

CHROM. 3733

ZUR TRENNUNG UND IDENTIFIKATION DER FREIEN PORPHYRINE
UND DEREN ISOMERE

H. MUNDSCHENK

I. Medizinische Klinik und Poliklinik der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz (Deutschland)

(Eingegangen am 1. Juli 1968)

SUMMARY

Separation and identification of free porphyrins and their isomers

Complex porphyrin mixtures can be analyzed by means of extraction chromatography combined with thin-layer chromatographic and absorption spectrophotometric measurements. The fractions obtained in the partition system (tri-*n*-butyl phosphate/hydrochloric acid) may be identified as regards the number of carboxylic groups *n* by determining the peak position of the Soret band (λ_p) using the correlation between *n* and λ_p . The isomeric structure of the porphyrins can be established by thin-layer chromatography with 2,6-lutidine/water of the corresponding coproporphyrin derivatives obtained by decarboxylation.

Using the methods described, nearly all porphyrin compounds in the reaction chain from uroporphyrin to coproporphyrin of the isomeric series I and III could be identified in a porphyrin sample isolated from the urine of a patient with a hyporegenerative anaemia. Furthermore, several fractions were observed after the extraction and thin-layer chromatographic separations which could not be related to the porphyrins of the isomeric types I and III normally found in porphyrin samples isolated from urine. This was proved by the fact that the λ_p values of the single fractions did not agree with the expected values. Therefore, it was assumed that these compounds, belonging to the isomeric series I and III, differ from the normal porphyrins by their substituents. However, further investigations are still necessary to elucidate the structure and determine the assumed substituents of the isolated porphyrins. There is no evidence that porphyrins of the isomeric types II and IV occur in the porphyrin mixture studied.

EINLEITUNG

Die Biosynthese des dem Häm vorausgehenden Protoporphyrins verläuft, von Bernsteinsäure und Glycin ausgehend, über zahlreiche Reaktionsstufen, die, durch ein komplexes enzymatisches System gesteuert, miteinander in einem stationären Gleichgewicht stehen. Abweichungen von dem in Normalfällen zu beobachtenden Hämpräkursorenmuster erlauben oft wertvolle Rückschlüsse auf die in dem jeweiligen

Fälle vorliegende Hämsynthesestörung. Besondere Beachtung bei klinischen Betrachtungen erlangte die Bestimmung der auf natürlichem Wege ausgeschiedenen dominierenden Porphyrine, Uroporphyrin und Coproporphyrin, während die partiell decarboxylierten Zwischenglieder (Hepta-, Hexa- und Pentacarboxylporphyrine) hierbei, von Ausnahmen abgesehen, bisher keine Rolle spielten.

Die analytische Erfassung dieser Glieder der Porphyrinkette kann mit den derzeit bekannten papierchromatographischen^{1,2}, säulenchromatographischen³, hochspannungselektrophoretischen⁴ und dünnschichtchromatographischen⁵⁻⁷ Verfahren durchgeführt werden, die das durch die variierende Anzahl der Carboxylgruppen der Porphyrinmolekel bestimmte abgestufte Verhalten zur Auftrennung ausnutzen. Eine entscheidende Einschränkung in der Anwendung erfahren diese Methoden dadurch, dass lediglich Gemische von Porphyrinen des gleichen Isomerentyps analysiert werden können. Treten dagegen, wie in pathologischen Fällen fast stets zu beobachten, Porphyrine der verschiedenen Isomerenreihen, vorwiegend vom Typ I und III, auf, so ist eine eindeutige Zuordnung nicht mehr möglich. Zu ihrer Identifikation müssen daher weitergehende Untersuchungen durchgeführt werden, die eine Bestimmung des Isomerentyps der einzelnen Porphyrine gestatten.

In der vorliegenden Untersuchung wird über eine Zerlegung eines aus dem Urin einer hyporegenerativen Anämie (Patient U.) isolierten ausserordentlich komplexen Porphyringemisches berichtet, wobei zur Identifikation der einzelnen Fraktionen die folgenden Untersuchungen herangezogen wurden:

(1) Extraktionschromatographische Auftrennung der freien Porphyrine und Identifikation der einzelnen Fraktionen über eine Bestimmung der Peaklage λ_p der Soretbande.

(2) Dünnschichtchromatographische Trennung der extraktionschromatographisch erhaltenen Fraktionen, vor und nach der Decarboxylierung.

(3) Versuche zur Identifikation einzelner Porphyrine über deren I.R.-Spektren.

Über weitere analytische Aspekte bei der Auftrennung des gleichen Porphyringemisches wurde bereits ausführlich an anderer Stelle berichtet⁸⁻¹⁰.

EXPERIMENTELLER TEIL

Material

Uroporphyrin-I (UP-I). Uroporphyrin-I wurde als Oktamethylester von den Koch-Light Laboratories, Colnbrook, England, bezogen. Nach dem Verseifen in 5 N HCl wurde der Hämpräkursor dünnschichtchromatographisch im 2,6-Lutidin/Wasser-System⁶ gereinigt, mit 1 N HCl eluiert und anschliessend aus schwach salzsaurer Lösung ($c_{\text{HCl}} = 0.01-0.1 \text{ N}$) mit Tri-*n*-butylphosphat (TBP) extrahiert. Hieraus wurde UP-I mit 5 N HCl rückextrahiert. Die in der wässrigen Phase verbleibenden geringfügigen TBP-Reste wurden durch mehrmaliges, sukzessives Auswaschen mit Benzol p.A. ($5 \times 5 \text{ ml}$) vollständig entfernt. Verluste an UP-I sind unter diesen Bedingungen nicht zu befürchten. Die zu den einzelnen Untersuchungen eingesetzte salzsaure Stammlösung enthielt den Hämpräkursor in einer Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ 5 N HCl. Alle Pipettierungen wurden mit einer Aglaspritze vorgenommen, die bei quantitativem Arbeiten ein genaues Dosieren gestattet. Die eingesetzte Stammlösung zeigte, im Kühlschrank bei 4° aufbewahrt, selbst im Verlauf von mehreren Wochen keinerlei Zersetzung.

Uroporphyrin-III (UP-III). Dieses Uroporphyrinisomer wurde ebenfalls in Esterform von den Koch-Light Laboratories, Colnbrook, England, bezogen ("Ex turaco feathers"). Die Reinigung und Aufarbeitung erfolgte wie vorangehend für UP-I beschrieben. Die salzsaure Stammlösung enthielt das Porphyrin in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ 5 N HCl.

Coproporphyrin-I (CP-I). Zur Herstellung von CP-I wurde UP-I nach der Methode von EDMONDSON UND SCHWARTZ¹¹ decarboxyliert. Die Aufarbeitung wurde, wie nachstehend unter Methoden beschrieben, vorgenommen. Die CP-I-Lösungen wurden mit einer Konzentration von 20–50 $\mu\text{g/ml}$ 5 N HCl (je nach Präparation) zu den Untersuchungen eingesetzt.

Coproporphyrin-III (CP-III). CP-III wurde, analog wie CP-I, aus UP-III durch Decarboxylierung¹¹ erhalten. Die Aufarbeitung und Herstellung der Stammlösung wurde wie bei CP-I vorgenommen.

