

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

R. HAMM und K. POTTHAST

Institut für Chemie und Physik der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach/OfR.
Bundesrepublik Deutschland

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 dünnschichtchromatographische Methoden angewendet.

Säulenchromatographische Verfahren (1,2,3,4) haben den Nachteil, dass sie sehr zeitraubend und daher für Routineuntersuchungen wenig geeignet sind.

Die Elektrophorese von Nucleotiden (5,6) setzt eine Entsalzung der Extrakte voraus, da höhere Konzentrationen an Fremdionen die Trennung erheblich stören. Eine Vorentsalzung 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 (1,7,8) einen erheblichen Zeitaufwand. Sie sind dünnschichtchromatographischen Untersuchungsmethoden (9,10,11) auch hinsichtlich der Empfindlichkeit unterlegen. Dünnschichtchromatographischen Untersuchungsmethoden ist daher der Vorzug zu geben.

Zur quantitativen Dünnschichtchromatographie empfiehlt Pataki (12, 13) die direkte fluorimetrische Auswertung der Dünnschichtchromatogramme. Die bei diesem Verfahren angewandte zweidimensionale Dünnschichtchromatographie ist jedoch für Serienuntersuchungen wenig geeignet, da jeweils nur eine Probe analysiert werden kann.

Unser Bestreben war es, ein Verfahren zu entwickeln, das

*) F = Fluoreszenzstoff

**) ATP = Adenosintriphosphat; ADP = Adenosindiphosphat; AMP = Adenosinmonophosphat; ITP = Inosintriphosphat; IMP = Inosinmonophosphat; NAD = Nicotinamiddinucleotid.

1. die Bestimmung sämtlicher Abbauprodukte des ATP durch eindimensionale Dünnschichtchromatographie 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 Dünnschichtchromatographie von ATP und seinen Abbauprodukten. Einem Hinweis von Stahl (14) folgend, dass die Nachweisbarkeit von fluoreszierenden Stoffen durch fluoreszenzverstärkende Stoffe erhöht wird, versuchten wir eine dünnschichtchromatographische Trennung auf Kieselgel HF*)-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*) in der angegebenen Reihenfolge.

METHODIK

1. Substanzen

Als Trägermaterial wurde Kieselgel HF₂₅₄ nach Stahl der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet. Äthylenglykol-monoäthyläther (GMÄÄ), Äthylenglykolmono-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 Inosin und des Hypoxanthins.

2. 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 (15, 16) verwendet.

Das Spektrophotofluorimeter war mit einer Xenon-Lampe und einer Photozelle IP-28 ausgestattet. Als Splatprogramm wurde gewählt:

- a) auf der Seite des Anregungsmonochromators: 5 mm, 0,5 mm, 0,5 mm
- 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 H₂O 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 5 Dünnschichtplatten von der Grösse 20×20 cm bei einer Schichtdicke von 0,25 mm. Die Platten werden während 1 Stunde an der Luft vorgetrocknet und 2 Stunden lang bei 105°C im Trockenschrank aktiviert.

Fliessmittel

Als Fliessmittel wird ein Gemisch aus GMÄÄ: GMBÄ: Dioxan: NH_3 : H_2O im Verhältnis 15: 15: 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_3 /Wasser-Anteil um die Hälfte verringert. Unter diesen Bedingungen wurden die Nucleotide jedoch kaum getrennt.

Sehr gute Trennungen werden auch mit einem Gemisch aus Isobutylalkohol: Oktylalkohol: GMÄÄ: NH_3 : H_2O 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 Austragstellen 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 $2\frac{1}{2}$ Stunden. Nach Herausnahme aus dem Fliessmittel wird das Chromatogramm während 20 Minuten bei 105°C getrocknet.

Qualitative und quantitative Auswertung des Chromatogramms

Zur Identifizierung der Nucleotide wird das Chromatogramm unter einer kurzwelligen UV-Lampe betrachtet. Mengen von etwa $0,3\mu\text{g}$ Nucleotid können mit dem Auge noch deutlich erkannt werden. Aufgrund des optischenindrucks können bei einiger Übung bereits halbquantitative Aussagen gemacht werden.

Die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgt durch direkte Messung der Fluoreszenz. Die Eigenfluoreszenz des in der Kieselgel-HF-Schicht verarbeiteten Fluoreszenzstoffes wird im kurzwelligen UV-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. Abb. 1).

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 das Zentrum der auf der Dünnschichtplatte vorgezeichneten Streifen geht.

