

CHROM. 3673

EXTRAKTIONSCROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG DER FREIEN UROPORPHYRINISOMERE I UND III UND DEREN SIMULTANE QUANTITATIVE BESTIMMUNG

H. MUNDSCHENK

I. Medizinische Klinik und Poliklinik der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz (Deutschland)
(Eingegangen am 19. Juni 1968)

SUMMARY

Separation and simultaneous quantitative determination of the free uroporphyrin isomers I and III by means of extraction chromatography

Separation and quantitative determination of the uroporphyrin isomers I and III in the acid form can be performed simultaneously in the partition system tri-*n*-butylphosphate/1 *N* hydrochloric acid using columns with a large number of theoretical plates ($N = 300-450$). The eluent is passed through a flow cuvette and the transmission is recorded continuously. The transmission peaks of the isomers are digitized and transformed into extinction values. By integrating the extinction peaks, the amount of the uroporphyrins can be evaluated from the corresponding peak areas.

Using the mathematical procedure described the time necessary for separation ($t_{\text{El.}}$) can be shortened appreciably. This method allows the decomposition of complex elution peaks even at low distances of the peak centres ($\Delta x_p/T_{50} = 1.5-2.0$, depending on the mass ratio) and unfavourable mass ratio ($0.06 \leq \text{UP-I/UP-III} \leq 16$).

Under suitable conditions (length of the column: $L_s = 120$ cm; temperature of the column: $T_s = 15-30^\circ$; concentration of the eluent: $c_{\text{HCl}} = 1 N$) complete analysis of both isomers can be achieved in about 20-30 h. The quantitative determination can be performed up to approx. 1 μg with an accuracy of 10% (95% deviation). No appreciable losses of the uroporphyrins occur ($R = 99 \pm 5\%$) even under extreme conditions ($T_s = 60^\circ$; $c_{\text{HCl}} = 3 N$).

EINLEITUNG

Zur Diagnostizierung von Hämsynthesestörungen hat die Isomerenanalyse der Porphyrine eine besondere Bedeutung erlangt. Sie vermag darüber Aufschluss zu geben, in welchem Umfange die Bildung von Hämpräkursoren des Isomerentyps I, der zur Hämbildung nicht befähigt ist, erfolgt, und gestattet somit, die vorwiegend auf enzymatische Defekte zurückgehende Störung innerhalb dieser Reaktionskette festzulegen.

Während die Auftrennung der Coproporphyrin-isomere I und III in freier¹⁻³ oder veresterter⁴ Form keine methodischen Schwierigkeiten bereitet, erscheint die Trennung der Isomere I und III von Uroporphyrin, aufgrund deren ausgeprägten Neigung zur Aggregatbildung⁵⁻⁷, nicht unproblematisch. Bei den in der Literatur bisher beschriebenen papierchromatographischen^{5,8}, säulenchromatographischen⁶ und dünnschichtchromatographischen⁹ Methoden ist stets Voraussetzung, dass beide Isomere in Esterform vorliegen. Diese Untersuchungen, die in einem Falle mit radioaktiv markierten Substanzen kontrolliert wurden⁷, zeigten, dass eine vollständige Auftrennung der Uroporphyrin-isomere nur schwer zu erreichen ist. Die stets auftretende Überlagerung der beiden isomeren Ester bei der Trennung, deren Ausmass sowohl von der applizierten Menge als auch von dem jeweiligen Isomerenverhältnis abhängt, wurde in einer sehr eingehenden Untersuchung bei der Dioxanmethode empirisch erfasst⁵. Die hierbei ermittelte mathematische Korrekturfunktion gestattet, diese Verluste innerhalb bestimmter Grenzen zu korrigieren. Die Methode unterliegt jedoch der Einschränkung, dass lediglich Uroporphyrinmengen um 1 μg bei einem Isomerenverhältnis von UP-I/UP-III ≤ 5 bei einer vertretbaren Fehlerspanne analysiert werden können.

Diese methodisch bedingten Schwierigkeiten lassen sich umgehen, wenn beide Uroporphyrin-isomere in die entsprechenden Coproporphyrin-isomere überführt werden¹⁰, die als freie Säuren¹⁻³ oder auch als Ester⁴ aufgetrennt und anschliessend quantitativ bestimmt werden können. Zur Bestimmung des Isomerenverhältnisses bei Uroporphyrin kann ebenfalls der Schmelzpunkt der Ester herangezogen werden¹¹. Hierzu werden jedoch vergleichsweise grosse Porphyrinmengen benötigt, die überdies sehr sorgfältig präpariert werden müssen.

Über eine Trennung der freien Uroporphyrin-isomere I und III wurde in der Literatur bisher nicht berichtet. In der vorliegenden Arbeit wird, anknüpfend an vorausgehende, grundlegende Voruntersuchungen^{12,13}, gezeigt, dass unter geeigneten Bedingungen die Isomere dieses Hämpräkursors in freier Form nicht nur aufgetrennt sondern darüber hinaus in einem Arbeitsgang auch gleichzeitig quantitativ bestimmt werden können. Zur Trennung werden mit Hostaflon C2/Tri-*n*-butylphosphat als Füllmaterial beschickte Säulen mit einer relativ hohen Anzahl theoretischer Trennböden ($N = 300-450$) eingesetzt, die sich bereits zur Uroporphyrin-Coproporphyrin-trennung ausgezeichnet bewährten¹³. Die verwendete, weitgehend automatisierte Versuchsanordnung bedarf bei Durchführung der Auftrennung, die je nach dem vorliegenden Isomerenverhältnis 15-30 h in Anspruch nimmt, keinerlei Wartung.

Die Trennung der freien Säuren hat gegenüber der Ester den Vorzug, dass die über eine Filterbodenextraktion¹² aus dem Urin isolierten Porphyrine unmittelbar aufgetrennt und Verluste, wie sie in merklichem Umfange bei der Estertrennung aufgrund der partiellen Hydrolyse stets zu beobachten sind^{5,6}, hierbei praktisch vernachlässigt werden können¹³.

EXPERIMENTELLER TEIL

Material

Uroporphyrin-I (UP-I). Das in Form des Oktamethylesters durch den Handel bezogene Uroporphyrin-I (Lieferfirma: Koch-Light Laboratories Ltd., Colnbrook, England) wurde zunächst in 5 *N* HCl verseift, dünnschichtchromatographisch ge-

reinigt und nach Elution mit 1 N HCl mit Tri-*n*-butylphosphat (TBP) extrahiert. Die Rückextraktion wurde mit 5 N HCl vorgenommen. Geringfügige TBP-Reste in der wässrigen Phase wurden durch mehrfaches Auswaschen mit 5 × 5 ml Benzol entfernt. Verluste an UP-I sind hierbei nicht zu befürchten. Die salzsäure Lösung des Hämpräkursors wurde auf eine Konzentration von 100 µg/ml 5 N HCl eingestellt und in dieser Form zu den einzelnen Untersuchungen eingesetzt. Sämtliche Pipettierungen erfolgten mit einer Aglaspritze, so dass die eingesetzten Porphyrinmengen exakt dosiert werden konnten. Die bei 4° im Kühlschrank aufbewahrte Stammlösung zeigte selbst über einen Zeitraum von einigen Wochen keinerlei Zersetzung.

Uroporphyrin-III (UP-III). Der ebenfalls in Esterform durch die Koch-Light Laboratories Ltd., Colnbrook, England bezogene Hämpräkursor ("ex turaco feathers") wurde, wie vorangehend für UP-I beschrieben, gereinigt und in salzsaurer Lösung bei einer Konzentration von 100 µg/ml 5 N HCl zu den Untersuchungen eingesetzt.

Coproporphyrin-I (CP-I). Coproporphyrin-I wurde aus UP-I durch Decarboxylierung nach der Methode von EDMONDSON UND SCHWARTZ¹⁰ erhalten. Die Aufarbeitung wurde, wie nachstehend unter Methoden beschrieben, vorgenommen. Die CP-I-Konzentration der Stammlösungen schwankte, je nach Präparation, zwischen 20–50 µg/ml 5 N HCl.

Coproporphyrin-III (CP-III). Zur Darstellung von CP-III durch Decarboxylierung wurde von UP-III ausgegangen. Bei der Aufbereitung und Herstellung der Stammlösungen wurde, wie vorangehend für CP-I beschrieben, vorgegangen.

Benzol, p.A. Handelübliches Produkt (Hersteller: Fa. E. Merck, Darmstadt; Kat.-Nr. 1783).

*Tri-*n*-butylphosphat (TBP)*. Als Extraktionsmittel wurde das im Handel erhältliche Produkt (Hersteller: Fa. E. Merck, Darmstadt; Kat.-Nr. 8354) ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Polytrifluorchloräthylen (Hostafon C2). Das als Trägermaterial verwendete Hostafon C2 wurde durch Aufbereitung des durch den Handel bezogenen Produktes (Hersteller: Farbwerke Höchst AG., Frankfurt-Höchst) mit einer Korngrösse von 50–100 µ erhalten. Die Imprägnierung mit dem Extraktionsmittel erfolgte durch tropfenweise Zugabe von TBP unter intensivem Rühren im Gewichtsverhältnis Hostafon C2: TBP = 2:1.

Salzsäure. Die zur Elution eingesetzten Salzsäurelösungen wurden durch Verdünnen aus konz. Salzsäure p.A. (Hersteller: Fa. E. Merck, Darmstadt; Kat.-Nr. 317) erhalten. Das Elutionsmittel war stets mit TBP gesättigt und wurde vor jedem Versuch durch Auskochen (30 min) nochmals weitgehend entgast.

Methoden

Decarboxylierung von UP-I bzw. UP-III. Zur Darstellung der Coproporphyrin-isomere I und III wurden UP-I und UP-III nach der Methode von EDMONDSON UND SCHWARTZ¹⁰ decarboxyliert: 3 ml der salzsäuren UP-I- bzw. UP-III-Lösung ($c_{\text{HCl}} = 0.3 \text{ N}$) wurden in Duranglasröhrchen (innerer Durchmesser: 10 mm; Wandstärke: 1 mm; Länge: 150 mm) auf 4° abgekühlt und mithilfe einer Gasballastpumpe auf einen Druck von $p \leq 1$ Torr evakuiert. Nach dem Abschmelzen in der Sauerstoffflamme wurden die einzelnen Proben für 4 h bei 200° im Trockenschrank, in Sand eingebettet, decarboxyliert. Anschliessend wurde das entstandene CP-I bzw. CP-III aus der Reaktionslösung nach Zugabe von 0.6 ml 1 N NaOH mit 1 ml TBP extrahiert.

Die Rückextraktion erfolgte mit 0.2 ml 5 N HCl. Die organische Phase wurde daraufhin in 5 ml Benzol p.A. aufgenommen und nach dem Zentrifugieren abpipettiert. Anschliessend wurde nochmals sukzessive mit 4×5 ml Benzol nachgewaschen, um die salzsäuren CP-I- bzw. CP-III-Lösungen von anhaftenden TBP-Resten vollständig zu befreien. Porphyrine sind unter diesen Bedingungen in Benzol völlig unlöslich, so dass hierbei keine Verluste zu befürchten sind. Die Umsetzung von UP-I bzw. UP-III zu CP-I bzw. CP-III verlief bei Mengen von 1–500 μg unter den angegebenen Bedingungen praktisch vollständig (Ausbeute: $A \cong 95\%$), was dünnschichtchromatographisch leicht nachzuweisen war.

