

CHROM. 4105

## Eine Routinemethode zur quantitativen Bestimmung von ATP und seinen Abbauprodukten im Muskel *post mortem*\*

Für das Studium postmortaler Vorgänge im Muskel sind die Adenin- und Inosin-Nucleotide sowie Inosin und Hypoxanthin von besonderer Bedeutung. Während sich nur ATP, ADP und AMP enzymatisch bestimmen lassen, müssen die Inosin-Nucleotide, Inosin und Hypoxanthin durch andere Methoden ermittelt werden. Neben der Säulenchromatographie werden vor allem papier- und dünn-schichtchromatographische Methoden angewendet.

Säulenchromatographische Verfahren<sup>1-4</sup> haben den Nachteil, dass sie sehr zeitraubend und daher für Routineuntersuchungen wenig geeignet sind. Die Elektrophorese von Nucleotiden<sup>5,6</sup> setzt eine Entsalzung der Extrakte voraus, da höhere Konzentrationen an Fremdionen die Trennung erheblich stören. Eine Vorentsatzung ohne Substanzverluste ist nur schwer durchführbar. Aus diesem Grunde kommt die Elektrophorese zur quantitativen Bestimmung von Nucleotiden, Inosin und Hypoxanthin kaum in Frage. Ebenso wie die Säulenchromatographie erfordern auch papierchromatographische Verfahren<sup>1,7,8</sup> einen erheblichen Zeitaufwand. Sie sind dünn-schichtchromatographischen Untersuchungsmethoden<sup>9-11</sup> auch hinsichtlich der Empfindlichkeit unterlegen. Dünn-schichtchromatographischen Untersuchungsmethoden ist daher der Vorzug zu geben. Zur quantitativen Dünn-schichtchromatographie empfiehlt PATAKI<sup>12,13</sup> die direkte fluorimetrische und remissions-spektroskopische Auswertung der Dünn-schichtchromatogramme. Die bei diesem Verfahren angewandte zweidimensionale Dünn-schichtchromatographie ist jedoch für Serienuntersuchungen wenig geeignet, da jeweils nur eine Probe analysiert werden kann.

Unser Bestreben war es, ein Verfahren zu entwickeln, das (1) die Bestimmung sämtlicher Abbauprodukte des ATP durch eindimensionale Dünn-schichtchromatographie und (2) die Möglichkeit zur direkten quantitativen Auswertung auf der Platte gestattete. Beide Forderungen werden von keinem der bekannten Verfahren erfüllt.

Wir prüften daher verschiedene Trägersubstanzen und Fließmittel auf ihre Eignung für die Dünn-schichtchromatographie von ATP und seinen Abbauprodukten. Einem Hinweis von STAHL<sup>14</sup> folgend, dass die Nachweisbarkeit von fluoreszierenden Stoffen durch fluoreszenzverstärkende Stoffe erhöht wird, versuchten wir eine dünn-schichtchromatographische Trennung auf Kieselgel HF<sup>\*\*</sup>-Platten. Nach geeigneter Variation alkoholisch-ammoniakalisch-wässriger Fließmittel erhielten wir eine saubere, quantitativ auswertbare Trennung von ITP/ATP/IDP/ADP/IMP/AMP/Inosin und Hypoxanthin<sup>\*\*\*</sup> in der angegebenen Reihenfolge.

### Methodik

**Substanzen.** Als Trägermaterial wurde Kieselgel HF<sub>254</sub> nach STAHL der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet. Äthylenglykol-mono-äthyläther (GMÄÄ), Äthylen-

\* Diese Arbeit wurde durch Mittel des Verbandes der Deutschen Fleischwaren und Feinkost-industrie e.V. unterstützt.

\*\* F = Fluoreszenzstoff.

\*\*\* ITP und IDP wurden mit einbezogen, obwohl sie im Skelettmuskel nicht in nennenswerten Mengen vorkommen.

glykol-mono-butyläther (GMBÄ) und Dioxan wurden ebenfalls von der Fa. Merck bezogen. Der Fa. Zellstoff-Fabrik Waldhof, Mannheim, danken wir für die freundliche Überlassung der Nucleotide, des Inosins und des Hypoxanthins.

