

CHROM. 3396

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON PORPHYRINEN, HÄMIN UND LIPOIDEN AUF KIESELGEL-H-PLATTEN ZUR BESTIMMUNG DER ERYTHROZYTENPORPHYRINE ALS METHYLESTER

MANFRED DOSS* UND UDO BODE

Hygiene-Institut der Universität Marburg, Marburg/Lahn (Deutschland)

Eingegangen den 15. Januar 1968)

SUMMARY

Thin-layer chromatographic separation of porphyrins, haemin and lipids on Silica Gel H plates and determination of the erythrocyte porphyrins as their methyl esters

The porphyrins of lyophilized erythrocytes were extracted with chloroform after transformation into their methyl esters with methanol-sulphuric acid. The components of the chloroform extract were separated by thin-layer chromatography on 2 mm thick Silica Gel H plates.

The porphyrin methyl ester could be completely separated from the protohaemin methyl ester and the lipids contained in the chloroform extract. During the esterification of porphyrins and protohaemin the fatty acids of glycerophosphatides of erythrocytes were transesterified to methyl esters. This was demonstrated by gas-chromatographic analysis.

Erythrocyte proto- and coproporphyrin methyl esters were isolated chromatographically and determined by recording spectrophotometry with their absorption maxima.

Chromatographische Verfahren, insbesondere die präparative Dünnschichtchromatographie, sind bisher zur Isolierung der Erythrozytenporphyrine wenig angewandt worden. Eine Anzahl von Arbeiten über die Trennung der Porphyrine als Methylester (ME) mit Hilfe der Säulenchromatographie an Al_2O_3 , MgO , MgCO_3 , CaCO_3 , Celite und silicic acid hat FALK¹ kritisch referiert.

In unseren Versuchen zeigte sich, dass die Trennung von Porphyrin- und Protohämin-ME auf Kieselgel-Dünnschichtplatten gut reproduzierbar ist und sich zur quantitativen Darstellung reiner Substanzen eignet². Der Vorteil gegenüber der Säulenchromatographie liegt in der einfachen und schnellen Durchführung und in der unmittelbaren Beobachtung des Trennvorganges: Fraktionierung und Kontrolle der Fraktionierung gegenüber Vergleichssubstanzen sind ein Arbeitsgang. Die Entwicklung des Chromatogramms kann mit der U.V.-Lampe (355 nm) beurteilt werden.

Die in den letzten zwanzig Jahren bekannt gewordenen spektrophotometrischen

* 355 Marburg (Lahn), Pilgrimstein 2.

Methoden für die Bestimmung der Erythrozytenporphyrine von GRINSTEIN UND WINTROBE³, SCHWARTZ UND WIKOFF⁴, WRANNE⁵ und RIMINGTON *et al.*⁶ gehen auf ein von GRINSTEIN UND WATSON⁷ beschriebenes Verfahren zurück, welches auf der von HIJMANS VAN DEN BERGH UND HIJMAN⁸ gefundenen quantitativen Extraktion des Erythrozytenprotoporphyrins mit Äthylacetat-Eisessig (3:1, v/v) basiert. Zur weiteren Fraktionierung, Anreicherung und Reinigung der Porphyrine folgen wiederholte Extraktionsschritte mit verschiedenen Salzsäurekonzentrationen und Äthylacetat³⁻⁶. Die Messung wird spektrophotometrisch nach RIMINGTON UND SVEINSSON⁹ am Absorptionsmaximum, 380 und 430 nm oder fluorometrisch vorgenommen. Zur Auswertung der spektrophotometrischen Daten dienen in der Regel Korrekturfaktoren, die WITH¹⁰ für Proto- und Coproporphyrin aufgestellt hat. Die fluorometrische Analyse erfolgt im Vergleich zu einer Standardlösung des entsprechenden Porphyrins.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung bestand vorwiegend darin, eine neue Methode zur Isolierung der Erythrozytenporphyrine mit den Möglichkeiten der präparativen Dünnschichtchromatographie zu entwickeln. Als kritische Seite der Methode für die Erythrozytenporphyrinbestimmung als ME stellte sich die erhebliche Mengendifferenz zwischen Protohäm in und Protoporphyrin heraus, da die Tetrapyrrol-ME aus gefriergetrockneten Erythrozyten mit Methanol-Schwefelsäure hergestellt wurden. Humane Erythrozyten enthalten Protoporphyrin und sehr kleine Mengen Coproporphyrin⁴. Für eine weitgehend exakte Ermittlung der Normalwerte der Erythrozytenporphyrine war es zunächst erforderlich, mit einem grösseren Ausgangsvolumen gewaschener Erythrozytensuspensionen zu arbeiten und die präparative Leistungsfähigkeit der Methodik² zu verbessern. Die Berechnung der Porphyrine erfolgte nach der Extinktion am Soret-Maximum der Porphyrin-ME und dem millimolaren Extinktionskoeffizienten¹.