Extraktionschromatographische Auftrennung der freien Uroporphyrinisomere im TBP-HCl-System. Die zur Durchführung der Isomerentrennung verwendete, weitgehend automatisierte Versuchsanordnung wurde bereits ausführlich an anderer Stelle beschrieben^{13,14}. Im Gegensatz zur Trennung von Coproporphyrin-Uroporphyrin¹³, die bereits in 1–2 h abgeschlossen ist, werden bei der Auftrennung von UP-I/UP-III, wegen des geringen Trennfaktors ($\alpha = 1.19$), extrem lange Kolonnen ($L_s = 120$ cm) benötigt, wodurch grosse Elutionszeiten t_{El} resultieren. Als Elutionsmittel wurde stets 1 N HCl verwendet; bei der Auftrennung wurde eine Säulentemperatur von $T_s = 30^\circ$ vorgegeben. Für extrem ungünstige UP-I/UP-III-Verhältnisse empfiehlt sich allerdings, die Säulentemperatur auf $T_s = 15^\circ$ zu reduzieren.

Die quantitative Bestimmung der beiden Isomere erfolgte über eine Auswertung des bei der Elution fortlaufend registrierten Transmissionsverlaufes. Im Gegensatz zu einer an anderer Stelle¹³ gewählten Definition der Messgrösse wird in der vorliegenden Arbeit der gemessene Transmissionspeak zunächst graphisch digitalisiert (Fig. 5) und die Transmissionsordinaten T_t in die entsprechenden Extinktionswerte E_t umgerechnet (Fig. 6). Als eigentliche, der vorgegebenen Porphyrinmenge m_{vorg} korrespondierende Messgrösse wird das über den gesamten Peakverlauf von t_1 bis t_2 gehende Extinktionsintegral $N_p = \int_{t_1}^{t_2} E_t dt$ bei der Berechnung berücksichtigt. Es ist vorgesehen, diese zunächst noch sehr aufwendige Form der manuellen Auswertung geeigneten, derzeit im Handel erhältlichen Gerätebausteinen zu übertragen (Transmissions-Extinktionskonverter; Digitalintegrator), die ohne Schwierigkeiten in die vorliegende Versuchsanordnung eingebaut werden können¹⁴.

Zur Trennung der Uroporphyrinisomere I und III wird im einzelnen wie folgt vorgegangen: Die in 5–10 ml schwach salzsäurer Lösung (pH 1–3) vorliegenden Isomere werden in den Vorraum der Trennsäule eingefüllt. Bei kleinem Durchfluss D ($D = 15$ ml/h) erfolgt vollständige Extraktion in der obersten Schicht des Füllmaterials ($K_{DB} \cong 1000$ (Lit. 12)), deren Höhe, je nach der vorliegenden Porphyrinmenge, zwischen 1–10 mm liegt. Anschliessend wird mit 3–5 ml 0.01 N HCl nachgewaschen.

Bei der Abtrennung der Hämpräkursoren aus Urin wird folgendermassen verfahren^{12,13}: In dem schwach salzsäuren Urin (pH 1–3), dessen Volumen, je nach der vorliegenden Porphyrinkonzentration, zwischen 20–200 ml liegt, werden 1–10 g mit TBP imprägniertes Kieselgel aufgeschlämmt, und diese Suspension über eine mit einem Glasfaserfilter belegte Hahn'sche Nutsche (Durchmesser: 50 mm, Porenweite: G 2) abgesaugt. Anschliessend wird das Filtrat noch zweimal über den gleichen Filterboden gegeben und schliesslich mit 0.05 N HCl gründlich nachgewaschen. Die durch den Filterboden extrahierten Porphyrine werden nun mit 3×3 ml 5 N HCl

sukzessive eluiert, die Lösungen in einem 20 ml Messkölbchen vereinigt und mit Aqua dest. bis zur Marke aufgefüllt. Durch Titration mit 1 N NaOH wird die Säurekonzentration der Lösung genau ermittelt. Ein Aliquot hiervon wird mit 1 N NaOH auf eine Azidität von $c_{\text{HCl}} = 0.01-0.1 \text{ N}$ eingestellt und anschliessend zur Auftrennung der Porphyrine auf der Säule, wie vorangehend beschrieben, eingesetzt.

Anschliessend wird die Vorwaschsäule, die mit dem verwendeten Elutionsmittel (1 N HCl) bis zum Ausgang gefüllt ist, aufgesetzt und die Elution durch Einschalten der Proportionierpumpe eingeleitet. Die Aufzeichnung des Transmissionsverlaufes durch den Potentiometerschreiber erfolgt kontinuierlich und bedarf keinerlei Wartung während des Versuches. Nach der Auftrennung wird die Menge der einzelnen Hämpräkursoren über eine Auswertung des registrierten Transmissionsverlaufes in der beschriebenen Weise ermittelt.

Dünnschichtchromatographische Auftrennung der freien Porphyrine. Die zu Kontrollzwecken durchgeführten dünn-schichtchromatographischen Auftrennungen der freien Porphyrine, insbesondere zur Identifikation der nach der Decarboxylierung erhaltenen Coproporphyrin-isomere I und III, wurden nach der an anderer Stelle eingehend beschriebenen Methode³ vorgenommen. Zu den Trennungen wurden für 2 h bei 120° aktivierte Kieselgelschichten eingesetzt. Als Fließmittel wurde 2,6-Lutidin-Wasser in der Zusammensetzung 2,6-Lutidin - Aqua dest. (5:3) verwendet, das durch Einstellen eines Becherglases mit 100 ml konz. Ammoniak in die Trennkammer gut vorzusättigen ist.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Trennung der Uroporphyrin-isomere I und III

Die Trennung von Uroporphyrin I und III in freier Form scheiterte bisher vorwiegend daran, dass beide Isomere bei den beschriebenen chromatographischen Methoden in ihrem Verhalten weitgehend übereinstimmten (gleiche R_F -Werte; identische Elutionspositionen), was einerseits in dem Auftreten sehr ungünstiger Trennfaktoren ($\alpha \approx 1$), zum anderen in der sehr ausgeprägten Tendenz zur Aggregatbildung zum Ausdruck kommt.

Voraussetzung für das Gelingen einer solchen Trennung ist zunächst ein deutlich von 1 verschiedener Trennfaktor. Für das vorliegende Isomerenpaar UP-I/UP-III wurde im Batch-Versuch bei $c_{\text{HCl}} = 1 \text{ N}$ an Kieselgelfilterböden ein statistisch gesicherter Trennfaktor von $\alpha = 1.16 \pm 0.02$ (95 %-Abweichung) erhalten, der im Säulenversuch bei Hostafion C 2/TBP-Füllung weitgehend bestätigt wurde ($\alpha = 1.19 \pm 0.02$). Es war daher Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen, die Versuchsbedingungen bzw. Säulenabmessungen zu ermitteln, die eine Auftrennung und quantitative Bestimmung der beiden Isomeren durchzuführen gestatteten.

Das im folgenden zu beschreibende Auswertverfahren setzt voraus, dass der relative Abstand der beiden Elutionspeaks $\Delta x_p / \bar{T}_{50} \approx 2$ ($\Delta x_p =$ Abstand der Elutionsmaxima zweier Peaks; $\bar{T}_{50} =$ Arithmetisches Mittel der Halbwertsbreiten T_{50}^a und T_{50}^b der beiden Einzelpeaks) beträgt¹³. Hierdurch ist eine Bestimmung selbst bei sehr ungünstigen Konzentrationsverhältnissen noch möglich ($16 \geq \text{UP-I/UP-III} \geq 1/16$). Eine vollständige Auftrennung der beiden Elutionspeaks, die lange Elutionszeiten t_{El} erfordert, ist hierbei nicht notwendig. Bei dieser Bestimmung wird weiterhin vorausgesetzt, dass der Verlauf der Elutionspeaks bezüglich Struktur und

Flächenaufteilung bekannt bzw. an Peaks reiner Bezugssubstanzen ermittelt werden kann. Da hierbei Abweichungen von den durch die Normalverteilungsfunktion beschreibbaren Gauss-Peaks auftreten, werden bei dieser Auswertung empirisch ermittelte Peakstruktur- und Peakteilflächenfunktionen für beide Isomere zugrunde gelegt^{15, 16}.

Der für reine Bezugssubstanzen UP-I und UP-III unter Versuchsbedingungen erhaltene Peakverlauf ist in Fig. 1 im Wahrscheinlichkeitsnetz dargestellt. Diese

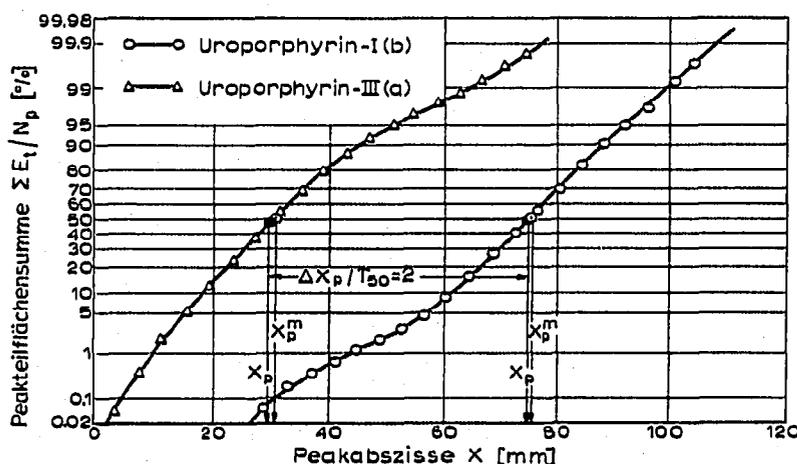


Fig. 1. Auftragung von zwei empirisch erhaltenen, typischen Elutionspeaks von Uroporphyrin-I und -III im Wahrscheinlichkeitsnetz. Beachte die in der rechten Peakflanke von UP-III bzw. linken von UP-I auftretenden Abweichungen von der Form reiner Gausspeaks und die hierdurch verursachten Unterschiede zwischen der mittleren (x_p^m) und wahrscheinlichsten (x_p) Peaklage.

Form der Auftragung lässt besonders deutlich die von der reinen Gauss'schen Peakform auftretenden Abweichungen zum Ausdruck kommen. Die innerhalb enger Grenzen für beide Isomere jeweils erhaltenen numerischen Daten sind in Tabelle II zusammengestellt. Inwieweit die beobachteten Abweichungen von der reinen Gauss'schen Form auf nicht aufgelöste Anteile weiterer Isomere (II, IV) zurückgehen, kann nach dem derzeitigen Stand der Untersuchungen nicht entschieden werden.

Bei der rechnerischen Zerlegung von komplexen Elutionspeaks ist die Kenntnis der Größe der Überlappungszonen $q_i^{a,r}$ bzw. $q_j^{b,l}$ zur ersten Orientierung häufig von Interesse (Fig. 6). Eine Bestimmung kann für verschiedene Peaklagenabstände $\Delta x_p / \bar{T}_{50}$ und beliebige Intensitätsverhältnisse N_p^a / N_p^b nach Fig. 2 erfolgen. In dieser Darstellung zu deren Berechnung reine Gauss- und empirische UP-I/UP-III-Peakpaare bei verschiedenen Peaklagenabständen $\Delta x_p / \bar{T}_{50}$ im Wahrscheinlichkeitsnetz ausgewertet wurden (Fig. 1), ist der Anteil $q_j^{b,l}$ von Peak b in der linken Flanke gegen die entsprechenden relativen Peakabszissen $t_i^{a,r} / t_{50}^{a,r}$ von Peak a (rechte Flanke) aufgetragen (Fig. 6). Die diesen Peakabszissen korrespondierenden Peakteilflächen ($1 - q_i^{a,r}$) von Peak a können für beide Peakpaare ebenfalls Fig. 2 entnommen werden. Zieht man bei zwei nicht aufgelösten Peaks bei einem Peaklagenabstand von $\Delta x_p / \bar{T}_{50}$ eine Trennlinie im Abstand $t_i^{a,r} / t_{50}^{a,r}$ von x_p^a , so kann der Anteil $q_j^{b,l}$, der der restlichen Peakteilfläche ($1 - q_i^{a,r}$) überlagert ist, unmittelbar Fig. 2 entnommen werden. So erhält man beispielsweise für das UP-I/UP-III-Peakpaar bei einem Abstand von $\Delta x_p / \bar{T}_{50} = 2$, einem Intensitätsverhältnis $N_p^a / N_p^b = 1$ und $t_i^{a,r} / t_{50}^{a,r} = 1$ den Anteil von Peak b in der Teilfläche von Peak a ($1 - q_i^{a,r} = 81.5\%$) zu $q_j^{b,l} = 0.6\%$.