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

Tri-n-butylphosphat (TBP). TBP wurde durch den Handel bezogen (Hersteller: Fa. E. Merck, Darmstadt; Kat.-Nr. 8354) und ohne zusätzliche Reinigung zu den Untersuchungen eingesetzt.

Polytrifluoromonochloräthylen (Hostafon C 2). Zur Aufnahme des Extraktionsmittels TBP wurde Hostafon C 2 (Hersteller: Farbwerke Höchst AG, Frankfurt/Main) verwendet. Hierzu wurde die bei Aufarbeitung des in Pulverform vorliegenden Produktes erhaltene Siebfraction mit einer Korngrösse von 50–100 μ eingesetzt. Bei der Imprägnierung wurde TBP tropfenweise unter intensivem Rühren in einem Gewichtsverhältnis von Hostafon C 2 : TBP = 2 : 1 zugegeben.

Salzsäure p.A. Zur Elution wurden aus Titrisolkonzentraten (Hersteller: Fa. E. Merck, Darmstadt; Kat.-Nr. 9970/0001) angesetzte Lösungen von 1 N HCl verwendet, die in heissem Zustand mit TBP bis zur Sättigung geschüttelt wurden. Die Elutionslösung wurde vor jedem Versuch zur Entgasung für ca. 30 min ausgekocht.

Methoden

Decarboxylierung der Porphyrine. Zur Identifikation der extraktionschromatographisch erhaltenen Fraktionen bezüglich des Isomerentyps werden diese durch Decarboxylierung in die entsprechenden Coproporphyrinderivate überführt. Diese werden, zusammen mit den reinen Bezugssubstanzen CP-I und CP-III, dünnschichtchromatographisch im 2,6-Lutidin/Wasser-System⁶ entwickelt und anhand der R_F -Werte identifiziert.

Hierzu werden, nach der Methode von EDMONDSON UND SCHWARTZ¹¹, 3 ml der salzsauren Porphyrinlösung ($c_{\text{HCl}} = 0.3 \text{ N}$) in Duranglasröhrchen (Länge: 150 mm; Innerer Durchmesser: 10 mm; Wandstärke: 1 mm) bei einem Druck von $p \leq 1$ Torr (Gasballastpumpe) eingeschmolzen und bei 200° für 4 h im Trockenschrank decarboxyliert. Die entstandenen Reaktionsprodukte werden anschliessend, nach Einstellen der Lösung auf eine Säurekonzentration von $c_{\text{HCl}} = 0.01\text{--}0.1 \text{ N}$ mit 1 N NaOH, mit 1 ml TBP extrahiert. Hieraus erfolgt Rückextraktion mit 0.1–0.2 ml 5 N HCl. Die organische Phase wird daraufhin in 5 ml Benzol aufgenommen, und, nach dem Zentrifugieren, abpipettiert. Die wässrige Phase wird anschliessend nochmals sukzessive mit 4 \times 5 ml Benzol ausgewaschen, um anhaftende TBP-Reste vollständig zu entfernen. Die Lösung wird in dieser Form zu den DC-Trennungen eingesetzt.

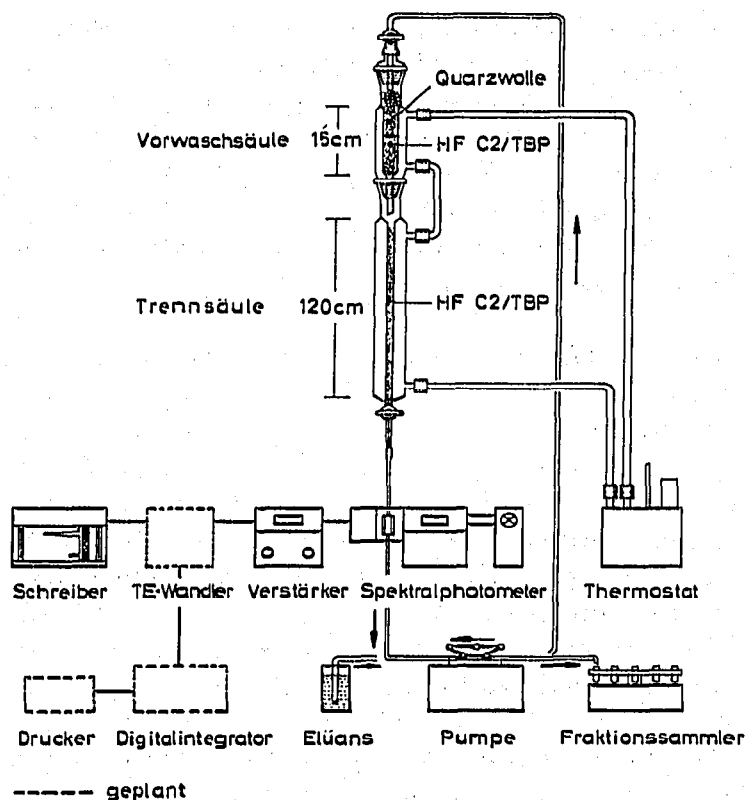


Fig. 1. Apparatur zur extraktionschromatographischen Auftrennung komplexer Porphyringemische mit simultaner quantitativer Bestimmung der einzelnen Fraktionen.

Extraktionschromatographische Auftrennung der freien Porphyrine im TBP/HCl-System. Die zur Durchführung dieser Untersuchungen verwendete, weitgehend automatisierte Apparatur ist in Fig. 1 dargestellt^{9,10}. Hauptteil dieser Anordnung ist die eigentliche Trennkolonne (Länge: $L_s = 120$ cm; Innerer Durchmesser: $D_s = 5$ mm), die zusammen mit der Vorwaschkolonne (Länge: $L_{vs} = 15$ cm; Innerer Durchmesser: $D_{vs} = 15$ mm) durch einen Ultrathermostaten (Hersteller: Fa. Gebr. Haake KG, Berlin) auf die gewünschte Versuchstemperatur T_s gehalten wird. Beide Säulen wurden mit dem gleichen Füllmaterial (Hostafion C 2/TBP) beschickt. Die Vorwaschsäule hat hierbei die Aufgabe, das in die Trennsäule eintretende Elutionsmittel mit TBP abzusättigen. Hierdurch können Auswaschverluste sowie die meist sehr störende Blasenbildung in der eigentlichen Trennkolonne selbst bei extremen Versuchsbedingungen ($T_s = 60^\circ$; $c_{\text{HCl}} = 3$ N) weitgehend ausgeschaltet werden. Die Elutionslösung wurde über eine Proportionierpumpe (Lieferfirma: Technicon GmbH, Frankfurt/Main) sowohl in die Vorwaschsäule unter leichtem Überdruck eingedrückt, als auch von der Trennsäule bei gleichem Schlauchdurchmesser abgesaugt. Hierdurch wird das Auftreten eines Druck- bzw. Soggradienten innerhalb der Trennsäule weitgehend ausgeschaltet, so dass eine bessere Konstanz des Durchflusses im Vergleich zu der an anderer Stelle beschriebenen Anordnung⁹ erreicht wird. Die aus der Trennsäule austretende Elutionslösung wird durch eine Durchflussküvette (1 cm MT 4 D, Hersteller: Fa. C. Zeiss, Oberkochen) geleitet, wo kontinuierlich die Transmission der Lösung bei $\lambda_{\text{gem.}} = 403$ nm gemessen (Zeiss Spektralphotometer PMQ II mit Monochromator M 4 Q III) und mit einem Potentiometerschreiber (Servo/Riter II, Texas