MATERIAL UND METHODEN

Reagenzien

Liquemin[®] (Deutsche Hoffmann-La Roche, Grenzach, Baden), Methanol-H₂SO₄ (5 Vol. %), Chloroform, NaHCO₃, Na₂SO₄, Kieselgel H (E. Merck AG, Darmstadt), Benzol, Essigsäureäthylester (Lösungsmittel p.a.).

Spezielle Geräte

Dünnschichtchromatographische Ausrüstung von Desaga (Heidelberg); Chromatographietank 43 × 23 × 27 cm für Glasplatten 40 × 20 cm. Herstellung der Kieselgel-H-Schichtplatten mit dem Desaga Streichgerät: Schichtdicke 2 mm, Lufttrocknung über 12 Std. und Aktivierung bei 110°, 2 Std. Schichtabsaug- und Elutionsgerät nach GOLDRICK UND HIRSCH¹¹ (Glastechnische Werkstätten E. Zimmermann, Köln-Lindenthal, Physiologisch-Chemisches-Institut). U.V.-Lampe (355 nm).

Vergleichssubstanzen

Protoporphyrin IX (Fluka-AG, Buchs SG, Schweiz), Coproporphyrin-III-tetra-ME aus *Achromobacter metalcaligenes*, Uroporphyrin-III-okta-ME aus porphyrischem Urin, Protohäm in IX (Fluka-AG), Cholesterin, Tristearat (Serva, Heidelberg), Ölsäure-ME, Kephalin (Fluka-AG), Sphingomyelin (aus Gehirn). Die Erythrozyten-

lipide wurden aus gewaschenen, gefriergetrockneten Erythrozyten mit Chloroform-Methanol (2:1, v/v) bei Raumtemperatur in 12 Std. unter Stickstoffatmosphäre extrahiert. Der Gesamtextrakt wurde filtriert und eingedampft.

Durchführung

Von hämatologisch gesunden (Hämoglobin, Hämatokrit und Retikulozytenzahl im Normalbereich) Personen im Alter von 19 bis 74 Jahren wurden die Erythrozyten aus je 20 ml Venenblut, abgenommen mit 0.2 ml Liquemin® (= 500 IE Heparin), nach Entfernung des Plasmas dreimal mit ca. 50 ml 0.9 % NaCl gewaschen, abzentrifugiert, tiefgefroren und in einer Hochvakuumanlage gefriergetrocknet.

Mit 50 ml Methanol-H₂SO₄ (5 Vol. %), die dem lyophilisierten Erythrozytenrückstand zugefügt wurden, erfolgte bei Raumtemperatur in 20 Std. die vollständige Veresterung der freien Porphyrine zu ME. Das Reaktionsgemisch wurde bei 25000 × g (10 min) zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die sedimentierten Erythrozytenpartikel dreimal mit je 40 ml Chloroform-Methanol (1:1, v/v) versetzt, aufgerührt und abzentrifugiert. Den mit dem ersten Überstand vereinigten Extrakten fügte man 250 ml Aqua dest. zu, worauf sich die Chloroformphase schwarz gefärbt (Hämin-ME) absetzte. Nach fünfmaliger Extraktion der Tetrapyrrol-ME mit je 5 bis 10 ml Chloroform war die Wasserphase nahezu entfärbt. Die vereinigten Chloroformextrakte wurden mit ca. 50 ml gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung bis zum neutralen pH gewaschen, anschliessend noch zweimal gegen Aqua dest. ausgeschüttelt und über 3–5 g Na₂SO₄ 10 bis 15 min getrocknet. Nach Filtration des Chloroformextraktes in ein Spitzkölbchen verdampfte man das Lösungsmittel im Umlaufverfahren unter Vakuum (Rotationsverdampfer). Der in etwa 2 ml Chloroform wieder gelöste Rückstand wurde mit einer Saughütchenpipette streifenförmig auf die 2 mm dick beschichtete Kieselgel-H-Platte quantitativ aufgetragen. An einem Randstreifen der Platte liefen Testsubstanzen (Protoporphyrin IX, Coproporphyrin-III-ME, Uroporphyrin-III-ME, Protohämin-IX-ME) mit. Die Kieselgel-H-Platte wurde zweimal im Lösungsmittelsystem Benzol-Essigsäureäthylester-Methanol (85:13.3:1.7, v/v) bis zu einer Höhe von 13 (15) cm entwickelt, ohne dass das Chromatogramm nach dem ersten Lauf vollständig trocknete. Auf dem noch feuchten Chromatogramm markierte man mit einem Spatel im Vergleich zu den Testsubstanzen die im U.V.-Licht rotfluoreszierenden Porphyrinonen, löste sie nach Lufttrocknung des Chromatogramms (15 min) mit einem breiten Spatel von der Glasplatte ab und überführte sie in das Schichtabsaug- und Elutionsgerät¹¹. Die Porphyrin-ME wurden aus dem Kieselgel mit Chloroform unter mildem Druck eluiert, bis das Kieselgel auf der Fritte im U.V.-Licht keine Rotfluoreszenz mehr zeigte. Protoporphyrin-IX-ME wurde bei 408 nm, Coproporphyrin bei 400 nm spektrophotometrisch gemessen.