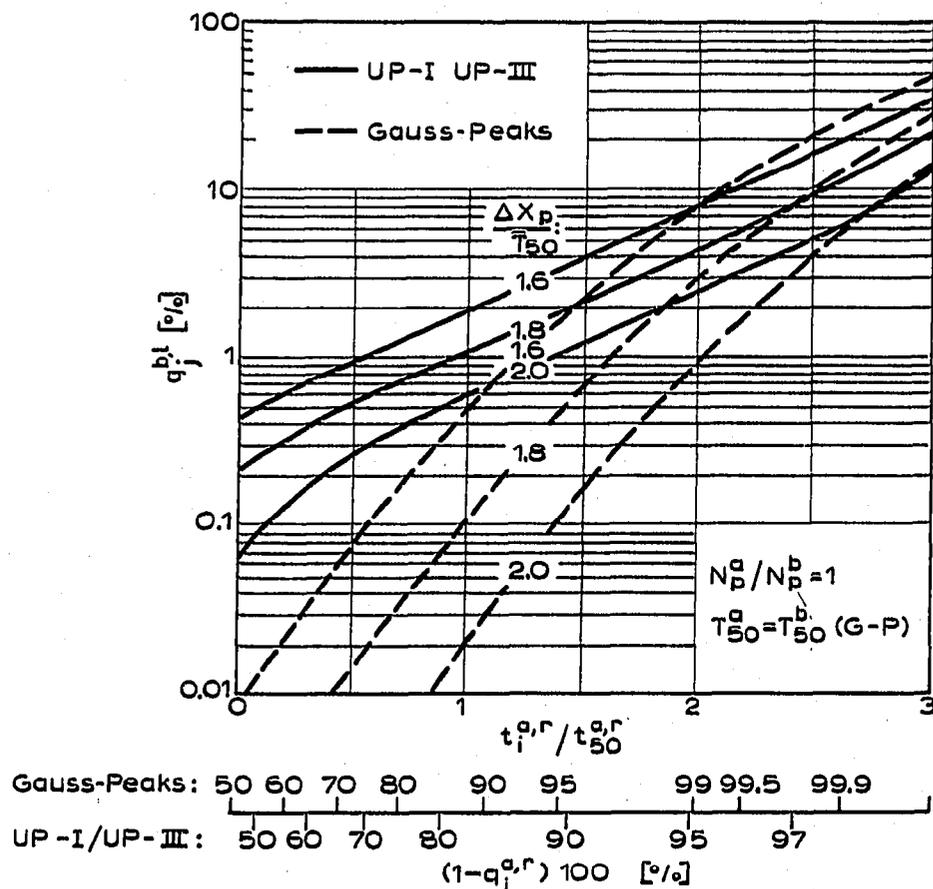


Fig. 2. Darstellung der Peakanteile $q_j^{b,l}$ von Peak b in der Peakteilfläche $(1 - q_i^{a,r})$ von Peak a bei verschiedenen Peaklagenabständen ($\Delta x_p/T_{50} = 1.6, 1.8$ und 2.0) in Abhängigkeit von der relativen Peakabszisse $t_i^{a,r}/t_{50}^{a,r}$ für Gauss- und UP-I/UP-III-Peakpaare. Die den $t_i^{a,r}/t_{50}^{a,r}$ -Werten entsprechenden Peakteilflächen $(1 - q_i^{a,r})$ von Peak a sind ebenfalls für beide Peakpaare im unteren Teil der Abbildung aufgetragen.

Somit beträgt der "Reinheitsgrad" der beiden durch die Trennlinie aufgeteilten Peakteilflächen $\eta_a = q_j^{b,l}/(1 - q_i^{a,r}) = 0.74\%$ für Peakteilfläche a und $\eta_b = q_i^{a,r}/(1 - q_j^{b,l}) = 18.6\%$ für Peakteilfläche b. Für ein Gauss-Peakpaar erhält man für die gleichen Bedingungen $\eta_a = q_j^{b,l}/(1 - q_i^a) = 0.023\%$ für Peakteilfläche a und $\eta_b = q_i^a/(1 - q_j^b) = 13\%$ für Peakteilfläche b. Die Darstellung kann in gleicher Weise zur Ermittlung der Überlappungszonen bei Peakpaaren mit beliebigen Intensitätsverhältnissen verwendet werden. Zwischenwerte für die Peaklagenabstände können ebenfalls leicht interpoliert werden.

Diese Bestimmung der Überlappungszonen ist in zweifacher Hinsicht für eine praktische Anwendung von Interesse. So kann bei analytischen Auswertungen der Fehler ermittelt werden, der bei der Zerlegung von nicht aufgelösten Peaks bei einem gegebenen Peaklagenabstand auftritt. Bei präparativen Trennungen kann die Reinheit der zu trennenden Substanzen a und b für nahezu beliebige $t_i^{a,r}/t_{50}^{a,r}$ -Werte vorausbestimmt werden, so dass umgekehrt bei einer gegebenen Reinheitsforderung der Zeitpunkt bestimmt werden kann, zu dem das Sammeln der beiden von der Säule eluierten Substanzen begonnen bzw. abgebrochen werden muss.

Die Trennwirkung einer chromatographischen Säule wird für ein gegebenes

Substanzpaar bei definierten Versuchsbedingungen durch die Anzahl der theoretischen Trennböden N charakterisiert. Sie errechnet sich aus dem korrigierten Retentionsvolumen $v_{\max}^{\text{corr.}}$ und der Peakabszisse $T_{36.8}$ beim 1/e-ten Teil des Peakmaximums $E_t(x_p)$ nach Lit. 17:

$$N = 8 \left(\frac{v_{\max}^{\text{corr.}}}{T_{36.8}} \right)^2 \quad (1)$$

Hieraus erhält man mit der Säulenlänge L_s die Höhe eines theoretischen Bodens Δh zu:

$$\Delta h = \frac{L_s}{N} \quad (2)$$

Die im folgenden zu beschreibende Methode zur Bestimmung der Intensität komplexer Elutionspeaks erfordert im ungünstigsten Fall einen Peaklagenabstand von $\Delta x_p / \bar{T}_{50} \cong 2$. Bei einem Intensitätsverhältnis von $N_p^a / N_p^b = 1$ erhält man für die Überlappungszonen $q_i^{a,r}$ und $q_j^{b,l}$ unter der Bedingung:

$$q_i^{a,r} = q_j^{b,l} \quad (3)$$

aus Fig. 2 durch Interpolation den Wert $q_i^{a,r} = q_j^{b,l} = 0.036$. Für das vorliegende Isomerenpaar UP-I/UP-III ergibt sich somit nach Lit. 17 mit dem für das TBP-HCl-System erhaltenen Trennfaktor $\alpha = 1.19$ und einem Intensitätsverhältnis $N_p^a / N_p^b = 1$ die Zahl der erforderlichen Trennböden mit $N = 420$. Ist weiterhin die Höhe eines theoretischen Bodens Δh bekannt, so kann hieraus die Säulenlänge L_s nach Gl. (2) berechnet werden.

Die Trennung der Uroporphyrinisomere I und III mit der beschriebenen Versuchsanordnung wurde unter Bedingungen vorgenommen, wie sie auch weitgehend bei der Auftrennung von Coproporphyrin-Uroporphyrin¹³ eingehalten wurden (Säurekonzentration: $c_{\text{HCl}} = 1 \text{ N}$; Messwellenlänge: $\lambda_{\text{gem.}} = 429 \text{ nm}$; Bandbreite: $\Delta \lambda_B = 10 \text{ \AA}$; Säulentemperatur: $T_s = 15-30^\circ$; Küvettemperatur: $T_K = 20^\circ$; Durchfluss: $D = 15-25 \text{ ml/h}$).

Der Einfluss der Säulenlänge L_s und damit der Anzahl der theoretischen Trennböden auf die Auftrennung eines aus dem Urin eines porphyrie-erkrankten Patienten (Patient U.) isolierten Porphyringemisches geht eindrucksvoll aus den in Fig. 3 dargestellten Beispielen hervor. Die zunehmende Auflösung der beiden Isomere UP-I und UP-III (F 1 und Fra) sowie der übrigen Fraktionen mit wachsender Säulenlänge ist unverkennbar. Die bei dieser Auftrennung erhaltenen charakteristischen Werte für die Elutionszeiten $t_{\text{El.}}$ bzw. $t_{\text{El.}}^{\text{corr.}}$, Peaklagenabstand $\Delta x_p / \bar{T}_{50}$, Trennfaktor α und Zahl der theoretischen Böden N , die mit reinen Bezugssubstanzen UP-I und UP-III bestätigt werden konnten, sind in Tabelle I zusammengestellt. Hieraus kann für das vorliegende Trennsystem die Höhe eines theoretischen Bodens nach Gl. (2) mit $\Delta h = 3.2 \text{ mm}$ berechnet werden. Für die geforderte Auflösung von $\Delta x_p / \bar{T}_{50} = 2$ kann aus den erhaltenen Werten die Zahl der theoretischen Böden zu $N = 425$ ermittelt werden. Dieser Wert stimmt mit dem nach Lit. 17 graphisch erhaltenen gut überein ($N = 420$). Somit errechnet sich die zu der gewünschten Auflösung ($\Delta x_p / \bar{T}_{50} = 2$) unter den vorliegenden Bedingungen ($c_{\text{HCl}} = 1 \text{ N}$; $T_s = 30^\circ$) erforderliche Säulenlänge zu $L_s = 136 \text{ cm}$. Bei der praktischen Anwendung wird man jedoch, innerhalb

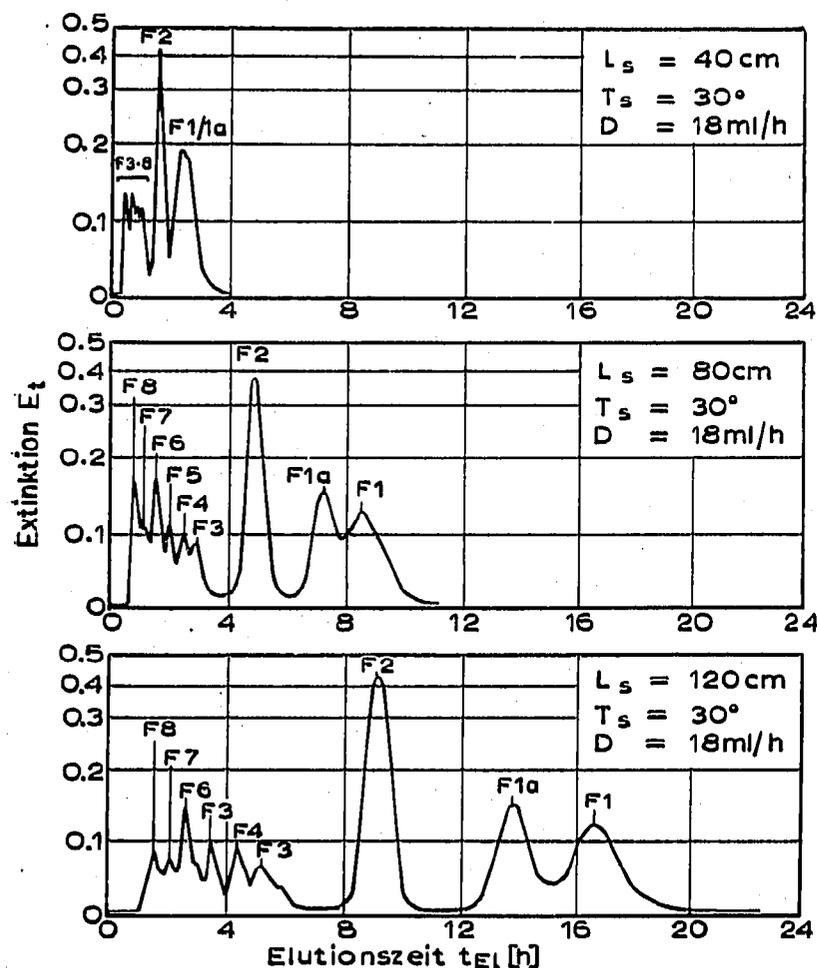


Fig. 3. Extraktionschromatographische Zerlegung eines aus dem Urin eines porphyrie-erkrankten Patienten isolierten komplexen Porphyringemisches unter gleichen Mess- und Versuchsbedingungen, jedoch bei unterschiedlicher Säulenlänge L_s ($L_s = 40, 80$ und 120 cm). Der Einfluss der Säulenlänge auf die Auflösung ist besonders deutlich bei den Fraktionen F 1/1a (UP-I/UP-III) zu ersehen.