Instruments, Houston, U.S.A.) registriert wird. Die einzelnen Fraktionen werden in einem zeitgesteuerten Fraktionssammler aufgefangen und können für weitere Untersuchungen (Bestimmung der Peaklage der Soretbande λ_p ; Aufnahme von I.R.-Spektren, u.a.) wieder eingesetzt werden. Eine quantitative Bestimmung der in der Probe vorliegenden Porphyrinmenge kann über eine Auswertung des durch den Potentiometerschreiber registrierten Transmissions- bzw. Extinktionsverlaufes durchgeführt werden¹⁰. Von der geplanten Erweiterung der Versuchsanordnung (Fig. 1) wird eine beträchtliche Reduzierung des derzeit noch erforderlichen Zeitaufwandes bei der quantitativen Auswertung erwartet¹⁰.

Zur Isolierung und Auftrennung von im Urin auftretenden Porphyringemischen wird wie folgt vorgegangen: Der schwach salzsaure Urin (pH 1–3) wird bei einem Volumen von 20–200 ml (je nach Porphyrinkonzentration) mit 1–10 g imprägniertes Filterbodenmaterial (Kieselgel: TBP = 2 : 1) versetzt, kurz geschüttelt und anschliessend über eine Glasnutsche (Porenweite: G 2; Durchmesser: 50–100 mm) gesaugt. Das Filtrat wird stets noch ein- bis zweimal über den gleichen Filterboden gegeben. Anschliessend wird mit 0.01–0.1 N HCl gründlich nachgewaschen. Die durch den Filterboden extrahierten Porphyrine werden nun mit 3 × 3 ml 5 N HCl sukzessive eluiert, die Lösungen in ein 20 ml Messkölbchen überführt und mit Aqua dest. bis zur Marke aufgefüllt. Ein Aliquot hiervon wird, nach Einstellen der Azidität auf eine Säurekonzentration $c_{\text{HCl}} = 0.01\text{--}0.1\text{ N}$ mit 1 N NaOH, zur Auftrennung der Porphyrine auf der Säule eingesetzt. Hierzu wird die Lösung in den Vorraum der Trennsäule eingefüllt. Bei kleinem Durchfluss ($D = 10\text{ ml/h}$) erfolgt hierbei vollständige Absorption der Porphyrine in der obersten Schicht des Füllmaterials ($K_{\text{DB}} \geq 1000$ (refs. 9, 10)), deren Höhe, je nach der vorliegenden Porphyrinmenge, 1–10 mm beträgt. Anschliessend wird mit 5–10 ml 0.1 N HCl nachgewaschen, die Vorwaschsäule, die mit dem Elutionsmittel (1 N HCl) bis zum Ausgang gefüllt ist, aufgesetzt und die Elution durch Einschalten der Pumpe eingeleitet.

Dünnschichtchromatographische Trennung der freien Porphyrine im 2,6-Lutidin/Wasser-System. Die zur Identifikation der einzelnen Porphyrine durchgeführten dünn-schichtchromatographischen Trennungen wurden nach einer an anderer Stelle beschriebenen Methode⁶ vorgenommen. Hierzu wurden bei 120° für 2 h aktivierte Kieselgelschichten eingesetzt. Als Fließmittel wird ein Gemisch von 2,6-Lutidin-Wasser (5 : 3) verwendet, das mit Ammoniak (Einstellen von 100 ml konz. Ammoniaklösung in die Trennkammer) gut vorzusättigen ist. Die Menge der einzelnen, von der Säule eluierten Fraktionen lag zwischen 1–50 μg . Die Aufarbeitung und Überführung in kleinste Lösungsvolumina (20–200 μl) setzt die Anwendung der in der Mikroanalyse üblichen Techniken voraus (Pipettierungen mit ausgezogenen Teflonspitzen; Zentrifugieren in speziellen Mikroröhrchen; etc.). Porphyrinmengen von ca. 1 μg waren ausreichend, um die zur Identifikation erforderlichen Untersuchungen:

- (1) DC-Trennung und Bestimmung der Peaklage λ_p vor der Decarboxylierung,
 - (2) Decarboxylierung,
 - (3) DC-Trennung und Bestimmung der Peaklage λ_p nach der Decarboxylierung,
- durchführen zu können.

Bestimmung der Peaklage λ_p der Soretbande der Porphyrinfraktionen, vor und nach der Decarboxylierung. Zur weiteren Charakterisierung der bei der extraktionschromatographischen Trennung erhaltenen Porphyrinfraktionen wird eine Bestimmung der Peaklage der Soretbande λ_p vorgenommen (Fig. 2). Hierzu wird der Ab-

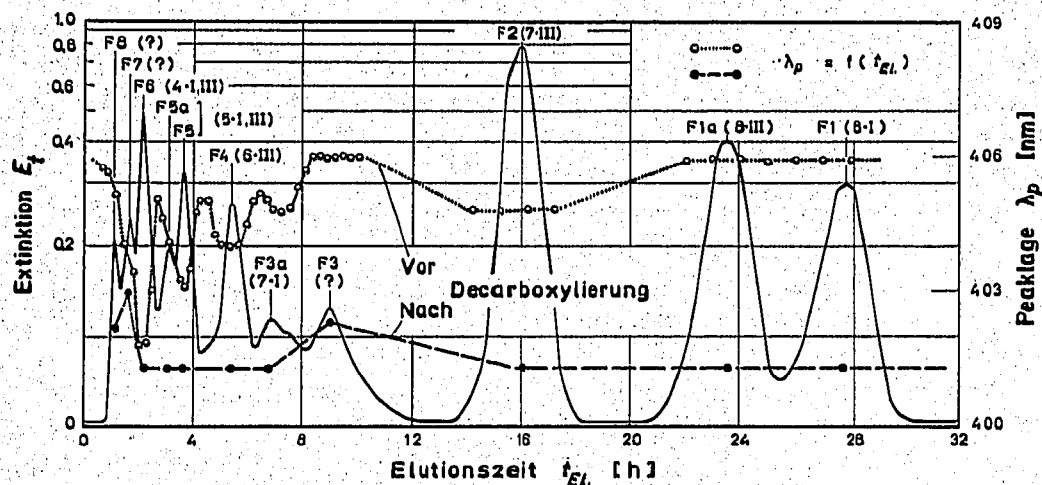


Fig. 2. Elutionschromatogramm des aus dem Urin von Patient U. isolierten Porphyringemisches, aufgenommen mit der beschriebenen Apparatur (Fig. 1). Versuchsbedingungen: Säulentemperatur: $T_s = 20^\circ$; Säulenlänge: $L_s = 120$ cm; Durchfluss: $D = 20$ ml/h; Säurekonzentration: $c_{\text{HCl}} = 1$ N; Messwellenlänge: $\lambda_{\text{gem.}} = 403$ nm. Die Peaklage λ_p der in den verschiedenen Fraktionen aufgefangenen Porphyrine wurde vor ($\lambda_p = f(t_{\text{El.}})$: vor Decarboxylierung) und nach ($\lambda_p = f(t_{\text{El.}})$: nach Decarboxylierung) der Überführung in die entsprechenden Coproporphyrinderivate durch Decarboxylierung bestimmt.