Für eine leerwertfreie spektrophotometrische Analyse empfiehlt es sich, die Platten in Chloroform-Methanol (2:1, v/v) bis an den oberen Plattenrand vorlaufen zu lassen und kurz bei 90° zu reaktivieren oder das Kieselgel H mit Chloroform-Methanol (1:1, v/v) zu waschen und fein verteilt auf Filterpapier trocknen zu lassen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Porphyrin-ME an Kieselgel H gewährleistet die sichere Differenzierung der Porphyrine nach Anzahl ihrer

Carboxylgruppen und die Isolierung chromatographisch reiner Substanzen, die gegenüber Vergleichssubstanzen chromatographisch und spektrophotometrisch an Hand der bekannten Absorptionsmaxima identifiziert werden können. Eine Isomerenanalyse von Copro- und Uroporphyrin kann mit der beschriebenen Methode nicht durchgeführt werden.

Mit säulenchromatographischen Trennverfahren¹² konnte sowohl an vorbehandelter¹³ Kieselsäure (Mallinckrodt, 100 mesh) als auch an Kieselsäure-Hyflo Super Cel-Gemischen mit den Lösungsmitteln Hexan, Petroläther, 1,2-Dichloräthan, Benzol allein oder im Gemisch mit Diäthyläther, Äthylacetat, Aceton, Methanol, Äthanol in verschiedenen Kombinationen eine quantitative Abtrennung des Protoporphyrin-ME in reiner Form von Protohämin-ME, den der Extrakt im Überschuss enthielt (Protohämin/Protoporphyrin $\approx 30000:1$)⁵, nicht erzielt werden. Das Hämin des Hämoglobins wird mit Methanol-H₂SO₄ abgespalten und ebenfalls verestert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Erythrozytenporphyrine von 59 Personen (♂ 31, ♀ 28) bestimmt, deren Hämoglobin- und Hämatokritwerte und Retikulozytenzahl im Normalbereich lagen. Das Erythrozytenprotoporphyrin betrug 5 bis 80 $\mu\text{g}/100$ ml Erythrozyten und zeigte eine log-normale Verteilung ($\log \bar{x} \pm 2s = 20.39 \pm 3.77$)¹⁴. Unter unseren Versuchsbedingungen liess sich Coproporphyrin nur in acht der 59 Proben quantitativ bestimmen (Normalbereich 0 bis 1 $\mu\text{g}/100$ ml Erythrozyten).

Die aus acht Proben isolierten Coproporphyrin-ME wurden vereinigt, rechromatographiert und gegenüber authentischen Referenzsubstanzen spektrophotometrisch analysiert. Das chromatographische Verhalten und die Absorptionsmaxima beider Substanzen stimmten überein. Zum Vergleich des quantitativen Messergebnisses wurde Coproporphyrin nach dem Extraktionsverfahren von SCHWARTZ UND WIKOFF⁴ isoliert. Der Protoporphyrinextrakt (1.5 N HCl-Extrakt und Chloroformextrakt aus einer 0.1 N HCl-Coproporphyrinphase) und der Coproporphyrinextrakt (0.1 N HCl), beide mit den verschiedenen HCl-Konzentrationen aus dem Äthylacetatextrakt gewonnen, wurden nach Neutralisation mit NaOH und NaHCO₃ im Vakuum eingeengt. Nach Gefriertrocknung der eingeengten wässrigen Lösungen wurden die im Rückstand vorhandenen Porphyrine in ME umgesetzt und chromatographisch² untersucht. Wie bereits WRANNE⁵ erkannte, wird mit diesem Verfahren eine vollständige Trennung von Porphyrinen mit 2 und 4 Carboxylgruppen nicht erzielt. Ausserdem enthalten die HCl-Extrakte Glycerophosphatide, deren Fettsäuren in Fettsäure-ME überführt und dünnschichtchromatographisch nachgewiesen wurden.

Uroporphyrin lässt sich in 10 bis 20 ml Normalblut nicht erfassen. Aus diesen Volumina in messbarer Menge nachweisbar, hat es für die erythropoetischen Porphyrinen diagnostische Bedeutung.