TABELLE I

ZUSAMMENSTELLUNG DER BEI DER AUFTRENNUNG VON UP-I/UP-III MIT SÄULEN UNTERSCHIEDLICHER LÄNGE L_s ($L_s = 40, 80$ UND 120 cm) ERHALTENEN WERTE FÜR DEN PEAKLAGENABSTAND $\Delta x_p/\bar{T}_{50}$, TRENNFAKTOR α UND ZAHL DER THEORETISCHEN BÖDEN N (FIG. 3)

		L_s (cm)		
		40	80	120
t_{El}	(h) UP-I	2.65	8.60	16.5
	UP-III	2.40	7.30	13.8
$t_{corr. El}$	(h) UP-I	2.35	8.05	15.7
	UP-III	2.10	6.75	13.0
$\Delta x_p/\bar{T}_{50}$		1.10	1.45	1.85
α		(1.12)	1.19	1.21
N		125	250	375

bestimmter Grenzen, die Anpassung an die optimalen Versuchsbedingungen vorzugsweise über die leicht variierbaren Versuchsparameter T_s und c_{HCl} vornehmen¹³.

Es muss jedoch nochmals nachdrücklich betont werden, dass eine Auflösung von $\Delta x_p/\bar{T}_{50} = 2$ nur bei extremen Bedingungen erforderlich ist, in den Fällen, in denen eine der beiden Komponenten stark überwiegt (UP-I/UP-III ≥ 10 bzw. ≤ 0.1). Bei günstigeren Konzentrationsverhältnissen kann eine quantitative Bestimmung der beiden Isomere bei wesentlich kleineren Peaklagenabständen durchgeführt werden, ohne dass dadurch die Genauigkeit merklich eingeschränkt würde. So können Isomerengemische bei einem Mengenverhältnis von UP-I/UP-III ≈ 1 noch bei einem Peaklagenabstand von $\Delta x_p/\bar{T}_{50} = 1.5$ zerlegt und quantitativ bestimmt werden. Hierdurch kann der zur Durchführung einer Auftrennung erforderliche Zeitaufwand ganz erheblich reduziert werden (Fig. 3).

Identifikation der Uroporphyrinisomere I und III

Bei einem Vergleich der dünnschichtchromatographischen (vgl. Fig. 2, Lit. 12) und extraktionschromatographischen (Fig. 3) Auftrennung des aus dem Urin von Patient U. isolierten Porphyringemisches fällt auf, dass die beiden intensivsten Fraktionen auf der DC-Platte (f 1,2; Fig. 4) bei der EC-Trennung deutlich in drei Peaks unterschiedlicher Intensität aufspalten (F 1,1a und 2; Fig. 3). Die Auftrennung der übrigen Fraktionen (DC-Technik: f 3-9; EC-Technik: F 3-8), über deren Identifizierung an anderer Stelle noch ausführlich berichtet werden soll¹⁴, dagegen stimmt in beiden Fällen weitgehend überein. Es wurde daher zunächst vermutet¹², dass es sich bei den dünnschichtchromatographisch mit niedrigen R_F -Werten erhaltenen Fraktionen f 1,2 ($R_F = 0.02-0.04$) um Uroporphyrinisomere handelt, die extraktionschromatographisch weiter zerlegt werden können. Zur Identifizierung von f 1,2 bzw. F 1,1a und 2 wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt:

Bestimmung der Peaklage λ_p der Soretbande. Die Peaklage der Soretbande λ_p ist neben Schmelzpunkt, R_F -Wert, Salzsäurezahl, Verteilungskoeffizient u.a. ein absolut zuverlässiges Kriterium für die Identität eines Hämpräkursors. Da Isomere gleiche λ_p -Werte aufweisen und zwischen der Anzahl von Carboxylgruppen pro Molekül n und λ_p eine direkte Abhängigkeit besteht¹⁴, kann somit über eine Bestimmung dieser Grösse eine weitgehend eindeutige Einordnung des Hämpräkursors erfolgen. Es ist überraschend festzustellen, dass über diese Möglichkeit der Identifizierung von Porphyrinen bisher in der Literatur kaum berichtet wurde, obwohl die Methode durch ihre hohe Empfindlichkeit und Eindeutigkeit anderen gebräuchlichen Nachweisreaktionen zumindest ebenbürtig ist.

Zu dieser Bestimmung wird der Absorptionsverlauf der Porphyrinlösung bei definierter HCl-Konzentration im Bereich von 380-450 nm spektralphotometrisch bei kleiner Spalt- bzw. Bandbreite gemessen. Durch graphische Differentiation der Soretbande zwischen 390-410 nm erhält man mit hoher Genauigkeit die gesuchte Peaklage λ_p ^{3,15,16}. Die Bestimmung kann noch selbst mit Mengen von 0.2 μg des Hämpräkursors durchgeführt werden. Auf den Einfluss der Salzsäurekonzentration c_{HCl} auf Peaklage und spezifische Extinktion ist streng zu achten¹³.

Im vorliegenden Fall wurden für die einzelnen Fraktionen bei $c_{\text{HCl}} = 1\text{ N}$ die folgenden Werte für die Peaklage der Soretbande λ_p erhalten: f 1 sowie F 1, 1a: $\lambda_p = 405.8 \pm 0.1$ nm; f 2 sowie F 2: $\lambda_p = 404.7 \pm 0.1$ nm. Hieraus folgt, dass f 1 bei der extraktionschromatographischen Trennung in zwei Uroporphyrinisomere auf-

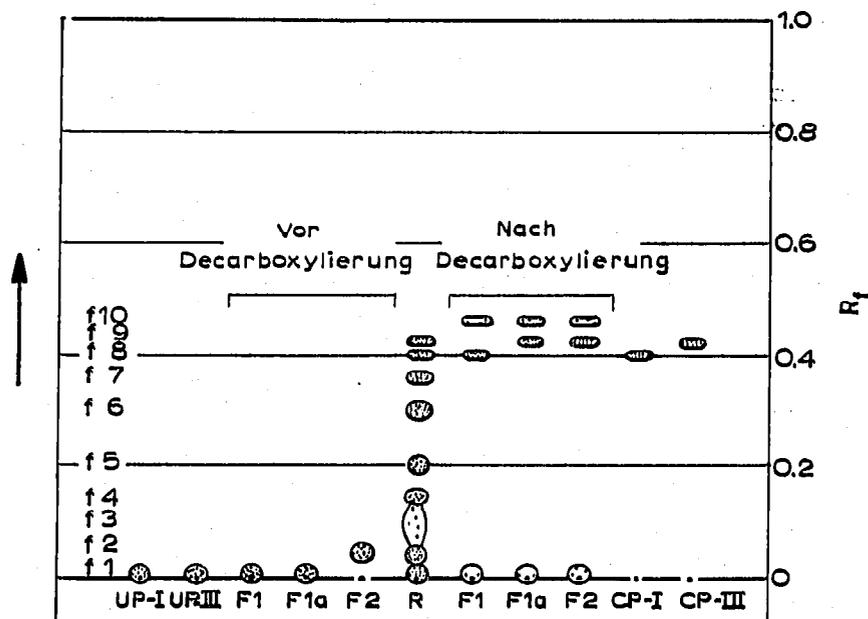


Fig. 4. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der extraktionschromatographisch isolierten Fraktionen F 1, 1a und 2, vor und nach der Decarboxylierung. Identifikation durch Vergleich der R_F -Werte mit den reiner Bezugssubstanzen. Die Punktdichte der DC-Flecken widerspiegelt näherungsweise die relative Porphyrinkonzentration. R ist das aus dem Urin von Patient U. isolierte Porphyringemisch (Fig. 2, Lit. 12).

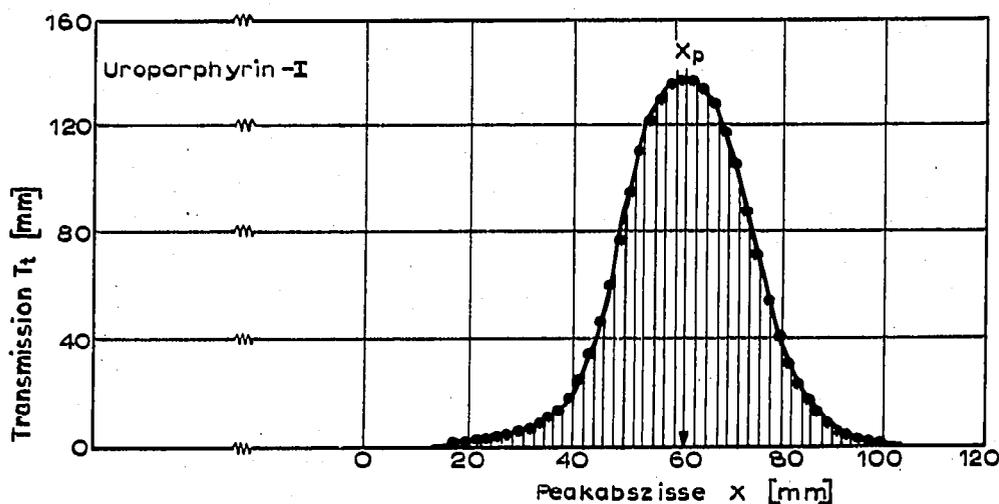


Fig. 5. Zerlegung eines bei der Registrierung erhaltenen typischen Transmissionspeaks von Uroporphyrin-I und Ermittlung der den jeweiligen Peakabszissen x entsprechenden Ordinatenwerte T_t ("graphische Digitalisierung").

spaltet (identische λ_p -Werte), die dünnschichtchromatographisch nicht weiter aufgetrennt werden können (Fig. 4). Aus dem für f 2 sowie F 2 erhaltenen λ_p -Wert kann in Verbindung mit anderen Kriterien bzw. weiteren Umsetzungen¹⁴ geschlossen werden, dass es sich um ein Heptacarboxylporphyrin der Isomerenreihe III handelt (7-III).