*Geräte.* Die Trennung wurde durch aufsteigende Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Für die quantitative Auswertung der Chromatogramme wurde ein mit dem Aminco Bowman Spektrophotofluorimeter kombiniertes Auswertgerät für Dünnschichtplatten<sup>15,16</sup> verwendet. Das Spektrophotofluorimeter war mit einer Xenon-Lampe und einer Photozelle IP-28 ausgestattet: Als Spaltprogramm wurde gewählt: (a) auf der Seite des Anregungsmonochromators: 5 mm, 0.5 mm, 0.5 mm und (b) auf der Seite des Emissionsmonochromators: 5 mm, 5 mm. Die Fluoreszenzintensität wurde über einen "Meter Multiplier" (Einstellung 0.3) mit einem logarithmischen Schreiber registriert. Die Feineinstellung erfolgte über einen Empfindlichkeitsregler.

*Herstellung der Platten.* 27 g Kieselgel HF nach STAHL werden mit 60 ml H<sub>2</sub>O und 4 ml Methanol sorgfältig in einem Mörser verrührt. Der Zusatz von Methanol bewirkt eine Herabsetzung der Oberflächenspannung des Wassers und damit eine bessere Homogenisierbarkeit des Materials. Die Menge reicht aus für fünf Dünnschichtplatten von der Grösse 20 × 20 cm bei einer Schichtdicke von 0.25 mm. Die Platten werden während 1 Std. an der Luft vorgetrocknet und 2 Std. lang bei 105° im Trockenschrank aktiviert.

*Fliessmittel.* Als Fliessmittel wird ein Gemisch aus GMÄÄ-GMBÄ-Dioxan-NH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O (15:50:70:35:80) verwendet. Mit diesem Fliessmittel lassen sich ATP und seine Abbauprodukte (ADP, AMP, IMP, Inosin und Hypoxanthin) trennen. Auch NADP und NAD werden von den übrigen Nucleotiden getrennt.

Bei der Untersuchung von Muskelextrakten treten bisweilen Störungen auf, die sich durch Zugabe von 20 Teilen Diäthyläther zum Fliessmittel beseitigen lassen. Die Empfindlichkeit des Nachweises für Inosin und Hypoxanthin lässt sich verbessern, wenn man den NH<sub>3</sub>/Wasser-Anteil um die Hälfte verringert. Unter diesen Bedingungen werden die Nucleotide jedoch kaum getrennt. Sehr gute Trennungen werden auch mit einem Gemisch aus Isobutylalkohol-Oktylalkohol-GMÄÄ-NH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O im Verhältnis 30:10:70:15:55 erzielt.

*Durchführung der chromatographischen Trennung.* Die Dünnschichtplatten werden mit einer Schablone in gleich breite Streifen von 0.9 cm eingeteilt. Im Abstand von etwa 2 cm vom unteren Plattenrand wird die Lösung der Nucleotide möglichst gleichmässig über die Streifen verteilt aufgetragen. Mit Hilfe eines Föns werden die Auftragstellen im warmen Luftstrom angetrocknet. Anschliessend wird die Platte in die mit dem Fliessmittel-Dampf gesättigte Kammer gestellt. Die Laufzeit für eine Strecke von 17 cm, bei der die Nucleotide ausreichend getrennt werden, beträgt 2.5 Std. Nach Herausnahme aus dem Fliessmittel wird das Chromatogramm während 20 Min. bei 105° getrocknet.

*Qualitative und quantitative Auswertung des Chromatogramms.* Zur Identifizierung der Nucleotide wird das Chromatogramm unter einer kurzwelligen U.V.-Lampe betrachtet. Mengen von etwa 0.3 µg Nucleotid können mit dem Auge noch deutlich erkannt werden. Aufgrund des optischen Eindrucks können bei einiger Übung bereits halbquantitative Aussagen gemacht werden.

Die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgt durch direkte Messung der Fluoreszenz in Transmission, während PATAKI<sup>12,13</sup> die Remissionsanordnung anwendet. Die Eigenfluoreszenz des in der Kieselgel HF-Schicht verarbeiteten Fluor-

eszenzstoffes wird im kurzwelligen U.V.-Bereich bei einer Wellenlänge von 270 nm angeregt. Das Emissionsmaximum liegt bei 520 nm. Dort, wo im Chromatogramm die Nucleotide erscheinen, tritt eine Fluoreszenzlöschung auf, die proportional der Konzentration ist (s. Fig. 1).