Der nach der Veresterung der Porphyrine in gefriergetrockneten Erythrozyten gewonnene Chloroformextrakt wurde eingehender untersucht. Er enthielt ausser Porphyrinen folgende Komponenten: Protohämin-ME im Überschuss, Cholesterin, Fettsäure-ME. In Fig. 1 ist die Auftrennung dieser Substanzen an einer 0.5 mm dick beschichteten Kieselgel-H-Platte dargestellt. Der Chloroformextrakt zur Porphyrin-ME-Chromatographie enthält keine Glycerophosphatide (Fig. 1-3), sondern nur Sphingomyelin der Erythrozyten (Fig. 3). Die Lipoidextraktion wurde hierbei nicht quantitativ geprüft. Cholesterinester und Triglyceride, die sich bei Anwendung der Methodik auf die Porphyrinbestimmung an anderen Geweben und Zellen ebenfalls

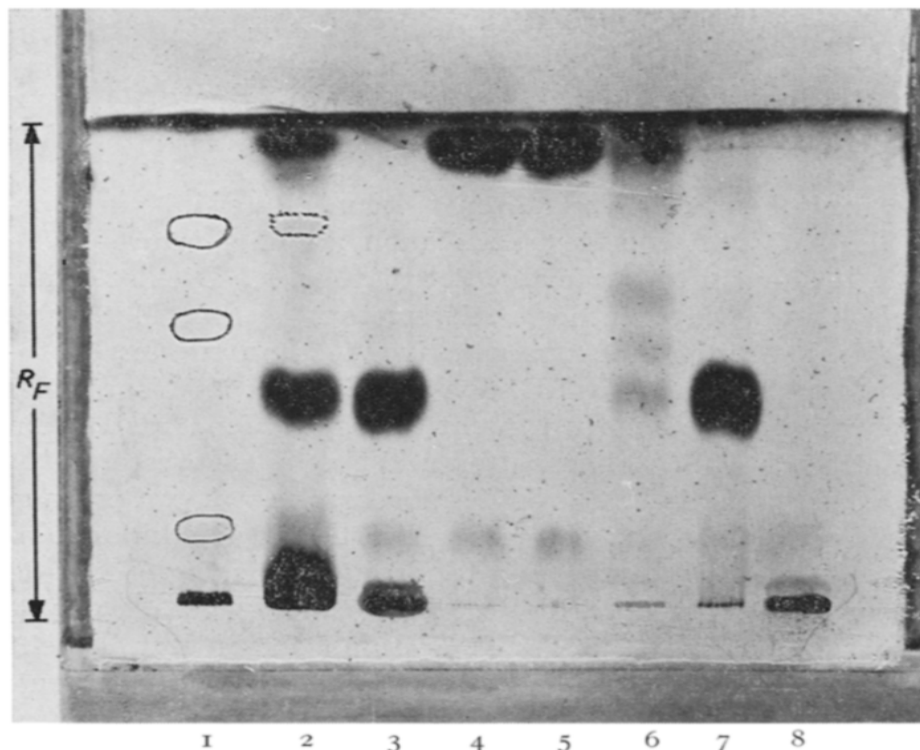


Fig. 1. Kieselgel-H-Dünnschichtchromatogramm (Schichtdicke 0,5 mm): Auftrennung der Porphyrin-Methylester (ME) und Lage der Lipide im Lösungsmittelsystem Benzol-Äthylacetat-Methanol (85:13,3:1,7, v/v). Nach Markierung der Porphyrine unter dem U.V.-Licht (355 nm) wurde die Platte mit 50 % wässriger Schwefelsäure besprüht und 15 min auf 180° erhitzt. (1) Tetrapyrrol-Testsubstanzen: am Start Protohäm-in-IX-di-ME, darüber Uroporphyrin-III-okta-ME, Coproporphyrin-III-tetra-ME, Protoporphyrin-IX-di-ME. (2) Porphyrinextrakt aus Erythrozyten: am Start Protohäm-in-ME, darüber Cholesterin, Protoporphyrin-ME, Fettsäure-ME. (3) Lipoidextrakt aus Erythrozyten: am Start Glycerophosphatide, darüber Cholesterin. (4) Isolierte Fettsäure-ME von (2). (5) Test Ölsäure-ME. (6) Triglyceride (in der Front) mit Spuren von Cholesterin und Diglyceriden (Olivenöl). (7) Test Cholesterin. (8) Test Kephalin. Auf den Bahnen 3, 4 und 5 erkennt man über dem Startpunkt geringe Mengen von freien Fettsäuren.

im Chloroformextrakt befinden, laufen in der Front. Fettsäure-ME und Cholesterin liegen auf den für präparative Arbeiten benutzten Platten mit 2 mm Schichtdicke nahe beieinander (Tabelle I). Die Chromatographie auf 2 mm dick beschichteten Platten kann gegenüber 0,5 mm dicken Platten zu einer breiteren Ausbildung der Substanzzonen führen, deren Ränder sich dann berühren. Der grosse Überschuss an Protohäm-in-ME im Chloroformextrakt machte allerdings eine Schichtdicke von 2 mm Kieselgel H erforderlich, um den Erythrozytenextrakt von 10–20 ml Blut nach streifenförmiger Auftragung auf eine 40 cm breite Platte ohne Überladungseffekt (Spuren von Protohäm-in-ME in der Front und Wanderung von Protohäm-in 5 bis 8 cm über den Startpunkt) auftrennen zu können.