Bestimmung der Lage x_p der Elutionspeaks. Anstelle der in der Literatur bisher gebräuchlichen Salzsäurezahl zur Charakterisierung der abgestuften Affinität der einzelnen Porphyrine gegenüber dem verwendeten Extraktionsmittel wird in der vorliegenden Arbeit der Verteilungskoeffizient K_{DB} verwendet, der bei der extraktionschromatographischen Säulentrennung die Lage der Elutionsmaxima x_p bestimmt. Aus den im Batch-Versuch an Kieselgelfilterböden erhaltenen K_{DB} -Werten für UP-I und UP-III ($K_{DB}(\text{UP-I}) = 58$; $K_{DB}(\text{UP-III}) = 50$, jeweils für $c_{\text{HCl}} = 1 \text{ N}$) folgt, dass UP-I die grössere Elutionszeit t_{El} aufweisen, somit F 1 mit UP-I und F 1a mit UP-III identisch sein sollten. Die Annahme wurde wie folgt bestätigt: Fügt man zu dem aufzutrennenden Porphyringemisch (Patient U.) vorher dosierte Mengen der reinen Bezugssubstanzen von UP-I und UP-III hinzu, so kann eine adäquate Zunahme der Peakfläche N_p der jeweiligen Fraktion beobachtet werden. Eine Änderung der Peakstruktur bei dieser Aufstockung, kontrolliert über die Peakhalbwertsbreite T_{50} , war weder bei UP-I noch UP-III festzustellen, wodurch die Identität der beiden Fraktionen als nachgewiesen angesehen wurde.

Dünnschichtchromatographische Auftrennung vor und nach der Decarboxylierung. Die derzeit wohl zuverlässigste Methode zur Identifikation der Uroporphyrinisomere UP-I und UP-III besteht in der Überführung in die entsprechenden Coproporphyrinisomere CP-I und CP-III durch Decarboxylierung, die nun ihrerseits dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und als solche identifiziert werden können.

Hierzu werden die Fraktionen F 1, 1a und 2 nach der von EDMONDSON UND SCHWARTZ beschriebenen Methode¹⁰ umgesetzt, und die Reaktionsprodukte mit den reinen Bezugssubstanzen CP-I und CP-III dünnschichtchromatographisch auf der gleichen Platte entwickelt. Das Ergebnis einer solchen Auftrennung ist aus Fig. 4 zu ersehen.

Ein Vergleich der R_F -Werte beweist, dass bei der Decarboxylierung aus F 1 CP-I und aus F 1a und F 2 CP-III entsteht. Hierdurch ist die Zugehörigkeit von F 1 bzw. F 1a und F 2 zur Isomerenreihe I bzw. III eindeutig sichergestellt, da für CP-II und CP-IV andere R_F -Werte erwartet werden³. Eine Bestimmung der Peaklage der Soretbande λ_p der decarboxylierten Hämpräkursoren ergab ebenfalls den für Coproporphyrin in $c_{\text{HCl}} = 1 \text{ N}$ zu erwartenden Wert ($\lambda_p = 401.3 \text{ nm}$). Weiterhin war auffallend, dass nach der Decarboxylierung von F 1, 1a und 2 eine Substanz in der CP-II-Position auftrat (f 10, Fig. 4), die in dem ursprünglichen Porphyringemisch nicht oder nur in sehr geringer Konzentration vorlag. Da jedoch der ermittelte λ_p -Wert deutlich von dem bei CP-Isomeren zu erwartenden abweicht ($\lambda_p = 402.2$ und 403.0 nm), muss bezweifelt werden, ob es sich im Falle von f 10 um ein Coproporphyrinisomer handelt¹⁴.

Quantitative Bestimmung der Uroporphyrinisomere I und III

Mit der beschriebenen Versuchsanordnung können Uroporphyrinisomere in freier Form nicht nur aufgetrennt sondern darüber hinaus in einem Arbeitsgang auch quantitativ bestimmt werden. Hierzu wird der mit einem Potentiometerschreiber kontinuierlich aufgezeichnete Verlauf der Transmission T_t zunächst graphisch digitalisiert (Fig. 5), und die erhaltenen Transmissionsordinaten in die entsprechenden Extinktionswerte E_t transformiert (Fig. 6). Aus der über die gesamte Peakfläche integrierten Extinktion E_t erhält man die der vorgegebenen bzw. vorliegenden Porphyrinmenge m_{vorg} korrespondierende Messgrösse N_p :

$$N_p = \int_{t_1}^{t_2} E_t dt \quad (4)$$

Eine Ermittlung der den einzelnen Fraktionen entsprechenden Peakflächen N_p wird häufig dadurch beeinträchtigt, dass die Auflösung der Elutionspeaks unzureichend ist bzw. dass zur vollständigen Auflösung sehr lange Säulen und damit grosse Elutionszeiten t_{E1} erforderlich sind (Fig. 3). Zur Reduzierung des Zeitaufwandes bei der Analyse von komplexen Porphyringemischen wird im folgenden ein Verfahren beschrieben, das eine Zerlegung der Elutionspeaks selbst bei mässiger Peaküberlagerung ($\Delta x_p / \bar{T}_{50} = 1.5-2.0$, je nach Mengenverhältnis N_p^a / N_p^b) noch durchzuführen gestattet. Diese Methode, zur Zerlegung komplexer γ -Spektren entwickelt^{15,16}, berücksichtigt exakt dem empirisch erhaltenen Transmissions- bzw. Extinktionsverlauf der Elutionspeaks, der von dem reiner Gauss-Peaks oft merklich abweicht. Hiermit können allgemein komplexe Gauss- bzw. Pseudo-Gauss-Peaks unter der Voraussetzung zerlegt werden, dass:

- (1) die Peakstruktur der beiden Einzelpeaks genau bekannt ist,
- (2) eine der beiden Peaklagen x_p^a bzw. x_p^b genau bestimmt werden kann,
- (3) das Intensitätsverhältnis N_p^a / N_p^b innerhalb der Grenzen $16 \geq N_p^a / N_p^b \geq 0.06$ liegt.

Zur Durchführung der quantitativen Bestimmung ist stets eine Kalibrierung der Anordnung unter den jeweiligen Versuchs- bzw. Messbedingungen mit reinen Bezugssubstanzen erforderlich.

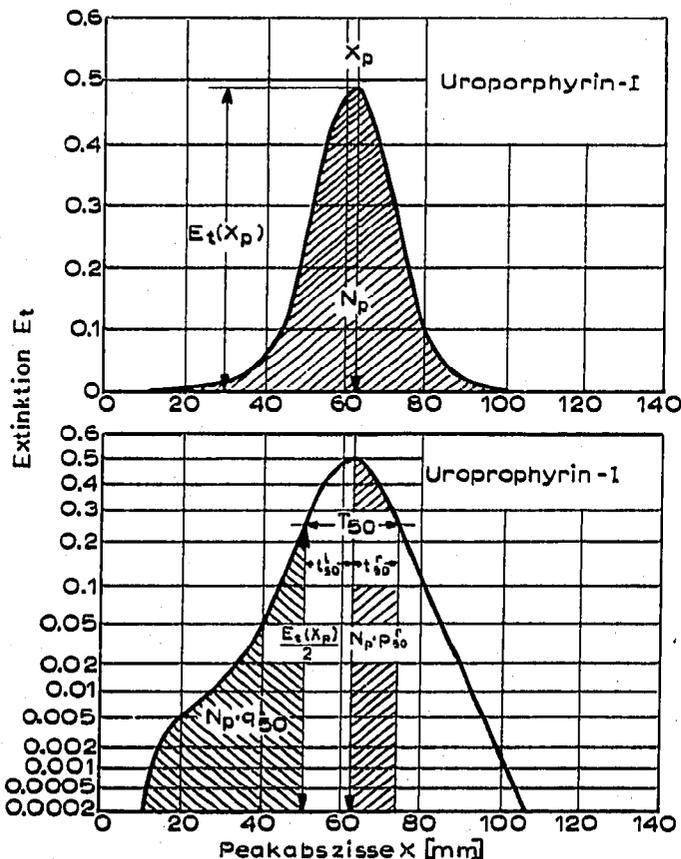


Fig. 6: Auftragung der nach Digitalisierung und Umrechnung erhaltenen Extinktionswerte E_t (Fig. 5) im bilinearen Masstab (obere Darstellung) bzw. im Häufigkeitsnetz (untere Darstellung).

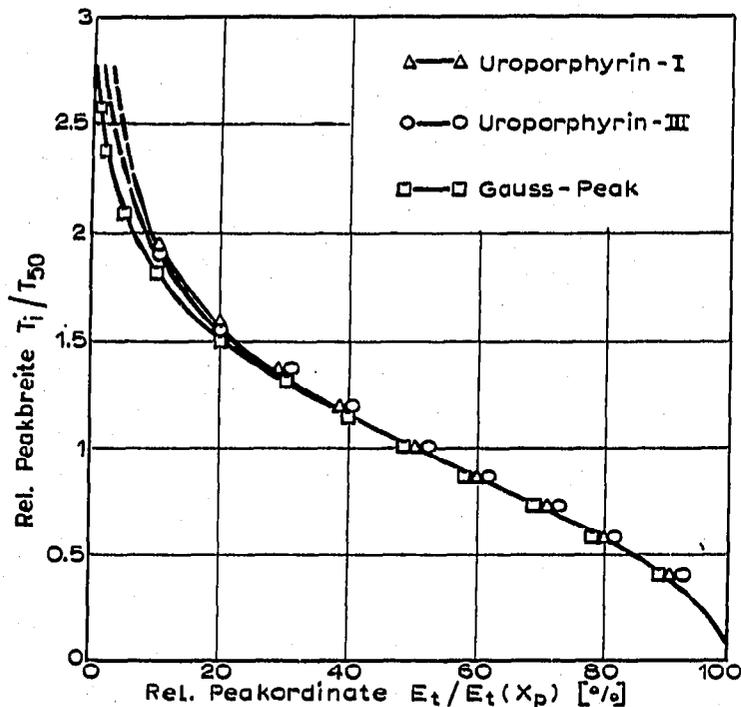


Fig. 7. Verlauf der relativen, auf die Peakhalbwertsbreite T_{50} bezogene Peakbreite T_i/T_{50} in Abhängigkeit von der relativen Peakordinate $E_t/E_t(x_p)$ ($= u_t$) für die beiden Uroporphyrinisomere I und III sowie für reine Gauss-Peaks.

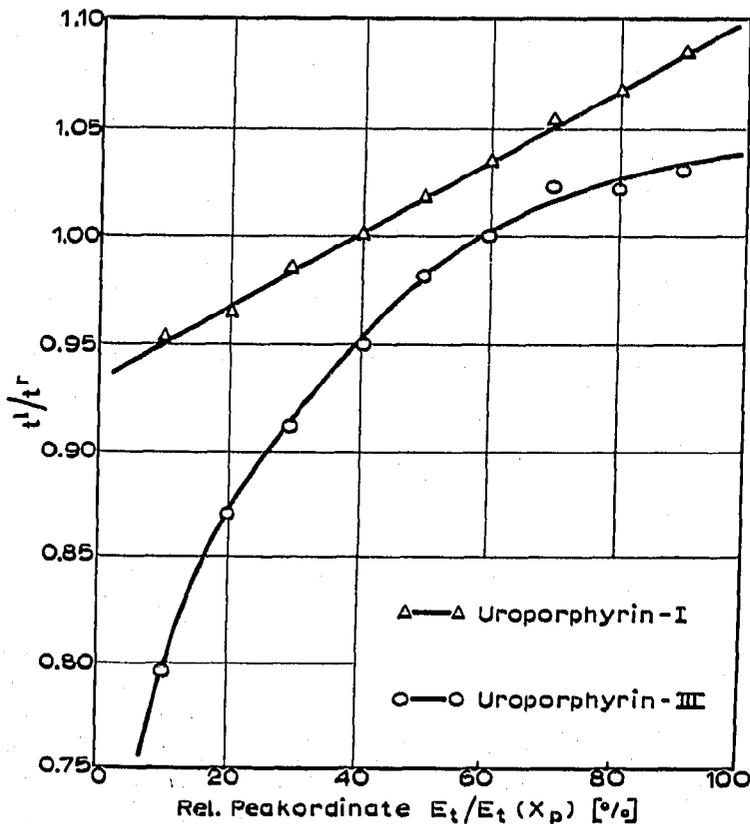


Fig. 8. Verlauf der Quotienten der Peakabszissen t_i^l/t_i^r in Abhängigkeit von der relativen Peakordinate u_t für die beiden Uroporphyrinisomere I und III.