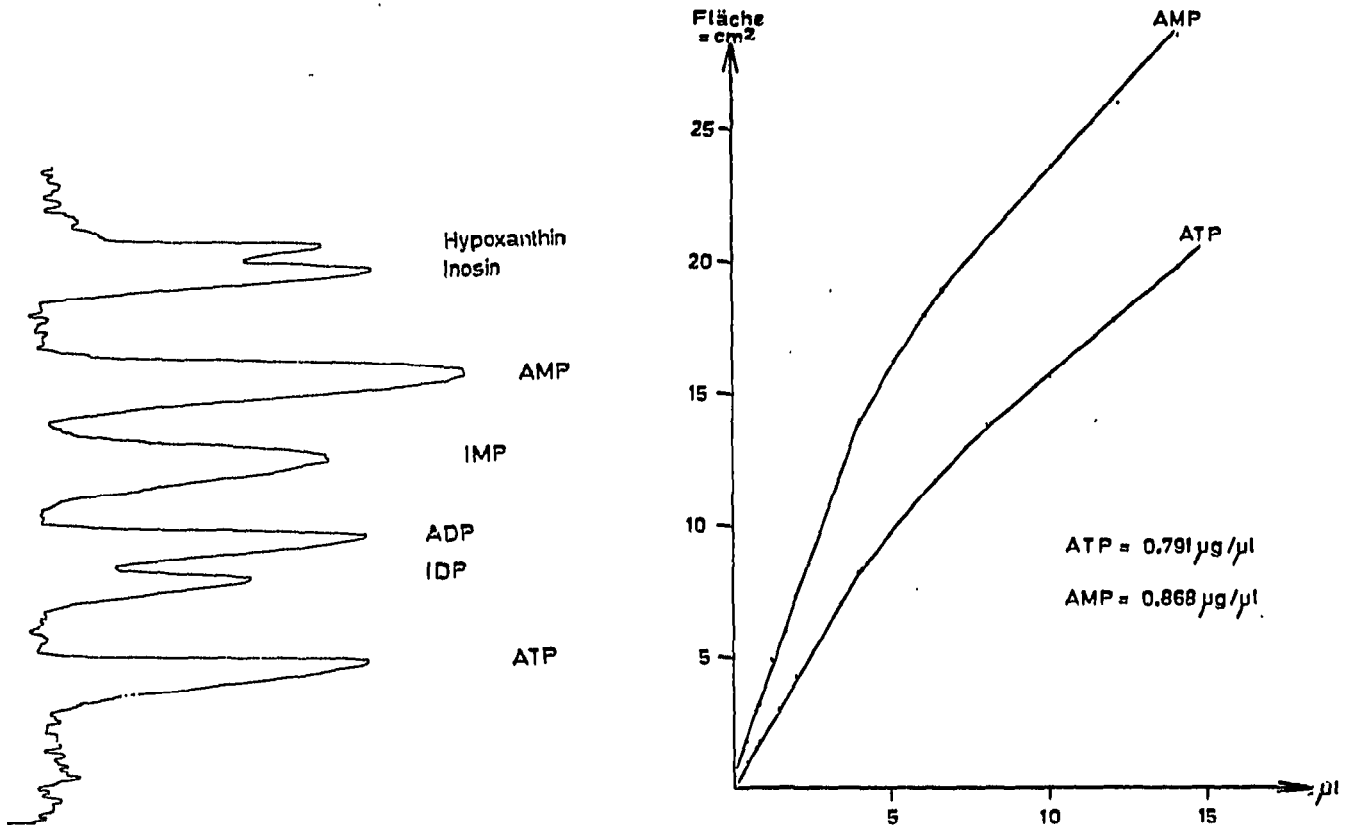


Fig. 1. Originaldiagramm der logarithmischen Aufzeichnung einer Trennung von ATP, IDP, ADP, IMP, Inosin und Hypoxanthin. Die Konzentration ist proportional der von den Kurven umschriebenen Flächen.

Fig. 2. Eichkurven für ATP und AMP. Beide Kurven weisen zwei lineare Bereiche auf (siehe Text).

Zur Ausführung der Messung wird die Dünnschichtplatte mit der beschichteten Seite nach unten in Richtung des anregenden Lichtstrahles auf den Transporttisch des Dünnschichtchromatographie-Prüfgerätes gelegt. Nachdem ein Blindwert mit einer maximalen Fluoreszenzintensität von 100 % eingestellt ist, wird der Transporttisch mittels eines Synchronmotors so über den feststehenden Lichtstrahl bewegt, dass das Licht durch das Zentrum der auf der Dünnschichtplatte vorgezeichneten Streifen geht.