Das im Lösungsmittelsystem Benzol-Äthylacetat-Methanol (85:13,5:1,5, v/v) unter der Front liegende Lipoid (Fig. 1) wurde isoliert. Es ist in einem mit Chloroform-Methanol (2:1, v/v) extrahierten Erythrozytengesamtlipoid nicht vorhanden (Fig. 2 und 3). Nach dünnschichtchromatographischen Untersuchungen (Fig. 2) handelt es sich um Fettsäure-ME, die aus den Glycerophosphatiden der gefriergetrockneten Erythrozyten durch säure-katalysierte Umesterung bei der Veresterung der Porphyrine entstanden sind. Die gaschromatographische Analyse zeigt ein Fettsäure-

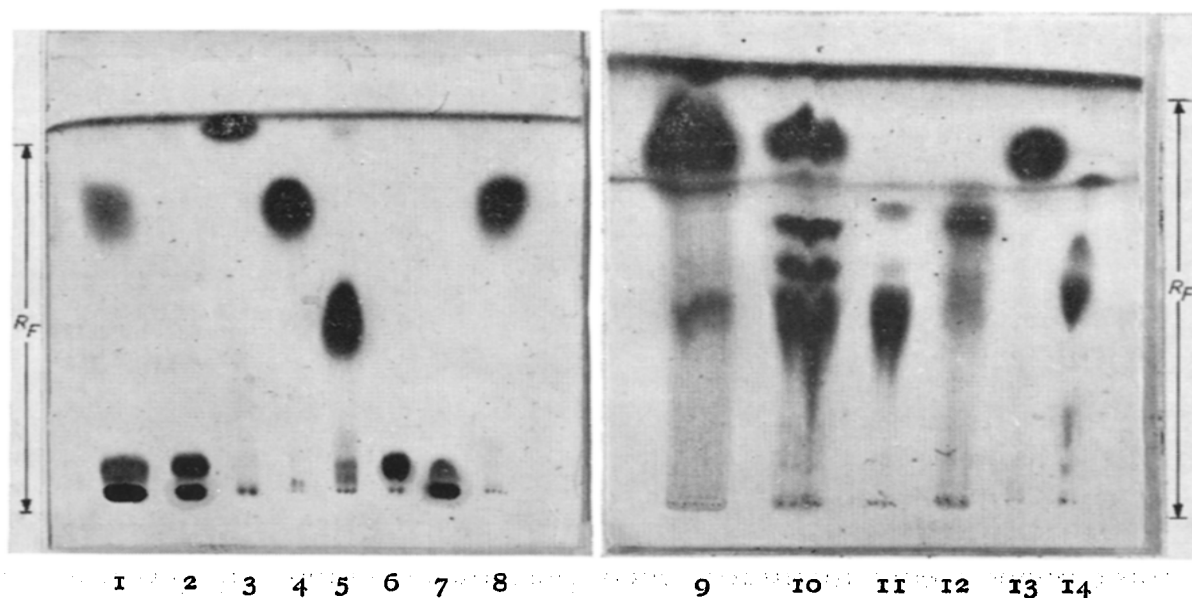


Fig. 2. Kieselgel-H-Dünnschichtchromatogramm der Erythrozytenlipide des Porphyrinextraktes im Vergleich zum Gesamt-Lipoidextrakt. Darstellung durch Besprühen mit 50% wässriger Schwefelsäure und Erhitzung der Platte auf 180°. (1) Erythrozyten-Porphyrinextrakt: am Start Protohämין-Methylester (ME), darüber Cholesterin und Fettsäure-ME. (2) Erythrozyten-Lipoidextrakt: am Start Glycerophosphatide, darüber Cholesterin. (3) Test Cholesterinpalmitat. (4) Isolierter Fettsäure-ME von (1). (5) Test Tristearat. (6) Test Cholesterin. (7) Test Glycerophosphatide. (8) Test Ölsäure-ME. Lösungsmittelsystem Petroläther-Diäthyläther (9:1, v/v).