Bei der Ermittlung der Peakflächen N_p^a bzw. N_p^b von zwei sich überlagernden Elutionspeaks wird ein bestimmter Peakabschnitt, der von Anteilen des Nachbarpeaks frei sein muss, ausgewertet. Die zwischen den diesen Abschnitt begrenzenden Peakabszissen t_i^r, l bzw. T_i (Fig. 6) und den Peakteilflächen $N_p \cdot q_i$ bzw. $N_p \cdot p_i$ vorliegende Beziehung ("Peakteilflächenfunktion") kann für reine Gauss'sche Peaks berechnet (Gl. 12, 13) bzw. für Pseudo-Gauss-Peaks empirisch ermittelt werden. Sie gestatten die Umrechnung der Peakteilflächen auf die gesamte Peakfläche N_p .

Für reine, durch die Normalverteilungsfunktion beschreibbare Gauss-Peaks:

$$E_t = \frac{N_p}{\sigma\sqrt{(2\pi)}} \exp\left(-\frac{(x-x_p)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (5a)$$

mit $x-x_p = t$

$$E_t = \frac{N_p}{\sigma\sqrt{(2\pi)}} \exp\left(-\frac{t^2}{2\sigma^2}\right) \quad (5b)$$

lässt sich zeigen, dass zwischen der relativen, auf das Peakmaximum $E_t(x_p)$ bezogenen Peakordinate $E_t/E_t(x_p)$ ($= u_i$) und der auf die Peakbreite bei $\frac{1}{2}E_t(x_p)$ bezogenen relativen Peakabszissen T_i/T_{50} der folgende Zusammenhang besteht^{15, 16}:

$$\frac{T_i}{T_{50}} = \sqrt{\frac{-\ln u_i}{\ln 2}} \quad (6)$$

Eine an unter Versuchsbedingungen erhaltenen Elutionspeaks durchgeführte Analyse der Peakstruktur ergab, dass auch empirische Peaks, unabhängig von der vorliegenden Intensität N_p und Peaklage x_p , durch eine einzige "Peakstrukturfunktion" beschrieben werden können, die alle individuellen Abweichungen von der rein Gauss'schen Peakform erfasst (Fig. 7, Tabelle II). Hierbei wird für UP-I und UP-III, wie nach Fig. 1 zu erwarten, ein unterschiedlicher Verlauf beobachtet. Die zwischen rechter und linker Peakflanke bestehenden Unterschiede bzw. die hierdurch bedingte Peakasymmetrie macht eine Unterscheidung zwischen rechter und linker Peakabszisse, t_i^l und t_i^r , erforderlich. Der Verlauf des Quotienten der Peakabszissen t_i^l/t_i^r ist in Abhängigkeit von der relativen Peakhöhe $E_t/E_t(x_p)$ in Fig. 8 aufgetragen.

Mit den derart empirisch ermittelten Funktionen:

$$\frac{T_i}{T_{50}} = f(u_i) \quad (7)$$

$$\frac{t_i^l}{t_i^r} = f(u_i) \quad (8)$$

kann somit der normierte Verlauf der Elutionspeaks, unabhängig von Intensität und Peaklage, exakt beschrieben werden.

In Analogie zur Normierung der Peakstruktur lässt sich zeigen, dass auch bei der schrittweisen Integration der Elutionspeaks mit den durch die relative Peakhöhe u_i über die entsprechenden Peakabszissen t_i^r, l bestimmten Integrationsgrenzen die erhaltenen Peakteilflächen $N_p \cdot q_i$ bzw. $N_p \cdot p_i$ (Fig. 6) jeweils bestimmten Anteilen der gesamten Peakfläche N_p entsprechen, die erhaltenen p_i - bzw. q_i -Werte somit ebenfalls von N_p , x_p und T_{50} unabhängig sind.

Der Berechnung der Peakflächenabschnitte q_i für reine Gauss-Peaks liegt der folgende Ansatz zugrunde:

$$q_i = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_t^{\infty} \exp\left(-\frac{t^2}{2\sigma^2}\right) dt \quad (9)$$

Durch Einsetzen der Variablen v :

$$v = \frac{t}{\sigma\sqrt{2}}$$

und entsprechende Umformung erhält man bei der von den Flanken zur Peakmitte hin bis zu den jeweiligen relativen Peakordinaten u_i durchgeführten Integration die Peakanteile q_i in der Form:

$$q_i = \frac{1}{2} \left(1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^v \exp(-v^2) dv \right) \quad (10)$$

Zur numerischen Auswertung wird das Fehlerintegral in eine Potenzreihe entwickelt, woraus die gesuchten q_i -Werte durch gliedweise Integration der Reihe erhalten werden:

$$q_i = \frac{1}{2} \left(1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^v \left(1 - \frac{v^2}{1!} + \frac{v^4}{2!} - \frac{v^6}{3!} + \dots + \dots \right) dv \right) \quad (11)$$

Unter Berücksichtigung der Integrationsgrenzen u_i erhält man somit:

$$q_i = \frac{1}{2} \left\{ 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \left[\sqrt{-\ln u_i} - \frac{1}{3} (\sqrt{-\ln u_i})^3 + \frac{1}{10} (\sqrt{-\ln u_i})^5 - \dots \right] \right\} \quad (12)$$

Bei der schrittweisen Integration von der Peakmitte x_p zum Flankenauslauf hin erhält man für die komplementären p_i -Werte den Ausdruck:

$$p_i = \frac{1}{\sqrt{\pi}} \left[\sqrt{-\ln u_i} - \frac{1}{3} (\sqrt{-\ln u_i})^3 + \frac{1}{10} (\sqrt{-\ln u_i})^5 - \dots \right] \quad (13)$$

Eine an 23 Elutionspeaks durchgeführte Auswertung ergab, dass auch bei empirischen Peaks die erhaltenen q_i - bzw. p_i -Werte von T_{50} , σ und N_p unabhängig sind. Die innerhalb enger Grenzen für UP-I und UP-III erhaltenen Funktionen ("Peakteilflächenfunktionen"), die wegen der vorliegenden Peakasymmetrie für die rechte und linke Peakflanke jeweils getrennt ermittelt werden müssen:

$$p_i^l = f(u_i) \quad p_i^r = f(u_i) \quad (14a)$$

$$q_i^l = f(u_i) \quad q_i^r = f(u_i) \quad (14b)$$

sind numerisch ausgewertet nochmals mit den zugehörigen doppelten, mittleren Abweichungen der Mittelwerte (95 %-Fehler) in Tabelle II zusammengestellt.

Zum Vergleich sind in Fig. 9 die für UP-I in der linken Peakflanke erhaltenen Peakflächenabschnitte p_i^l bzw. q_i^l gegen die relativen Peakordinaten u_i aufgetragen und den für eine reine Gauss-Flanke gültigen Werten gegenübergestellt.

Eine Auftragung der Quotienten p_i^l/p_i^r in Abhängigkeit von der relativen Peakhöhe u_i (Fig. 10) bringt die bei beiden Elutionspeaks (UP-I und UP-III) vorliegende Asymmetrie einerseits, sowie die zwischen UP-I und UP-III bestehenden strukturellen Verschiedenheiten andererseits besonders deutlich zum Ausdruck.

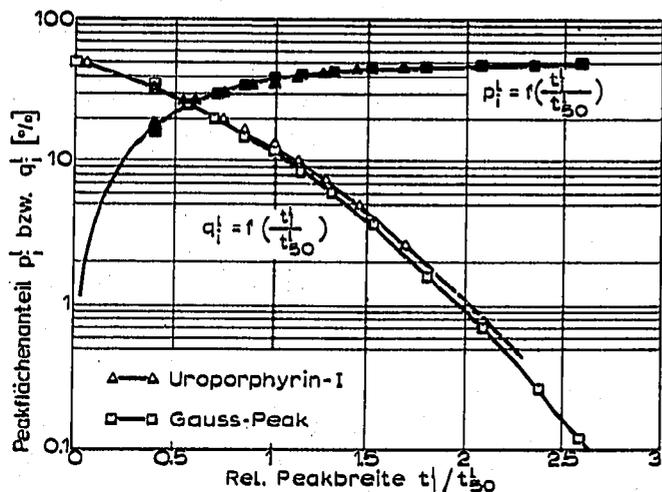


Fig. 9. Abhängigkeit der Peakflächenanteile p_i^l bzw. q_i^l von der relativen Peakbreite t_i^l/t_{50}^l für die linke Flanke von Uroporphyrin-I sowie für einen reinen Gauss-Peak.

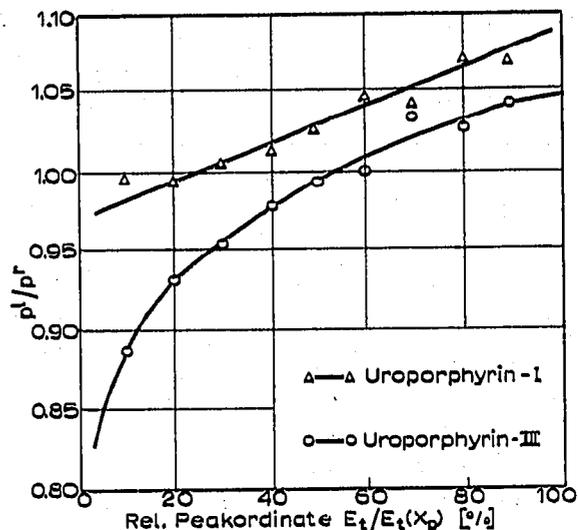


Fig. 10. Verlauf des Quotienten der Peakteilflächenanteile p_i^l/p_i^r in Abhängigkeit von der relativen Peakordinate u_i für die beiden Uroporphyrin-Isomere I und III.