sorptionsverlauf der salzsauren Porphyrinlösung ($c_{\text{HCl}} = 1$ N) im Bereich von 380–450 nm bei kleiner Spaltbreite gemessen. Durch graphische Differentiation der Soretbande im Bereich von 390–410 nm (refs. 6, 12, 13) wird λ_p mit hoher Genauigkeit erhalten. Zur Durchführung der Bestimmung werden, dank der hohen Empfindlichkeit des Porphyrinnachweises, Mengen von min. $0.2 \mu\text{g}$ (!) benötigt, um λ_p auf ± 0.1 nm genau bestimmen zu können (5 cm-Mikroküvette; MT 4; Hersteller: Fa. C. Zeiss, Oberkochen). Auf die Einhaltung der Salzsäurekonzentration ($c_{\text{HCl}} = 1$ N) ist hierbei streng zu achten⁹.

Aufnahme der I.R.-Spektren einiger Porphyrinfraktionen in Esterform. Die I.R.-Spektren der in Esterform vorliegenden Porphyrine, UP-I, UP-III, CP-I, CP-III, F1, 1a, 2 und f 8,9 (Fig. 2,5), wurden mit einem I.R.-Spektrographen der Fa. E. Leitz, Wetzlar (Modell: III G, mit Gitter III) aufgenommen. Die Substanzen wurden in KBr-Mikropresslingen, die nach einer standardisierten Vorschrift hergestellt wurden, untersucht.

Zur Präparation der Ester wurde die salzsaure Lösung der Porphyrine im Feinvakuum bis fast zur Trockene eingengt, mehrfach mit Benzol ausgewaschen und anschliessend in 5 ml Methanol/Konz. Schwefelsäure (19:1) aufgenommen. Nach 24-stündigem Stehenlassen bei Raumtemperatur wurde die Lösung in ein auf 0° vorgekühltes Gemisch von 5 ml Aqua dest./1 ml Chloroform eingegossen, in einem Scheidetrichter kräftig geschüttelt und die wässrige Phase abgetrennt. Durch Waschen mit 1 N NH_4OH werden restliche unveresterte Porphyrinanteile entfernt. Anschliessend wird mit Aqua dest. mehrfach nachgewaschen, bis die Waschlösung neutral reagiert. Die organische Lösung der Ester wird nun in ausgezogene Mikroröhrchen überführt und das Lösungsmittel vorsichtig im Wasserstrahlvakuum abgesaugt. Die auskristallisierten Ester werden über KOH für mehrere Tage getrocknet.

Zur Herstellung des Mikropresslings werden 10 mg gut vorgetrocknetes KBr in

das Mikroröhrchen eingefüllt, mit einem Mikrospatel mit dem Ester gut vermischt und in einem Achatmörser anschliessend fein zerrieben. Der Mikropressling wird mit dem kommerziell erhältlichen Presswerkzeug der Fa. Leitz unter standardisierten Bedingungen erhalten (Durchmesser des KBr-Presslings: 2 mm; Durchmesser der Al-Trägerscheibe: 20 mm). Die zur Aufnahme von I.R.-Spektren erforderliche Porphyrinkonzentration lag bei 3–5 μg Ester/mg KBr, so dass unter den genannten Bedingungen 30–50 μg des betr. Esters zur Herstellung eines Presslings benötigt werden. Bei der Präparation von KBr-Presslingen mit Porphyrinen in Säureform trat merkliche Zersetzung ein, so dass auf eine Registrierung dieser I.R.-Spektren verzichtet wurde.

Bei der Herstellung der Porphyrinester ist sorgfältig darauf zu achten, dass eine Kontamination durch Oel- bzw. Fettspuren, die beim Arbeiten mit einer Gasballastpumpe trotz einer grossflächigen, auf -40° abgekühlten Kühlfalle stets zu befürchten war, absolut ausgeschaltet wird. Daher wurden nach dem Einengen der salzsauren Porphyrinlösungen die auftretenden Rückstände mehrfach mit Benzol ausgewaschen. Freie Porphyrine sind in Benzol völlig unlöslich, so dass Verluste hierbei nicht zu befürchten sind.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die extraktionschromatographische Analyse komplexer Porphyringemische ist gegenüber anderen Verfahren von Vorteil dadurch, dass eine Trennung und Bestimmung der Hämpräkursoren in einem Arbeitsgang erfolgen kann^{9,10}. Die aus dem Urin über eine Filterbodenextraktion isolierten Porphyrine können in freier Form unmittelbar zur Trennung eingesetzt und anschliessend für weitere Untersuchungen (z.B.: Bestimmung der Peaklage der Soretbande λ_p ; Aufnahme von I.R.-Spektren; u.a.) wieder verwendet werden. Die hierbei auftretenden Verluste können, wie frühere Untersuchungen für Coproporphyrin und Uroporphyrin selbst unter extremen Versuchsbedingungen zeigten⁹, praktisch vernachlässigt werden. Voraussetzung für eine quantitative Auswertung ist jedoch, dass die Versuchsanordnung unter Versuchsbedingungen mit reinen Bezugssubstanzen geeicht, die spezifische Extinktion bzw. die korrespondierende Extinktionsfläche der einzelnen Porphyrine somit bekannt ist. Weiterhin ist hervorzuheben, dass mit dem beschriebenen Verfahren freie Uroporphyrinisomere, die mit anderen Methoden bisher nicht zerlegt werden konnten, aufgetrennt und ebenfalls quantitativ bestimmt werden können¹⁰.

Ein Beispiel einer solchen Auftrennung eines an anderer Stelle bereits eingehend untersuchten komplexen Porphyringemisches (Patient U.)^{8–10} ist in Fig. 2 dargestellt. Während über die Identifikation von F 1, 1a und 2 (UP-I, UP-III und 7-III) bereits ausführlich berichtet wurde¹⁰, soll in der vorliegenden Arbeit der jeweilige Isomerentyp und Decarboxylierungsgrad der Fraktionen F 3–8 bestimmt werden.

Einordnung der Porphyrine anhand der Peaklage λ_p der Soretbande

Als zuverlässigstes Kriterium für die Einordnung von Hämpräkursoren nach Anzahl der Carboxylgruppen n hat sich die Peaklage der Soretbande λ_p erwiesen, die innerhalb einer engen Fehlergrenze (± 0.1 nm) selbst mit sehr geringen Porphyrinmengen (min. 0.2 μg) noch bestimmt werden kann. Zur Identifikation der Porphyrine in dem vorliegenden Porphyringemisch wurden die von der Trennsäule kommenden

Fraktionen in einem zeitgesteuerten Probenwechsler aufgefangen, und die Peaklage der eluierten Porphyrine in der beschriebenen Weise bestimmt. Das Ergebnis einer solchen Auswertung ist in Fig. 2 dargestellt ($\lambda_p = f(t_{E1.})$: vor Decarboxylierung). Anschliessend wurden die in den Fraktionen um die Elutionsmaxima herum aufgefangenen Porphyrine decarboxyliert und die Peaklage der resultierenden Reaktionsprodukte erneut bestimmt ($\lambda_p = f(t_{E1.})$: nach Decarboxylierung).