Fig. 3. Kieselgel-H-Dünnschichtchromatogramm der Erythrozytenlipide des Porphyrinextraktes im Vergleich zum Gesamt-Lipoidextrakt. Darstellung durch Besprühen mit 50% wässriger Schwefelsäure und Erhitzung der Platte auf 180°. (9) Erythrozyten-Lipoidextrakt: von unten nach oben, Sphingomyelin, Protohämין-ME und Cholesterin, in der Front Fettsäure-ME. (10) Erythrozyten-Lipoidextrakt: von unten nach oben Sphingomyelin, Lecithin, Kolamin-Kephalin, Cholesterin. (11) Test Sphingomyelin. (12) Test Kephalin. (13) Test Cholesterin. (14) Test Lecithin (β, γ -Dipalmito-1- α -lecithin). Lösungsmittelsystem Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4, v/v).

TABELLE I

R_F -WERTE ($\times 100$) VON PORPHYRIN- UND PROTOHÄMINMETHYLESTERN UND GEWEBSLIPOIDEN AUF KIESELGEL-H-2 mm-SCHICHTPLATTEN IM LÖSUNGSMITTELSYSTEM BENZOL-ESSIGSÄUREÄTHYLESTER-METHANOL (85:13.3:1.7, v/v)

Abkürzungen: P = Protoporphyrin-ME; C = Coproporphyrin-ME; U = Uroporphyrin-ME; H = Protohämין-ME; ME = Fettsäure-ME; CE = Cholesterinester; C = Cholesterin; TG = Triglyceride; FFS = freie Fettsäuren; GP = Glycerophosphatide.

Anzahl der Läufe	Strecke Start-Front (cm)	Temp. (°C)	Zeit der Entwicklung (min)	Tetrapyrrol-ME				Gewebslipide					
				P	C	U	H*	ME	CE	C	TG	FFS	GP
1	13		40	70	46	5	0	85	96	42	92	11	0
2	13, 15	18	50	83	56	13	0	94	98	46	93	22	0
3	13, 15, 17		60	84	61	12	0	98	98	52	94	30	0

* Protohämין-ME wandert 2-3 cm, wenn es, wie im Chloroformextrakt der Erythrozyten nach der Veresterung der Porphyrine, im Überschuss vorliegt.

ME-Gemisch, das in seiner qualitativen Zusammensetzung mit dem Fettsäure-ME-Gemisch aus Glycerophosphatiden der Erythrozyten vergleichbar ist (Fig. 4). Die gaschromatographischen Analysen wurden mit demselben Ausgangsmaterial durchgeführt. Die Glycerophosphatide wurden aus dem Gesamtlipoidextrakt durch Chromatographie an Kieselsäure (2 g) und Hyflo Super Cel (1 g) nach HANAHAN *et al.*¹⁵ mit aufsteigenden Volumenteilen Methanol in Chloroform isoliert. Die Umesterung der Glycerophosphatide zu Fettsäure-ME erfolgte mit 2 N Na-Methylat auf Dünnschichtplatten¹⁶. Das Fettsäure-ME-Gemisch im Porphyrinextrakt unterscheidet sich vom Fettsäuregemisch der Glycerophosphatide aus dem Lipoidextrakt durch geringere Anteile von Palmitinsäure, Linolsäure und Arachidonsäure (Tabelle II).

Die auf Kieselgel-H-2mm-Schichtplatten beobachtete Interferenz von Protoporphyrin-ME mit Fettsäure-ME und von Coproporphyrin-ME mit Cholesterin veranlasste uns, den Einfluss dieser Lipide, da sie mit Chloroform ebenfalls aus dem Kieselgel eluiert werden, auf die spektrophotometrische Analyse zu prüfen. Fig. 5 zeigt, dass verhältnismässig hohe Lipoidkonzentrationen in der Protoporphyrinlösung die Soret-Bande weder qualitativ noch quantitativ verändern. Die Analyse kleinerer Porphyrinmengen (Fig. 5: Bande 7 und 8, $E = 0.065$) wird durch die Absorption von Cholesterin (Cholesterinester) unter 370 nm ebenfalls nicht beeinflusst.