TABELLE II

ZUSAMMENSTELLUNG DER FÜR EINEN REINEN GAUSS-PEAK BZW. EMPIRISCHE ELUTIONSPEAKS VON UROPORPHYRIN-I (OBERE ZEILE) UND UROPORPHYRIN-III (UNTERE ZEILE) FÜR RECHTE (r) UND LINKE (l) PEAKFLANKE ERHALTENEN RELATIVEN PEAKBREITEN (T_i/T_{50})_g BZW. T_i/T_{50} , QUOTIENTEN DER PEAKABSZISSEN t_i^l/t_i^r SOWIE DER PEAKFLÄCHENABSCHNITTE p_i^g BZW. p_i^r UND p_i^l IN ABHÄNGIGKEIT VON DER RELATIVEN PEAKORDINATE u_i

u_i	T_i/T_{50}	$(T_i/T_{50})_g$	t_i^l/t_i^r	p_i^l (%)	p_i^r (%)	p_i^g (%)
0.10	1.927	1.823	0.951 ₆	47.41 ± 0.72	47.59 ± 1.15	48.40
	1.907			45.13 ± 1.03	50.91 ± 1.04	
0.20	1.557	1.523	0.963 ₄	45.03 ± 0.83	45.34 ± 1.02	46.36
	1.550			43.55 ± 0.88	46.79 ± 1.24	
0.30	1.327	1.318	0.984 ₈	42.76 ± 0.93	42.57 ± 0.98	43.96
	1.323			41.58 ± 0.96	43.63 ± 1.37	
0.40	1.154	1.150	0.999 ₁	40.20 ± 1.00	39.67 ± 1.02	41.21
	1.147			39.10 ± 1.06	40.05 ± 1.32	
0.50	1.000	1.000	1.01 ₈	37.33 ± 1.29	36.39 ± 1.05	38.05
	1.000			36.65 ± 0.92	36.99 ± 1.36	
0.60	0.864 ₀	0.8582	1.03 ₃	33.96 ± 1.64	32.54 ± 0.82	34.39
	0.856 ₀			33.38 ± 0.96	33.11 ± 1.29	
0.70	0.731 ₉	0.7170	1.05 ₃	30.39 ± 1.36	29.11 ± 1.25	30.08
	0.716 ₉			29.51 ± 1.04	28.50 ± 1.18	
0.80	0.594 ₂	0.5675	1.06 ₇	25.71 ± 1.30	24.13 ± 1.28	24.80
	0.571 ₃			24.45 ± 1.03	23.81 ± 0.76	
0.90	0.417 ₆	0.3900	1.08 ₆	18.94 ± 1.28	17.77 ± 0.75	17.69
	0.386 ₅			17.34 ± 0.96	16.68 ± 1.07	

Bei der Zerlegung von sich überlagernden Elutionspeaks ist Voraussetzung, dass die Peaklage x_p zumindest eines der beiden Peaks ermittelt werden kann. Eine solche Bestimmung kann mit den an anderer Stelle beschriebenen Methoden, der sog. Differenzen- bzw. Quotientenmethode (Differentiation des normalen bzw. logarithmierten Peakverlaufes), mit der erforderlichen Genauigkeit vorgenommen werden^{15,16}. Die Wahl der Methode hängt u.a. davon ab, welcher Peaklagenabstand $\Delta x_p/\bar{T}_{50}$ und welches Intensitätsverhältnis N_p^a/N_p^b im jeweiligen Falle vorliegt.

Zur Verdeutlichung des Einflusses dieser Parameter sind in Fig. 11 sechs Beispiele von unter Versuchsbedingungen erhaltenen komplexen Elutionspeaks zusammengestellt, die, im Häufigkeitsnetz aufgetragen¹⁵, das Ausmass der Peaküberlappung bei den verschiedenen $\Delta x_p/\bar{T}_{50}$ - bzw. N_p^a/N_p^b -Werten eindrucksvoll zum Ausdruck bringen.

Während eine Bestimmung der Peaklage x_p mit der Differenzenmethode nur in solchen Fällen durchgeführt werden kann, bei denen das auszuwertende Peakmaximum weitgehend frei von Anteilen des Nachbarpeaks ist (Fig. 11: $N_p^a/N_p^b = 1: \Delta x_p/\bar{T}_{50} = 1.5-2.0$; $N_p^a/N_p^b = 10: \Delta x_p/\bar{T}_{50} = 2.0$), kann die Quotientenmethode auch bei komplexen Peakpaaren mit wesentlich kleineren Peaklagenabständen ($\Delta x_p/\bar{T}_{50} \approx 1$) und ungünstigeren Intensitätsverhältnissen ($N_p^a/N_p^b \approx 10$) mit Erfolg eingesetzt werden^{15,16}. Die letztere Methode setzt jedoch, im Gegensatz zur Differenzenmethode, voraus, dass der zur Auswertung gelangende Flankenauslauf exakt durch die Normalverteilungsfunktion beschrieben bzw. im Häufigkeitsnetz

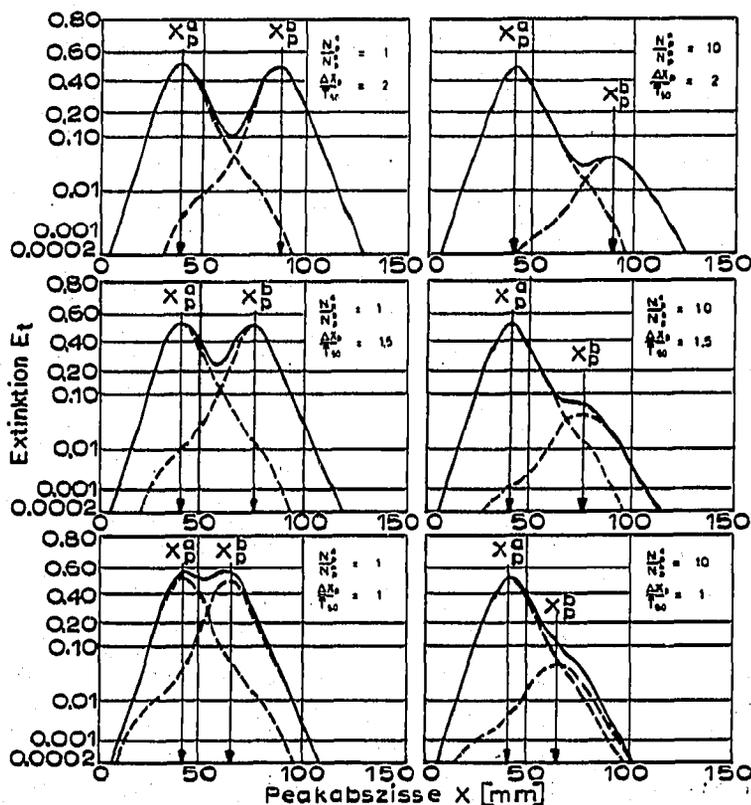


Fig. 11. Zusammenstellung von einigen typischen komplexen Peakpaaren von UP-I/UP-III für verschiedene Peaklagenabstände $\Delta x_p/\bar{T}_{50}$ ($\Delta x_p/\bar{T}_{50} = 1.0, 1.5$ und 2.0) und Mengenverhältnisse UP-III/UP-I (UP-III/UP-I = 1 und 10).

entsprechend korrigiert werden kann. Diese Bedingung ist jedoch im Falle der Elutionspeaks von UP-I und UP-III nicht oder nur in unzureichendem Umfange erfüllt (vgl. Fig. 1, 6, 8, 10), so dass in der vorliegenden Untersuchung lediglich die Differenzenmethode zur Bestimmung der Peaklage x_p zur Anwendung gelangt.

Bei der Ermittlung der Peaklagen mit verschiedenen Methoden ist zu beachten, dass, bedingt durch die den empirischen Peaks meist zugrundeliegende asymmetrische Struktur, zwischen mittlerer (x_p^m) und wahrscheinlicher (x_p) Peaklage unterschieden werden muss. Während bei einer Auswertung im Wahrscheinlichkeitsnetz x_p^m -Werte erhalten werden (Fig. 1), erhält man mit der Quotienten- und Differenzenmethode stets die auf das Peakmaximum bezogenen Werte x_p -Werte.

Bei der quantitativen Bestimmung der beiden Uroporphyrinisiomere I und III wurde wie folgt vorgegangen: Der analog aufgezeichnete Transmissionsverlauf wurde zunächst digitalisiert (Fig. 5) und in die entsprechenden Extinktionswerte E_t umgerechnet. Durch graphische Differentiation des um das Peakmaximum liegenden Extinktionsverlaufes erhält man für $dE_t/dx = 0$ die gesuchte Peaklage x_p mit hoher Genauigkeit^{3, 15, 16}. Da bei konstanten Versuchsbedingungen die Halbwertsbreite T_{50} mit Bezugssubstanzen leicht ermittelt, bzw. bei variablen Versuchsbedingungen die zwischen x_p und T_{50} bestehende Abhängigkeit ebenfalls mit reinem UP-I und UP-III auf einfache Weise erhalten werden kann, lässt sich somit aus der Peaklage x_p , der Halbwertsbreite T_{50} und den empirisch ermittelten Peakstrukturfunktionen (Gl. 7, 8) der Peakverlauf bei Proben unbekannter Zusammensetzung exakt darstellen.

Die erhaltenen E_t -Werte werden nun im Häufigkeitsnetz aufgetragen und über das Peakmaximum hinausgehend fortlaufend summiert (Fig. 12). Hierbei ist zu beachten, dass die einzelnen Werte die Mitte der bei der Digitalisierung erhaltenen jeweiligen Kanäle bzw. Klassen darstellen, deren Bereich durch die folgenden Grenzen $t \pm 1/2$ bzw. $x \pm 1/2$ festgelegt ist.

Aus den empirisch ermittelten Beziehungen (Gl. 7, 8) erhält man die Peakabszissen t_i^r , die den jeweiligen relativen Peakordinaten u_i in der rechten Peakflanke von UP-I entsprechen. Diese (t_i^r) stellen nun wiederum auf der in der gleichen Dar-

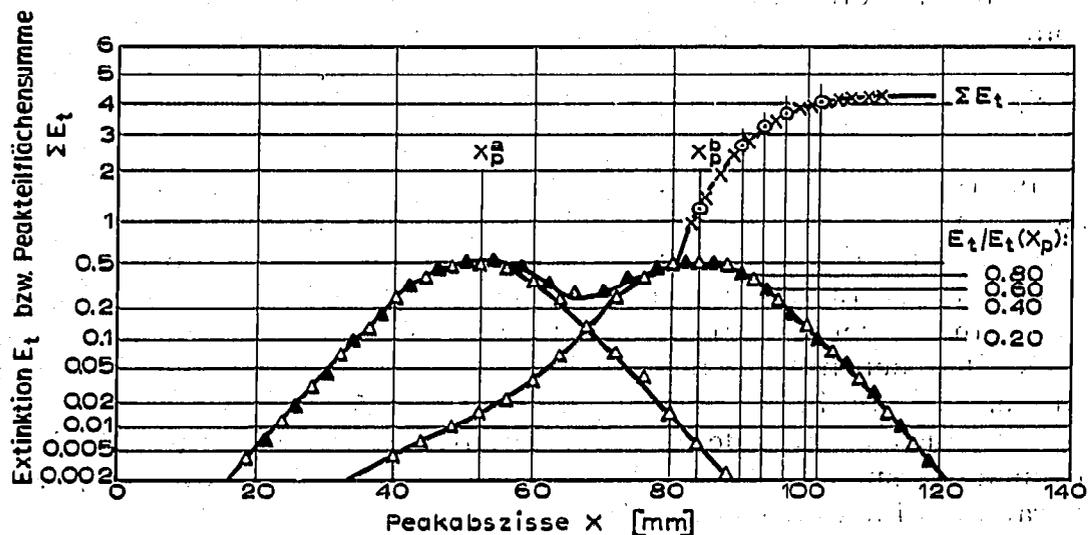


Fig. 12. Bestimmung der Fläche von Peak b (UP-I) über eine Ermittlung der Peakteilflächen $N_p^b \cdot p_i^b$ bei verschiedenen relativen Peakordinaten u_i bzw. den entsprechenden Peakabszissen t_i^r/t_{50}^r .