Diese Auswertung zeigt deutlich die zwischen den Elutionsmaxima x_p und der Peaklage λ_p bestehende Abhängigkeit an. Da die Peakfolge bei der extraktionschromatographischen Zerlegung mit der bei der dünn-schichtchromatographischen Auftrennung erhaltenen übereinstimmt (Fig. 2 und 5), letztere jedoch bei der sehr ähnlichen papierchromatographischen Trennung mit dem n -Wert in Korrelation gesetzt wird^{1,2}, muss auch für die vorliegende Aufzeichnung des Elutionsverlaufes eine

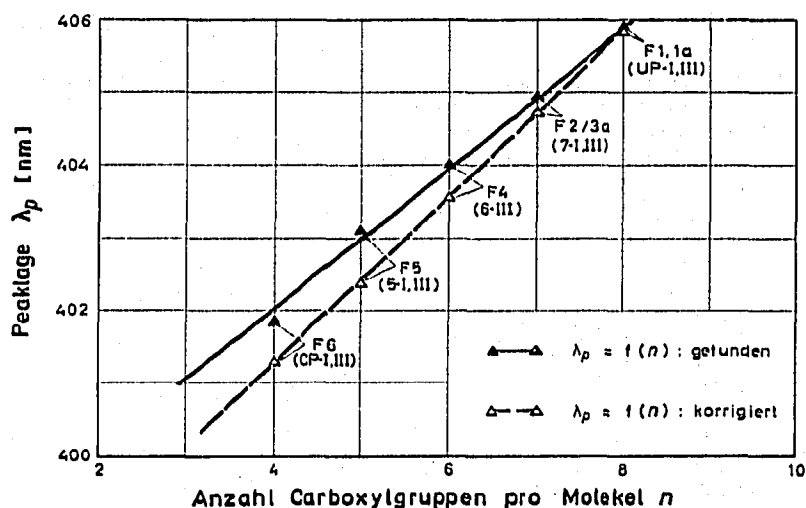


Fig. 3. Abhängigkeit der Peaklage der Soretbande λ_p von der Anzahl der Carboxylgruppen n für eine Säurekonzentration von $c_{HCl} = 1 N$. Die empirisch erhaltenen λ_p -Werte ($\lambda_p = f(n)$: gefunden) mussten bezüglich der in den Fraktionen enthaltenen Anteile höher carboxylierter Porphyrine korrigiert werden ($\lambda_p = f(n)$: korrigiert).

solche Abhängigkeit zwischen den beiden Parametern λ_p und n angenommen werden.

Die für die im Elutionsmaximum jeweils erhaltenen Peaklagen λ_p sind in Abhängigkeit von den angenommenen n -Werten in Fig. 3 aufgetragen ($\lambda_p = f(n)$: gefunden). Da der für F 6, die dünn-schichtchromatographisch eindeutig als CP-I/CP-III-Gemisch identifiziert wurde (Fig. 5), gemessene λ_p -Wert ($\lambda_p = 401.80 \text{ nm}$) deutlich über dem bei reinen CP-Proben erhaltenen ($\lambda_p = 401.30 \text{ nm}$) liegt, musste angenommen werden, dass diese Fraktion durch Anteile mit höheren λ_p -Werten (F 1, 1a und 2) kontaminiert ist. Diese Annahme wird gestützt durch den in Fig. 2 eingetragenen Verlauf von λ_p : Die bei ungünstigem Peak/Talverhältnis zwischen den einzelnen Elutionspeaks stets zu beobachtende Erhöhung der λ_p -Werte im Vergleich zu den in den Elutionsmaxima erhaltenen kann nur so gedeutet werden, dass die in hohem Überschuss vorliegenden Fraktionen 1, 1a und 2 in merklichem Umfang in den Fraktionen F 3–8 auftreten. Eine Abschätzung der Höhe der Kontamination von F 1, 1a und 2 in F 6 über eine Bestimmung der Verschiebung der Peaklage nach einem an anderer Stelle beschriebenen Verfahren¹⁴ ergab einen Anteil von ca. 10%.

Diese Überlagerung ist offenbar darauf zurückzuführen, dass die Kapazität der Säule überschritten und Anteile von F 1, 1a und 2 sukzessive in die Elutionsphase übergehen. Bei einem günstigeren Verhältnis von F 3-8/F 1-2 bzw. bei einer vorangehenden Abreicherung von F 1-2 können Störungen dieser Art sicherlich völlig vermieden werden. Bei der Auftrennung von reinen CP-UP-Gemischen konnte bei Mengen von 1-20 μg eine solche Überlagerung mit der gleichen Versuchsanordnung nicht beobachtet werden⁹. Die in F 3-8 vorliegenden Anteile von F 1-2 liessen sich auch dünn-schichtchromatographisch nachweisen (Fig. 5).

Die λ_p -Werte der extraktionschromatographisch erhaltenen Fraktionen mussten daher unter Zugrundelegung der bei reinen Proben von CP und UP gemessenen entsprechend korrigiert werden (Fig. 3, $\lambda_p = f(n)$: korrigiert). Die für die einzelnen

TABELLE I

EXTRAKTIONSCROMATOGRAPHIE BZW. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE VON PORPHYRINEN VOR UND NACH DECARBOXYLIERUNG

Zusammenstellung der bei der extraktionschromatographischen bzw. dünn-schichtchromatographischen Auftrennung für die verschiedenen Fraktionen erhaltenen Elutionszeiten $t_{E1.}$, R_F -Werte sowie die vor (λ_p, vD) und nach (λ_p, nD) der Decarboxylierung absorptionspektrophotometrisch gemessenen Peaklagen der Soretbande. Die empirisch erhaltenen Werte (λ_p) sind bezüglich der Anteile höher carboxylierter Porphyrine korrigiert (λ^e).

F	$t_{E1.}$ (h)	R_F - Werte	λ_p, vD (nm)	λ_p^e, vD (nm)	λ_p, nD (nm)	λ^e, nD (nm)	n	Zuordnung
F 1	28.3	0.02	405.90	405.80	401.50	401.30	8	8-I UP-I
F 1a	23.5	0.02	405.90	405.80	401.45	401.30	8	8-III UP-III
F 2	16.0	0.05	404.90	404.70	401.30	401.30	7	7-III
F 3	9.0	0.03	406.00		402.30			?
F 3a	6.8	0.10	405.00	404.70	401.50	401.30	7	7-I
F 4	5.4	0.14	404.00	403.50	401.30	401.30	6	6-III
F 5	3.6	0.29	403.10	402.40	401.30	401.30	5	5-I, III
F 5a	3.0	0.34	403.10	402.40	401.30	401.30	5	
F 6	2.6	0.40	401.80	401.30	401.35	401.30	4	4-I CP-I
		0.43						4-III CP-III
F 7	1.6	0.46	403.90		403.00			?
F 8	1.0	0.46	405.70		402.20			?

decarboxylierten Hämpräkursoren bei einer Säurekonzentration von $c_{\text{HCl}} = 1.00 \text{ N}$ angenommenen bzw. erhaltenen Peaklagen λ_p sind in Tabelle I zusammengestellt.