NADH und NADPH können — unabhängig von der Fluoreszenzlöschung im kurzwelligen UV-Bereich — im langwelligen UV-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 μ g — 5 μ g und 6,5 μ g — 14 μ g
IDP	0,1 μ g — 4 μ g und 5 μ g — 12 μ g
ADP	0,1 μ g — 2,5 μ g und 5 μ g — 14 μ g
IMP	0,1 μ g — 4 μ g und 5 μ g — 12 μ g
AMP	0,1 μ g — 4 μ g und 6 μ g — 13 μ g
Inosin	0,1 μ g — 1,5 μ g und 2,4 μ g — 6 μ g
Hypoxanthin	0,1 μ g — 1 μ g und 1,5 μ g — 3 μ g

Die Ergebnisse sind gut reproduzierbar. Bei routinemässigen Untersuchungen von Muskelextrakten können daher für Konzentrationsberechnungen Eichkurven verwendet werden.

Bei Aufstellung der Eichkurven wurde der Mittelwert von 4 Konzentrationsbestimmungen verwendet. Die Schwankungen der Messergebnisse beliefen sich für Mengen von 0,1 μ g bis 1 μ g auf 10 %, für Mengen um 5 μ g auf weniger als 5 %.

Für die Untersuchung von Muskelgewebe wurden Perchlorsäureextrakte des Gewebes nach Neutralisation mit KOH und Abtrennung des KClO_4 -Niederschlages durch Zentrifugation (2500 U/min) ohne weitere Entsalzung aufgetragen. Der Extrakt wurde durch Homogenisieren von 2 g Gewebe mit

6,5 ml Perchlorsäure im Bühler-Homogenisator, anschliessende Filtration durch eine Glasfritte G₁ 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 (16) in Muskelextrakten geprüft. Hierbei ergab sich eine gute Übereinstimmung; dies geht aus den in Tabelle 1 angeführten Ergebnissen hervor.

Tabelle 1. Vergleich zwischen der fluorimetrischen ATP-Bestimmung aus dem Dünnschichtchromatogramm und der enzymatischen ATP-Bestimmung an einem Rindermuskel-Extrakt. ATP bezogen auf g Frischgewebe

Probe	I	II	III
Enzymatische ATP-Bestimmung:	1,72 mg/g	4,77 mg/g	2,39 mg/g
Fluorimetr. ATP-Bestimmung:	1,69 mg/g	4,89 mg/g	2,27 mg/g

Ein weiterer Beweis für die Zuverlässigkeit der Methode folgt aus dem in Tabelle 2 angeführten Beispiel einer Untersuchung von Schweinemuskelgewebe.

Tabelle 2. Quantitative dünnschichtchromatographische Bestimmung von ATP und seinen Abbauprodukten zu verschiedenen Zeiten post mortem (Skelettmuskel des Schweins)

Zeit post mortem	analytisch ermittelter Gehalt (μ g/g Frischgewebe)				umgerechnet auf ATP (in μ 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 %

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

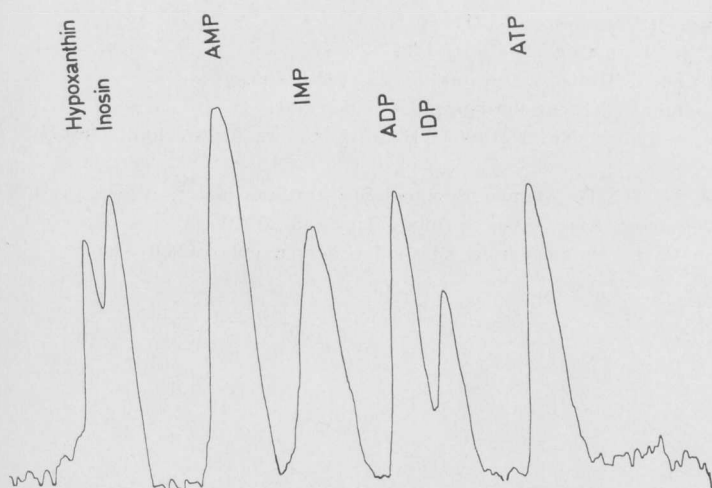


Abb. 1: Originaldiagramm der logarithmischen Aufzeichnung einer Trennung von ATP, IDP, ADP, IMP, Inosin und Hypoxanthin. Die Konzentration ist proportional der von den Kurven umschriebenen Flächen.

Wie aus Tabelle 2 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 15 Muskelextrakte gleichzeitig aufgetrennt und quantitativ bestimmt werden können, erscheint das Verfahren für Serienanalysen besonders geeignet. Zweckmässigerweise sollte man jedoch statt einer Einzel-Bestimmung jeweils eine Doppel- oder Dreifachbestimmung durchführen, um auf diese Weise Fehler, die in der Qualität der Dünnschichtplatte liegen, zu vermeiden.

LITERATUR

- 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 and A. E. Denton, *J. Food Sci.* 29 (1964) 435.
- 5) A. Schweiger und H. Günther, *J. of 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. Randerath und E. Randerath, *J. Chromatog.* 16 (1964) 111.
- 10) M. N. S. Nayar, *Life Sci.* 3 (1964) 1307.