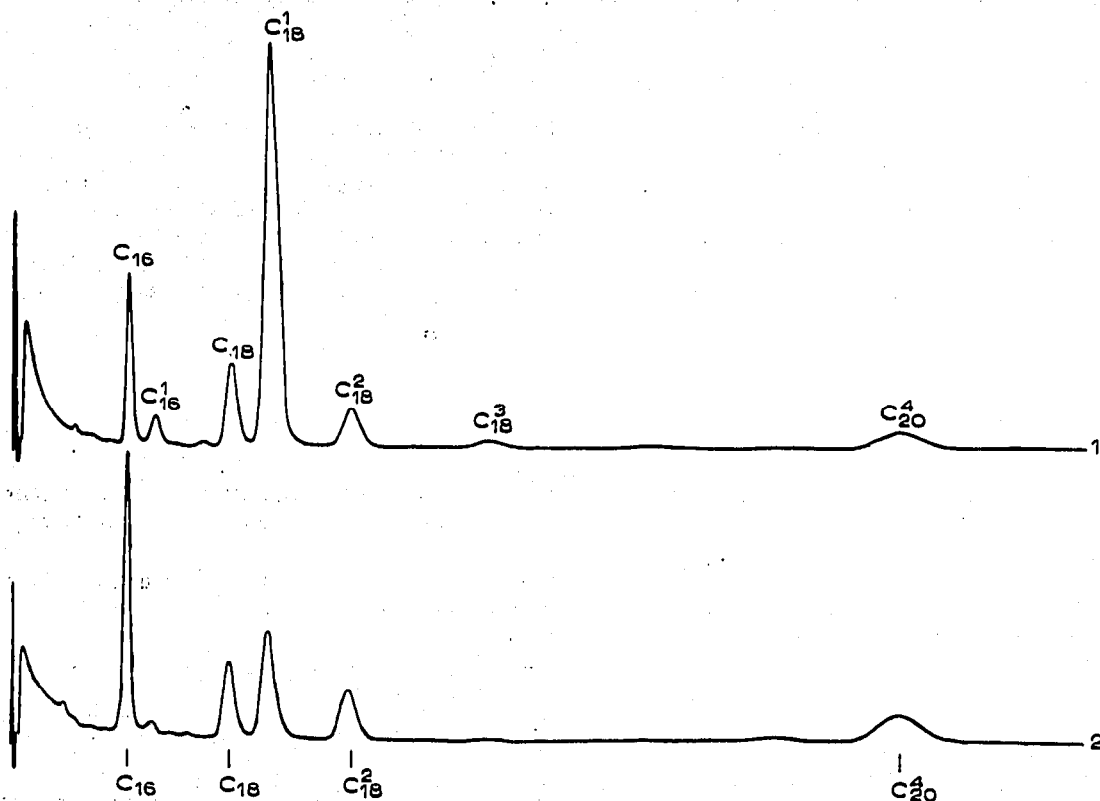


Fig. 4. Gaschromatogramm der zu Fettsäure-Methylestern (ME) umgeesterten Glycerophosphatiden der Erythrozyten. (1) Mit Methanol- H_2SO_4 bei der Veresterung der Porphyrine entstandene Fettsäure-ME. (2) Fettsäure-ME der Glycerophosphatidfraktion des Erythrozyten-Lipoidextraktes nach alkali-katalysierter Umesterung mit Na-Methylat. Gaschromatograph der Fa. Packard, Model 802; Säulenfüllung Äthylenglycolsuccinat (EGS) 2.5% auf Chromosorb G, 80-100 mesh; Trägergas Argon; Durchfluss 60 ml/min; Säulentemperatur 150°. Detektor: Temperatur 200°; Spannung 500 V; Empfindlichkeit 3×10^{-8} .

TABELLE II

VERGLEICH DER FETTSÄUREZUSAMMENSETZUNG EINER ERYTHROZYTENPROBE NACH UMESTERUNG WÄHREND DER PORPHYRINVERESTERUNG (1) UND NACH ALKALI-KATALYSIERTER UMESTERUNG DER GLYCEROPHOSPHATIDE (2)

<i>Fettsäuremethylester in Flächenprozenten des Gaschromatogramms</i>						
	<i>C</i> ₁₆	<i>C</i> _{16:1}	<i>C</i> ₁₈	<i>C</i> _{18:1}	<i>C</i> _{18:2}	<i>C</i> _{20:4}
1	11.00	1.95	8.48	67.55	5.65	5.37
2	38.70	1.54	12.40	23.01	11.30	13.05