Die zwischen der Elutionszeit $t_{E1.}$ und der Anzahl der Carboxylgruppen n bestehende Abhängigkeit ist in Fig. 4 dargestellt. Hieraus geht hervor, dass die günstigste Auflösung bei der Auftrennung im Bereich hoher $t_{E1.}$ -Werte erhalten wird (F 1, 1a und 2). Zwischen F 3-8 ist die Peakfolge bereits so dicht, dass eine vollständige Auflösung der Einzelpeaks nicht mehr erreicht wird. Durch sinnvolle Anpassung der Versuchsbedingungen (Erniedrigung der Säurekonzentration der Elutionslösung: $c_{\text{HCl}} = 1 \rightarrow 0.5 \text{ N}$) kann eine Verbesserung der Auflösung in diesem Bereich erzielt werden. Die für die beiden Uroporphyrinisomere I und III hierbei resultierenden Elutionszeiten $t_{E1.}$ werden in diesem Falle allerdings sehr gross.

Ermittlung des Isomerentyps von Hämpräkursoren durch Überführung in die entsprechenden Coproporphyrinisomere

Die derzeit wohl zuverlässigste Methode zur Identifikation der Porphyrine be-

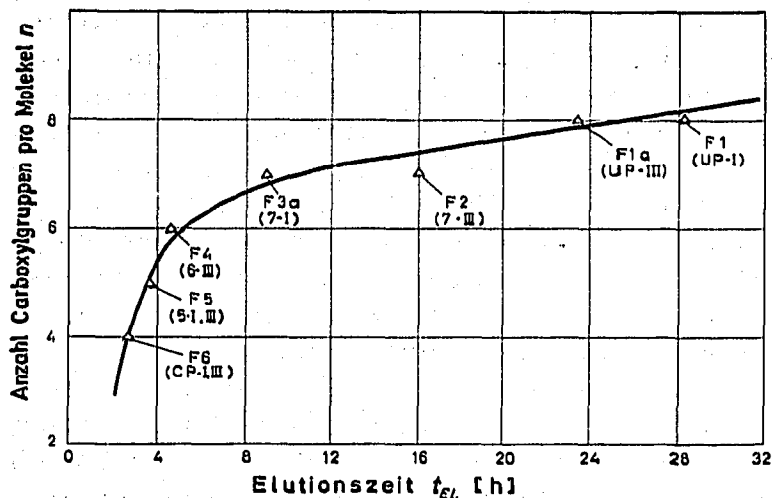


Fig. 4. Auftragung der zwischen der Elutionszeit t_{El} und Anzahl der Carboxylgruppen n bestehenden Abhängigkeit bei der extraktionschromatographischen Auftrennung der Porphyrine unter den angegebenen Versuchsbedingungen (Fig. 2).

züglich des Isomerentyps besteht in der Überführung in die entsprechenden Coproporphyrinisomere durch Decarboxylierung. Diese können dünnschichtchromatographisch im 2,6-Lutidin/Wasser-System⁶ aufgetrennt und anhand der R_F -Werte eindeutig identifiziert werden.

Hierzu werden die um das jeweilige Elutionsmaximum aufgefangenen Fraktionen der einzelnen Peaks vor und nach der Decarboxylierung dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in den Fig. 5 und 6 dargestellt.

Während die Fraktionen F 1, 1a, 2, 3a, 4, 5/5a und 6 über die zugehörigen R_F - bzw. λ_p -Werte vor und nach Decarboxylierung identifiziert werden konnten, war

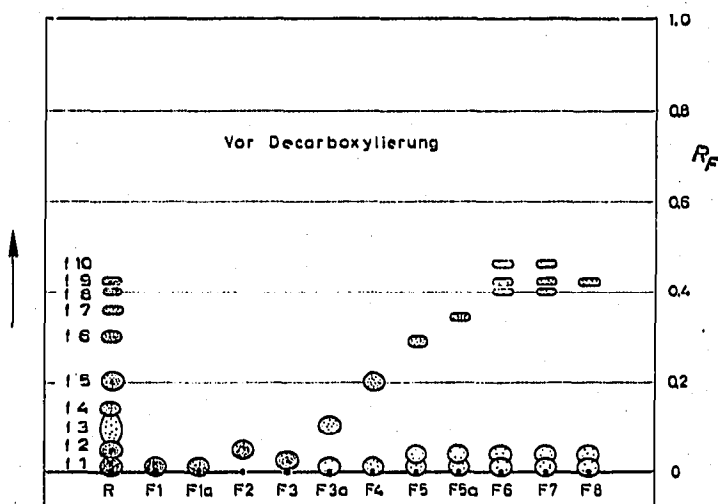


Fig. 5. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der extraktionschromatographisch erhaltenen Fraktionen F 1-8 im 2,6-Lutidin/Wasser-System auf aktivierten Kieselgelschichten, vor der Decarboxylierung. Die Punktdichte widerspiegelt annähernd die relative Porphyrinkonzentration der einzelnen Flecken. R ist das zugehörige, aus dem Urin von Patient U. isolierte komplexe Porphyringemisch (Fig. 2, Lit. 8).

die Zuordnung von F 3, 7 und 8 bzw. f 10 bezüglich des vorliegenden Isomerentyps und Einordnung in die homologe Reihe der Hämpräkursoren nicht möglich. Die Gründe hierfür liegen vor allem darin, dass die Peaklagen λ_p der decarboxylierten Reaktionsprodukte deutlich von den für reine Coproporphyrinomere erwarteten ($\lambda_p = 401.30$ nm) abwichen (Tabelle I). So wurde für die Peaklage von F 3, das nach der Decarboxylierung in CP-I-Position auftritt, ein Wert von $\lambda_p = 402.30$ nm erhalten (F 7: $\lambda_p = 403.00$; F 8: $\lambda_p = 402.20$ nm), wodurch die Identität mit einem der Coproporphyrinomere, die nach der Decarboxylierung an dieser Stelle erwartet werden, ausgeschlossen werden kann. Der R_F -Wert allein kann für die Identität eines Hämpräkursors nicht als ausreichendes Kriterium anerkannt werden.

Bei der Identifikation von F 3a wird angenommen, dass diese Fraktion durch Anteile von F 4 bzw. 1, 1a oder 2 leicht kontaminiert ist, wodurch das Auftreten der Fraktion f 9 (Fig. 6) erklärlich wird. Die übrigen Kenndaten (λ_p -Wert vor und nach Decarboxylierung; R_F -Wert vor Decarboxylierung) sprechen für das Vorliegen eines 7-I-Porphyrins. Die Überlagerung der beiden Fraktionen von F 5 und 5a war so ausgeprägt, dass aus den R_F -Werten die Zuordnung des Isomerentyps nicht vorgenommen werden konnte. Die Einordnung der beiden Fraktionen als Pentacarboxylporphyrine dagegen unterliegt keinem Zweifel.

