren mit logarithmischer Funktion erforderlich. Der Integrator muss während der Integration unmittelbar an den Verstärker des optischen Instruments angeschaltet werden, damit Rückkoppelungseffekte des zur Dokumentation mitlaufenden Schreibers die Messergebnisse nicht verfälschen.

ERGEBNISSE

Trägerschichten mit gleichmässiger Fluoreszenz zeigen keine Störungen im UV-Test. Infolgedessen lassen sich auch geringe Substanzmengen mit der erforderlichen Genauigkeit bestimmen. In Tabelle I sind vier Messreihen eines Extraktes von

schlachtfrischem Muskelfleisch, der in vier Streifen eines Chromatogrammes getrennt wurde, dargestellt.

TABELLE I

MESSWERTE EINES IN GLEICHEN MENGEN AUF VIER STREIFEN EINES CHROMATOGRAMMES AUFGETRAGENEN EXTRAKTES VON SCHLACHTFRISCHEM MUSKELFLEISCH ERMITTELT DURCH INTEGRATION DER UV-ABSORPTION

	<i>Integrationseinheiten</i>					$10^{-3} \mu M$
	x_1	x_2	x_3	x_4	\bar{x}	
ATP	21 023	21 491	21 107	21 373	21 248 \pm 243	5.03 \pm 0.15
ADP	8 321	8 568	8 666	8 534	8 522 \pm 172	3.18 \pm 0.20
IMP	6 915	7 148	6 873	7 266	7 050 \pm 196	2.36 \pm 0.15
AMP	3 174	3 429	3 222	3 416	3 310 \pm 127	0.82 \pm 0.06
Inosin	3 581	3 872	3 519	3 947	3 729 \pm 214	1.10 \pm 0.11
Hypoxanthin	914	1 080	898	992	971 \pm 91	0.30 \pm 0.03

Die Ergebnisse zeigen recht deutlich, dass auch extrem niedrige Mengen im Konzentrationsbereich von $10^{-10} M$ zufriedenstellend erfasst werden können.

Ausser der guten Reproduzierbarkeit besitzt die Methode die Eigenschaft, kaum störanfällig zu sein. Perchlorsäure-Extrakte können ohne weitere Behandlung chromatographisch getrennt werden. Eine Abscheidung des Perchlorats durch KOH muss allerdings zur besseren Stabilisierung der Extrakte empfohlen werden. Auch die Anwesenheit von Äthylenglykol-bis-oxy-äthylennitrilo-tetraessigsäure und Äthylen-diamin-tetraessigsäure, die beim Studium von Muskel-Adenosintriphosphatasen als Komplexbildner verwendet werden, stört nicht. Dies ist deswegen besonders wichtig, weil bei der enzymatischen ATP-Bestimmung das Vorhandensein dieser Reagentien die Ergebnisse beeinflusst.

LITERATUR

- 1 K. Potthast und R. Hamm, *J. Chromatogr.*, 42 (1969) 558.
- 2 H. Jork, *Z. Anal. Chem.*, 221 (1966) 17.
- 3 E. Stahl, *Z. Anal. Chem.*, 236 (1968) 294.