NADH und NADPH können—unabhängig von der Fluoreszenzlöschung im kurzwelligen U.V.-Bereich—im langwelligen U.V.-Licht aufgrund der starken Eigenfluoreszenz dieser Stoffe bestimmt werden. Bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge 366 nm wird ein Emissionsmaximum bei 470 nm gemessen. Da die quantitativen Veränderungen durch Emissionszunahme bestimmt werden, wird der Nullwert am Verstärker auf 10 % eingestellt. Auf diese Weise ist nur die Bestimmung der reduzierten Formen NADH und NADPH möglich.

*Ergebnisse und Diskussion*

Lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzlöschung von der aufgetragenen Substanzmenge ergab sich für die folgenden Stoffe in den Bereichen:

ATP	0.1 $\mu\text{g}$ -5 $\mu\text{g}$	und	6.5 $\mu\text{g}$ -14 $\mu\text{g}$
IDP	0.1 $\mu\text{g}$ -4 $\mu\text{g}$	und	5 $\mu\text{g}$ -12 $\mu\text{g}$
ADP	0.1 $\mu\text{g}$ -2.5 $\mu\text{g}$	und	5 $\mu\text{g}$ -14 $\mu\text{g}$
IMP	0.1 $\mu\text{g}$ -4 $\mu\text{g}$	und	5 $\mu\text{g}$ -12 $\mu\text{g}$
AMP	0.1 $\mu\text{g}$ -4 $\mu\text{g}$	und	6 $\mu\text{g}$ -13 $\mu\text{g}$
Inosin	0.1 $\mu\text{g}$ -1.5 $\mu\text{g}$	und	2.4 $\mu\text{g}$ - 6 $\mu\text{g}$
Hypoxanthin	0.1 $\mu\text{g}$ -1 $\mu\text{g}$	und	1.5 $\mu\text{g}$ - 3 $\mu\text{g}$

Die Ergebnisse sind gut reproduzierbar. Bei routinemässigen Untersuchungen von Muskelextrakten können daher für Konzentrationsberechnungen Eichkurven verwendet werden (s. Fig. 2). Bei Aufstellung der Eichkurven wurde der Mittelwert von vier Konzentrationsbestimmungen verwendet. Die Schwankungen der Messergebnisse beliefen sich für Mengen von 0.1  $\mu\text{g}$  bis 1  $\mu\text{g}$  auf 10 %, für Mengen um 5  $\mu\text{g}$  auf weniger als 5 %.

Für die Untersuchung von Muskelgewebe wurden Perchlorsäureextrakte des Gewebes nach Neutralisation mit KOH und Abtrennung des  $\text{KClO}_4$ -Niederschlages durch Zentrifugation (2500 U/min) ohne weitere Entsalzung aufgetragen. Der Extrakt

TABLE I

VERGLEICH ZWISCHEN DER FLUORIMETRISCHEN ATP-BESTIMMUNG AUS DEM DÜNNESCHICHTCHROMATOGRAMM UND DER ENZYMATISCHEN ATP-BESTIMMUNG AN EINEM RINDERMUSKEL-EXTRAKT ATP bezogen auf Gramm Frischgewebe.

	Probe (mg/g)		
	I	II	III
Enzymatische ATP-Bestimmung	1.72	4.77	2.39
Fluorimetrische ATP-Bestimmung	1.69	4.89	2.27

TABLE II

QUANTITATIVE DÜNNESCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG VON ATP UND SEINEN ABBAU-PRODUKTEN ZU VERSCHIEDENEN ZEITEN *post mortem* (SKELETMUSKEL DES SCHWEINS)