Bemerkenswert ist weiterhin die Beobachtung, dass bei sämtlichen Fraktionen F 1–8 nach der Decarboxylierung bei der dünnenschichtchromatographischen Auftrennung eine Komponente f 10 in CP-II-Position¹⁵ auftritt, die offensichtlich mit dem bei F 7 und 8 auftretenden Hauptbestandteil identisch ist. Im ursprünglichen Porphyringemisch (R, Fig. 5 und 6; Fig. 2, Lit. 8) kann diese Fraktion nicht oder nur in geringer Konzentration nachgewiesen werden. Es wird daher vermutet, dass in dem untersuchten Porphyringemisch (Patient U.) neben den der Isomerenreihen I und III angehörenden Hämpräkursoren noch Porphyrinderivate auftreten, bei denen durch Substituentenaustausch (z.B. Methyl- gegen Äthylrest u.ä.) die beobachtete Ver-

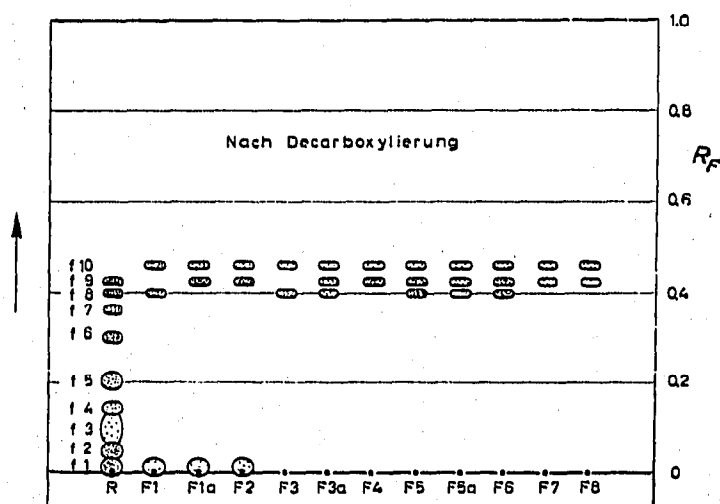


Fig. 6. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der extraktionschromatographisch erhaltenen Fraktionen F 1–8 im 2,6-Lutidin/Wasser-System auf aktivierten Kieselgelschichten, nach der Decarboxylierung. Die Punktdichte widerspiegelt annähernd die relative Porphyrinkonzentration der einzelnen Flecken. R ist das zugehörige, aus dem Urin von Patient U. isolierte komplexe Porphyringemisch (Fig. 2, Lit. 8).

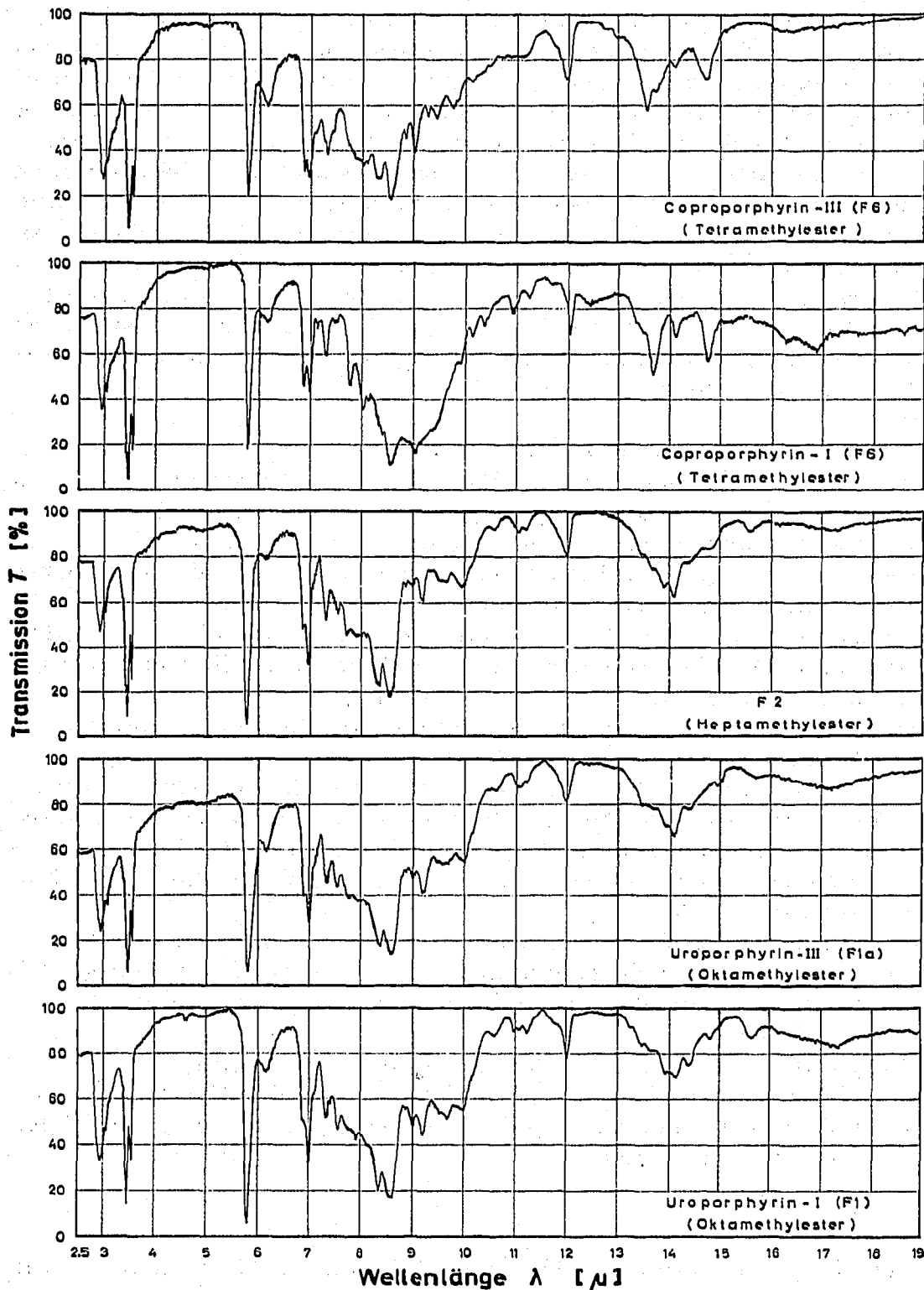


Fig. 7. Zusammenstellung der I.R.-Spektren der in Esterform vorliegenden Porphyrine von UP-I, UP-III, CP-I, CP-III bzw. F 1, 1a, 2 und f 8, 9 (= F 6). Die Spektren wurden mit KBr-Mikropresslingen bei einer Porphyrinkonzentration von 3-5 μ g Ester/mg KBr mit einem I.R.-Spektrographen der Fa. E. Leitz, Wetzlar, aufgenommen.

schiebung der Peaklage der Soretbande λ_p verursacht wird. Aus dem Auftreten verschiedener R_F -Werte bei den decarboxylierten Fraktionen von F 3 und 8 (Fig. 6) bei gleichem λ_p -Wert muss geschlossen werden, dass auch die substituierten Porphyrinderivate verschiedenen Isomerenreihen angehören (I und III?). Hierbei scheint der Anteil mit dem grösseren R_F -Wert (III?) zu überwiegen (f 10). Da sämtliche Fraktionen F 1–8 nach der Decarboxylierung bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung neben dem jeweiligen Hauptbestandteil einen Anteil f 10 lieferten, folgt, dass diese Porphyrinderivate ebenfalls in den bei den normalen Porphyrinen auftretenden, durch den Grad der Decarboxylierung gekennzeichneten Zwischenstufen in dem ursprünglichen Porphyringemisch vorliegen. Zur näheren Charakterisierung dieser Verbindungen sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich. Das Vorliegen der den Isomerenreihen II und IV angehörenden Porphyrine kann aus den bereits angedeuteten Gründen ausgeschlossen werden.