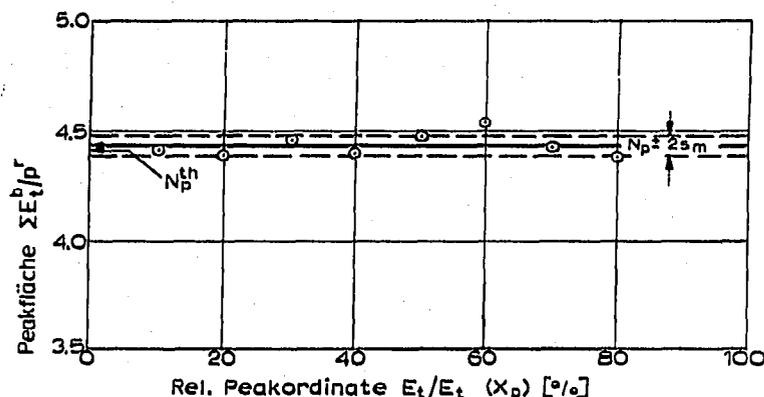


Fig. 13. Ermittlung der Peakfläche N_p^b durch Extrapolation der bei verschiedenen Peakordinaten u_i erhaltenen Werte (Fig. 12) auf $u_i = 0$.

stellung eingezeichneten Summenkurve ΣE_t die Integrationsgrenzen dar, die Peakteilflächen $N_p^b \cdot p_i^r$, die ihrerseits über die Peakstrukturfunktion (Gl. 14a) mit der gesamten Peakfläche N_p^b in einem bekannten Verhältnis p_i^r stehen, einschließen. Aus den bei beliebigen u_i - bzw. t_i^r -Werten erhaltenen Peakteilflächen $\Sigma E_{t,i}$ kann somit mit den zugehörigen p_i^r -Werten die Peakfläche N_p^b über die Definitionsgleichung:

$$N_p^b = \frac{\Sigma E_{t,i}}{p_i^r} \quad (16)$$

berechnet werden. Diese Form der Bestimmung von N_p^b schließt Auswertefehler weitgehend aus und gestattet, die Peakfläche innerhalb einer relativ kleinen Fehler-spanne festzulegen. Eine Auftragung der bei verschiedenen relativen Peakordinaten u_i erhaltenen N_p^b -Werte (Fig. 13), die bei der Auswertung einer reinen Peakflanke eine der Abszisse parallel laufende Gerade ergibt, erlaubt Rückschlüsse auf ev. vorhandene bzw. nicht korrigierte Anteile der Nachbarpeaks^{15,16}.

In analoger Weise kann grundsätzlich die Bestimmung der Peakfläche von Peak a, N_p^a , vorgenommen werden. Diese kann jedoch in einfacherer Weise aus der Peakfläche des komplexen Peakpaares N_p^c und dem ermittelten N_p^b -Wert nach:

$$N_p^c = N_p^a + N_p^b \quad (17)$$

erhalten werden.

Die quantitative Bestimmung der Porphyrine über eine Auswertung der Fläche der Elutionspeaks ist in der beschriebenen Weise noch recht aufwendig. Bei Verwendung eines Transmissions-Extinktionswandlers, der bei der Durchführung dieser Untersuchungen nicht zur Verfügung stand, kann der zur Auswertung erforderliche Zeitaufwand jedoch ganz wesentlich reduziert werden, besonders dann, wenn die Ermittlung der Peakteilflächen mit einem Disc-Integrator vorgenommen wird. Über diese Form der Auswertung von in Transmissionseinheiten aufgezeichneten Elutionspeaks wurde bereits ausführlich an anderer Stelle berichtet¹³. Die geplante Erweiterung der beschriebenen Versuchsanordnung¹⁴ gestattet auch die Auswertung von Elutionschromatogrammen im Routinebetrieb.

Zur Prüfung der unter Versuchsbedingungen erreichbaren Empfindlichkeit und Genauigkeit wurden Mischungen der beiden Uroporphyrinisomere in bekannter Zusammensetzung unter geeigneten Versuchsbedingungen aufgetrennt und hierbei

jeweils UP-I in der beschriebenen Weise quantitativ bestimmt. Während der UP-III-Anteil jeweils konstant ($m_{\text{vorg.}} = 28.7 \mu\text{g}$) blieb, variierte die UP-I-Menge im Bereich von $1.73\text{--}27.6 \mu\text{g}$. Die zwischen der vorgegebenen UP-I-Menge $m_{\text{vorg.}}$ und der Fläche der Elutionspeaks N_p erhaltene Abhängigkeit ist in Fig. 14 dargestellt. Aus dieser Auftragung geht hervor, dass bei einem Peaklagenabstand von $\Delta x_p/\bar{T}_{50} \cong 2$ eine Bestimmung der beiden Isomere noch durchgeführt werden kann, selbst wenn das Isomerenverhältnis UP-III/UP-I = 16 beträgt. Die untere Grenze, bei der unter den vorliegenden Versuchsbedingungen eine Bestimmung noch möglich ist, wird bei ca. $1 \mu\text{g}$ angenommen. Die in Fig. 14 ebenfalls eingezeichneten spezifischen Extinktionsflächen $N_p/m_{\text{vorg.}}$, die mit den der reinen Substanz innerhalb der Fehlerspanne

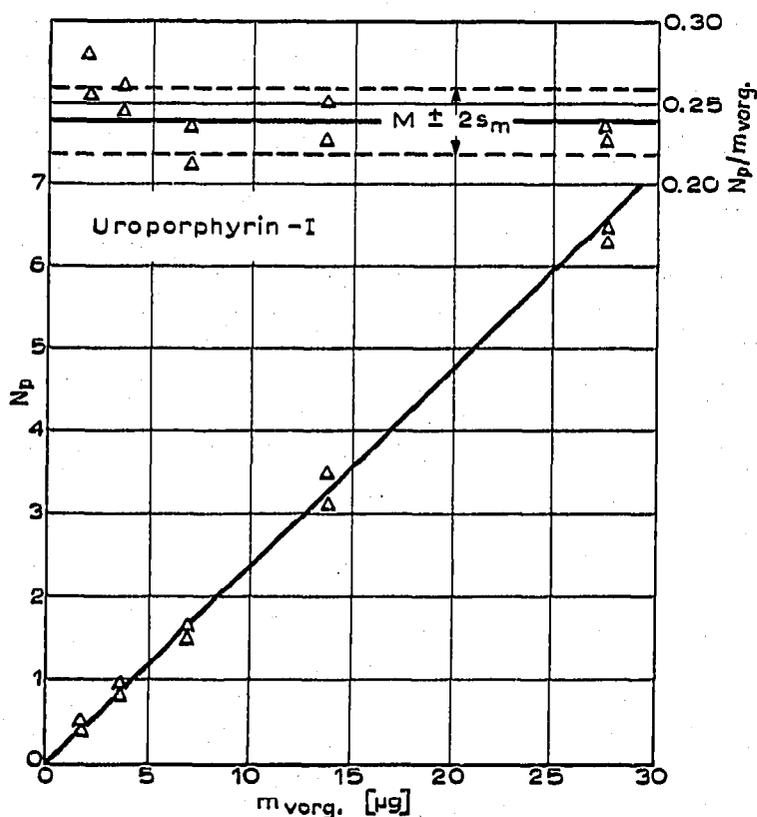


Fig. 14. Quantitative Bestimmung von Uroporphyrin-I im Bereich von $1.73\text{--}27.6 \mu\text{g}$ neben einer konstanten Menge Uroporphyrin-III ($m_{\text{vorg.}} = 28.7 \mu\text{g}$) bei einem Peaklagenabstand von $\Delta x_p/\bar{T}_{50} \approx 2$.

übereinstimmen, zeigen, dass bei dieser Bestimmung in dem untersuchten Bereich ($m_{\text{vorg.}} = 1.73\text{--}27.6 \mu\text{g}$) mit einer Fehlerschwankung von ca. $\pm 10\%$ (95 %-Fehler) gerechnet werden muss. Dies ist eine zur Sicherung klinischer Befunde völlig ausreichende Genauigkeit.

Bei der Auftrennung und Bestimmung der Porphyrine in der beschriebenen Weise sind Verluste in merklichem Umfange nicht zu befürchten. So lag der unter extremen Versuchsbedingungen erhaltene Rückgewinn R ($R = m_{\text{vorg.}}/m_{\text{gew.}}$) für Coproporphyrin und Uroporphyrin bei $R = (99 \pm 5)\%$ ¹³.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Analyse komplexer Porphyringemische, insbesondere zur Bestimmung der Uroporphyrinisomere I und III, wird ein extraktionschromatographisches Verfahren beschrieben, das Trennung und quantitative Bestimmung der in freier Form vorliegenden Hämpräkursoren in einem Arbeitsgang durchzuführen gestattet. Die Auftrennung wird im Verteilungssystem Tri-*n*-butylphosphat/1 *N* Salzsäure auf Säulen hoher Bodenzahl ($N = 300-450$) vorgenommen. Unter den angegebenen Versuchsbedingungen (Säulentemperatur: $T_s = 15-30^\circ$; Säulenlänge: $L_s = 120$ cm; Säurekonzentration: $c_{\text{HCl}} = 1$ *N*) können die beiden Isomere in einem Zeitraum von 20-30 h nahezu völlig aufgetrennt werden.

Zur quantitativen Bestimmung von Uroporphyrin-I, III wird der Verlauf der simultan registrierten Transmission der eine Durchflussküvette passierenden Elutionslösung ausgewertet. Nach Digitalisierung der aufgezeichneten Elutionspeaks und Umrechnung in die entsprechenden Extinktionswerte wird aus der Fläche der einzelnen Peaks, nach vorangegangener Eichung der Versuchsanordnung mit reinen Bezugssubstanzen, die in der Probe vorliegende Porphyrinmenge erhalten.

Die zur vollständigen Auftrennung erforderlichen, beträchtlichen Elutionszeiten können, durch Variation der Versuchsbedingungen, erheblich reduziert werden, falls die Zerlegung der unter diesen Bedingungen komplexen Elutionspeaks mit dem beschriebenen Auswerteverfahren vorgenommen wird. Hierbei können Peaks bei einem Peaklagenabstand von $\Delta x_p/\bar{T}_{60} = 1.5-2.0$ (je nach Mengenverhältnis) noch mit ausreichender Genauigkeit ausgewertet werden. Eine Bestimmung der Uroporphyrinisomere I und III ist bei einem Mengenverhältnis von $0.06 \leq \text{UP-I/UP-III} \leq 16$ bis ca. 1 μg mit einer Genauigkeit von ca. 10 % (95 %-Fehler) möglich. Verluste an Porphyrinen sind bei Auftrennung und Bestimmung selbst unter extremen Versuchsbedingungen in merklichem Umfange nicht zu befürchten.

LITERATUR

- 1 L. ERIKSEN, *Scand. J. Clin. Invest.*, 10 (1958) 319.
- 2 J. JENSEN, *J. Chromatog.*, 10 (1963) 236.
- 3 H. MUNDSCHENK, *J. Chromatog.*, 25 (1966) 380.
- 4 T. C. CHU, A. A. GREEN AND E. J.-H. CHU, *J. Biol. Chem.*, 190 (1951) 643.
- 5 P. A. D. CORNFORD AND A. BENSON, *J. Chromatog.*, 10 (1963) 141.
- 6 T. C. CHU AND E. J.-H. CHU, *J. Biol. Chem.*, 227 (1957) 505.
- 7 L. BOGORAD AND G. S. MARKS, *Biochim. Biophys. Acta*, 41 (1960) 356.
- 8 J. E. FALK AND A. BENSON, *Biochem. J.*, 55 (1953) 101.
- 9 A. M. DEL C. BÄTTLER AND A. BENSON, *J. Chromatog.*, 25 (1966) 117.
- 10 P. R. EDMONDSON AND S. SCHWARTZ, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 605.
- 11 R. E. H. NICHOLAS AND C. RIMINGTON, *Biochem. J.*, 55 (1953) 109.
- 12 H. MUNDSCHENK, *Z. Anal. Chem.*, 233 (1968) 25.
- 13 H. MUNDSCHENK, *Z. Anal. Chem.*, im Druck.
- 14 H. MUNDSCHENK, *J. Chromatog.*, 38 (1968) im Druck.
- 15 H. MUNDSCHENK, *Nucl. Instr. and Methods*, 44 (1966) 325; 45 (1966) 77, 261.
- 16 H. MUNDSCHENK, *Intern. J. Appl. Radiation Isotopes*, 18 (1967) 365.
- 17 E. GLUECKAUF, *Trans. Faraday Soc.*, 51 (1955) 34.