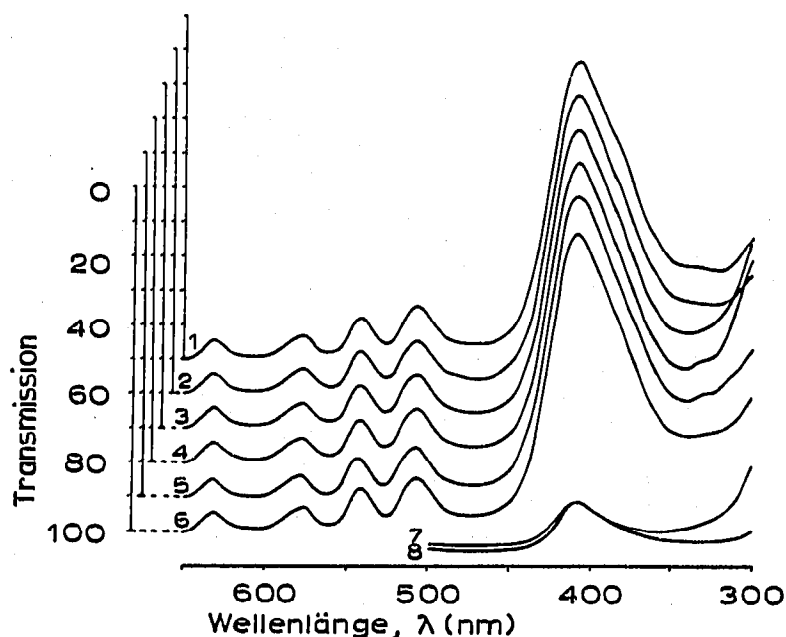


Fig. 5. Absorptionsspektren von Protoporphyrin-IX-di-methylester (P-ME) in Chloroform. Prüfung des Einflusses chloroformlöslicher Gewebslipide auf das Absorptionsspektrum von Porphyrin-ME. (1) P-ME aus menschlichen Erythrozyten, 2 ml einer Lösung $2.6 \times 10^{-6} M$, $d = 2$. (2) 1 + Stearinsäure-ME, 12 mg. (3) 1 + Cholesterinpalmitat, 15 mg. (4) 1 + Cholesterin, 10 mg. (5) 1 + Tristearat, 12 mg. (6) 1 + Stearinsäure, 10 mg. (7) P-ME, $0.1 \mu g$ (1 ml). (8) 7 + Cholesterinpalmitat, 6 mg. Absorptionsmaxima: I = 630, II = 576, III = 540, IV = 506, Soret-Bande 408 nm. Grating-Spectrophotometer Beckman® DB-G.

DANK

Die Autoren danken Herrn Prof. Dr. R. SIEGERT, Direktor des Hygiene-Institutes der Universität Marburg/Lahn, für die grosszügige Förderung dieser Untersuchung. Die gaschromatographischen Analysen wurden in der Abteilung für Klinische Chemie der Medizinischen Universitätsklinik Köln, dank des freundlichen Entgegenkommens von Herrn Dozent Dr. KURT OETTE, durchgeführt. Die Firma Beckman-Instruments, Technisches Büro Frankfurt a.M., stellte ein Spektralphotometer DB-G zur Verfügung.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Porphyrine lyophilisierter Erythrozyten wurden mit Methanol-Schwefelsäure in Methylester überführt und mit Chloroform extrahiert. Die Auftrennung der Komponenten des Chloroformextraktes erfolgte an Kieselgel-H-Platten von 2 mm Schichtdicke.

Die Porphyrinmethylester liessen sich vollständig von Protohämimethylester und Lipoiden trennen. Fettsäuremethylester entstanden durch Umesterung von Glycerophosphatiden der Erythrozyten bei der Veresterung der Porphyrine.

Protoporphyrin- und Coproporphyrinmethylester wurden isoliert und spektrophotometrisch analysiert.

LITERATUR

- 1 J. E. FALK, *Porphyryns and Metalloporphyryns*, Elsevier, Amsterdam, 1964.
- 2 M. DOSS, *J. Chromatog.*, 30 (1967) 265.
- 3 M. GRINSTEIN UND M. M. WINTROBE, *J. Biol. Chem.*, 172 (1948) 459.
- 4 S. SCHWARTZ UND H. M. WIKOFF, *J. Biol. Chem.*, 194 (1952) 563.
- 5 L. WRANNE, *Acta Paediat.*, 49 (1960) Suppl. 124.
- 6 C. RIMINGTON, P. N. MORGAN, K. NICHOLLS, J. D. EVERALL UND R. R. DAVIES, *Lancet*, 1963-II, 318.
- 7 M. GRINSTEIN UND C. J. WATSON, *J. Biol. Chem.*, 147 (1943) 675.
- 8 A. A. HIJMANS VAN DEN BERGH UND A. J. HIJMAN, *Deut. Med. Wochschr.*, 54 (1928) 1492.
- 9 C. RIMINGTON UND S. L. SVEINSSON, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2 (1950) 209.
- 10 T. K. WITH, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 7 (1955) 193.
- 11 B. GOLDRICK UND J. HIRSCH, *J. Lipid Res.*, 4 (1963) 482.
- 12 M. DOSS UND H. BÜRGER, *Z. Physiol. Chem.*, 348 (1967) 936.
- 13 E. KLENK UND M. DOSS, *Z. Physiol. Chem.*, 342 (1965) 187.
- 14 M. DOSS UND U. BODE, *Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem.*, im Druck.
- 15 D. J. HANAHAN, R. M. WATTS UND D. PAPPASJOHN, *J. Lipid Res.*, 1 (1960) 421.
- 16 K. OETTE UND M. DOSS, *J. Chromatog.*, 32 (1968) 439.

J. Chromatog., 35 (1968) 248-256