Infrarotspektroskopische Identifikation einiger Porphyrine und deren Isomere

Zur weiteren Charakterisierung der aus dem Urin von Patient U. isolierten Fraktionen (F 1, 1a, 2 und f 8, 9) wurden die Infrarotspektren der entsprechenden Ester aufgenommen. Diese wurden den bei reinen Bezugssubstanzen (CP-I, III und UP-I, III) erhaltenen gegenübergestellt. Eine Auswahl der bei diesen Untersuchungen erhaltenen Spektren ist in Fig. 7 zusammengestellt. Hieraus geht hervor, dass die I.R.-Spektren der Fraktionen von F 1, 1a mit den der reinen Bezugssubstanzen UP-I und UP-III übereinstimmen. Die zwischen den I.R.-Spektren von UP-I und UP-III auftretenden geringfügigen Unterschiede reichen nicht aus, um die Isomere anhand ihrer I.R.-Spektren identifizieren zu können. Gleichfalls besteht weitgehende Übereinstimmung der Spektren von F 2 und F 1a (UP-III).

Demgegenüber weisen die I.R.-Spektren von CP-I und CP-III bzw. f 8 und 9 deutlichere Unterschiede auf, die zur Kennzeichnung des Isomerentyps beim Vorliegen reiner Substanzen ausreichen sollten. Eine quantitative Isomerenanalyse aufgrund dieser Verschiedenheiten der I.R.-Spektren, wie an anderer Stelle vorgeschlagen¹⁰, erscheint jedoch kaum möglich.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass unter den beschriebenen Bedingungen die I.R.-Analyse von Porphyrinester dadurch eingeschränkt wird, dass:

- (1) Zur Herstellung der KBr-Mikropresslinge noch relativ grosse Porphyrinmengen benötigt werden (min. 30 μg);
- (2) bei der Präparation der Ester extreme Sorgfalt erforderlich ist;
- (3) dass die in KBr als Matrix auftretenden Unterschiede des Bandenverlaufes kaum ausreichend sind, um Isomeregemische über eine Auswertung der I.R.-Spektren quantitativ zerlegen zu können.

DANK

Herrn Prof. Dr. H.-J. EICHHOFF und Herrn F. B. WOLF, Institut für Anorganische Chemie und Kernchemie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, danke ich sehr herzlich für die bei der Aufnahme der I.R.-Spektren gewährte Unterstützung.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Analyse komplexer Porphyringemische wird eine Kombination verschie-

dener Untersuchungsmethoden empfohlen, die eine Identifikation der einzelnen Hämpräkursoren durchzuführen gestattet. Die bei der extraktionschromatographischen Auftrennung erhaltenen Fraktionen können bezüglich des Decarboxylierungsgrades über eine Bestimmung der Peaklage der Soretbande λ_p , die bereits mit Mengen von min. 0.2 μg durchgeführt werden kann, eingeordnet werden. Zur Ermittlung des Isomerentyps werden die Porphyrine in die entsprechenden Coproporphyrinisomere durch Decarboxylierung überführt, die dünnschichtchromatographisch im 2,6-Lutidin/Wasser-System identifiziert werden.

Mit den beschriebenen Verfahren (Extraktionschromatographische Auftrennung der Porphyrine im Verteilungssystem Tri-*n*-butylphosphat/1 *N* Salzsäure; Dünnschichtchromatographische Trennung der Porphyrine im 2,6-Lutidin/Wasser-System; Absorptionsspektrophotometrische Ermittlung der Peaklage der Soretbande λ_p) konnten in einem aus dem Urin eines Patienten (Patient U.) isolierten Porphyringemisch alle die zwischen Uroporphyrin und Coproporphyrin auftretenden Reaktionsstufen der beiden Isomerenreihen I und III, mit Ausnahme des 6-I-Porphyrins, nachgewiesen und z.T. quantitativ bestimmt werden. Darüber hinaus wurden zahlreiche Fraktionen unbekannter Porphyrine aufgefunden, die sich nicht in die normale Hämsynthesekette einordnen liessen. Es wird angenommen, dass es sich hierbei um substituierte Porphyrinderivate der Isomerenreihen I und III handelt. Die Aufklärung der Struktur dieser Verbindungen, insbesondere die Ermittlung der angenommenen Substituenten, muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Für das Auftreten von Porphyrinen der Isomerenreihen II und IV dagegen ergaben sich keinerlei Anhaltspunkte.

LITERATUR

- 1 R. E. H. NICHOLAS UND C. RIMINGTON, *Biochem. J.*, 48 (1951) 306.
- 2 R. KEHL UND W. STICH, *Z. Physiol. Chem.*, 290 (1952) 151.
- 3 T. C. CHU UND E. J.-H. CHU, *J. Biol. Chem.*, 227 (1957) 505.
- 4 R. CLOTTEN UND H. WEHINGER, *Deut. Med. Wochschr.*, 87 (1962) 131.
- 5 T. C. CHU UND E. J.-H. CHU, *J. Chromatog.*, 21 (1966) 46.
- 6 H. MUNDSCHENK, *J. Chromatog.*, 25 (1966) 380.
- 7 N. ELLFOLK UND G. SIEVERS, *J. Chromatog.*, 25 (1966) 373.
- 8 H. MUNDSCHENK, *Z. Anal. Chem.*, 233 (1968) 25.
- 9 H. MUNDSCHENK, *Z. Anal. Chem.*, im Druck.
- 10 H. MUNDSCHENK, *J. Chromatog.*, 37 (1968) 431.
- 11 P. R. EDMONDSON UND S. SCHWARTZ, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 605.
- 12 H. MUNDSCHENK, *Intern. J. Appl. Radiation Isotopes*, 18 (1967) 365.
- 13 H. MUNDSCHENK, *Nucl. Instr. Methods*, 44 (1966) 325.
- 14 H. MUNDSCHENK, *Z. Anal. Chem.*, 226 (1967) 141.
- 15 J. E. FALK, *J. Chromatog.*, 5 (1961) 277.
- 16 J. E. FALK UND J. B. WILLIS, *Australian J. Sci. Research, Ser. A*, 4 (1951) 579.