	Analytisch ermittelter Gehalt ( $\mu\text{g/g}$ Frischgewebe)				Umgerechnet auf ATP ( $\mu\text{g/g}$ Frischgewebe)			
	1 h	3 h	6 h	7 d	1 h	3 h	6 h	7 d
ATP	2340	761	356	—	2340	761	356	—
ADP	1082	435	290	152	1283	516	344	180
IMP	288	891	1459	1275	332	1297	2122	1857
AMP	19	376	17	41	28	549	25	60
Inosin	89	336	403	763	168	636	763	1440
Hypoxanthin	—	39	103	124	—	145	383	461
	Summe:		4151		3904	3993	3998	
	Bilanz (%):		100		93.9	95.9	96.1	

wurde durch Homogenisieren von 2 g Gewebe mit 6.5 ml Perchlorsäure im Bühler-Homogenisator, anschliessende Filtration durch eine Glasfritte G<sub>1</sub> und Neutralisation eines aliquoten Filtratanteiles bei elektrometrischer pH-Anzeige hergestellt. 0.02 ml des Extraktes wurden für die Chromatographie eingesetzt.

Die Zuverlässigkeit der Methode wurde durch Vergleich fluorimetrisch ermittelter ATP-Gehalte mit enzymatischen ATP-Bestimmungen nach der Methode von LAMPRECHT UND TRAUTSCHOLDT<sup>17</sup> in Muskelextrakten geprüft. Hierbei ergab sich eine gute Übereinstimmung; dies geht aus den in Tabelle I angeführten Ergebnissen hervor.

Ein weiterer Beweis für die Zuverlässigkeit der Methode folgt aus dem in Tabelle II angeführten Beispiel einer Untersuchung von Schweinemuskelgewebe. Wie aus Tabelle II hervorgeht, lässt sich der zeitliche Verlauf des ATP-Abbaues mit diesem Verfahren gut verfolgen. Darüber hinaus kann aus der Bilanz gefolgert werden, dass ausser ATP auch die übrigen Nucleotide, sowie Inosin und Hypoxanthin mit der erforderlichen Genauigkeit erfasst werden.

Da nach der beschriebenen Methode auf einer Dünnschichtplatte bis zu fünfzehn Muskelextrakte gleichzeitig aufgetrennt und quantitativ bestimmt werden können, erscheint das Verfahren für Serienanalysen besonders geeignet. Zweckmässigerweise sollte man jedoch statt einer Einzelbestimmung jeweils eine Doppel- oder Dreifachbestimmung durchführen, um auf diese Weise Fehler, die in der Qualität der Dünnschichtplatte liegen, zu vermeiden.

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

KARL POTTHAST  
REINER HAMM

- 1 J. R. BENDALL UND C. L. DAVEY, *Biochim. Biophys. Acta*, 26 (1957) 93.
- 2 R. P. DANNERT UND A. M. PEARSON, *J. Food Sci.*, 32 (1967) 49.
- 3 T. C. LEE UND J. LEWIS, *J. Food Sci.*, 33 (1968) 119.
- 4 H. G. LENTO, J. A. FOOD UND A. E. DENTON, *J. Food Sci.*, 29 (1964) 435.
- 5 A. SCHWEIGER UND H. GÜNTHER, *J. Chromatog.*, 19 (1965) 201.
- 6 Z. STRANSKY, *J. Chromatog.*, 10 (1963) 436.
- 7 J. DAVIDEK UND A. W. KHAN, *J. Food Sci.*, (1967) 155.
- 8 J. W. BRADBEER UND B. C. JARVIS, *J. Chromatog.*, 20 (1965) 624.
- 9 K. RANDEKATH UND E. RANDEKATH, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 111.
- 10 M. N. S. NAYAR, *Life Sci.*, 3 (1964) 1307.
- 11 B. ARREGUIN, *J. Chromatog.*, 26 (1967) 527; *ibid.*, 29 (1967) 133; *Chromatographia*, 1 (1968) 492.
- 12 G. PATAKI, *J. Chromatog.*, 29 (1967) 126.
- 13 G. PATAKI UND A. KUNZ, *J. Chromatog.*, 23 (1966) 465.
- 14 E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim, 1962, S. 461.
- 15 *Das moderne Labor*, Nr. 3, Colora Messtechnik GmbH, 7073 Lorch (Württ.), 1966.
- 16 *Instruction No. 768 G, Aminco Bowman Spektralfluorimeter*, American Instrument Co., Inc., 8030 Georgia Ave, Silver Springs, Md. 20910.
- 17 Zitiert von H. U. BERGMAYER, in *Methoden der enzymatischen Analyse*, Springer-Verlag, Berlin, 1962, S. 543.

Eingegangen am 20. März 1969

*J. Chromatog.*, 42 (1969) 558-562