

CHROM. 3926

EXTRAKTIONSSCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG DER FREIEN PORPHYRINE AUF TRI-*n*-BUTYLPHOSPHAT-SÄULEN IM pH-GRADIENTEN

H. MUNDSCHENK

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

(Eingegangen am 19. Dezember 1968)

SUMMARY

*Separation of the free porphyrins by extraction chromatography on tri-*n*-butyl phosphate columns by elution with a pH gradient*

The method described allows the separation of the free porphyrins on a tri-*n*-butyl phosphate (TBP) column by elution with a pH gradient. The porphyrins are eluted from the column at discrete pH values (x_D) according to the number of carboxyl groups in the side chains. Separation of isomers could not be observed under the conditions used. The x_D values indicate the centre of the pH-interval, in which the dissociation of the carboxyl groups occurs. This finding could be confirmed by spectrophotometric measurements.

By combining the method proposed with the method of separation by extraction chromatography in the TBP/1 *N* HCl partition system and the thin-layer technique in the 2,6-lutidine-water system, a very complex porphyrin mixture isolated from the urine of a patient with a hyporegenerative anaemia could be resolved. The 27 fractions obtained by these separations made clear that not only porphyrins of the reaction chain of the haem synthesis are present in the mixture, but also compounds which 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 single fractions. In contrast to an earlier assumption it seems that porphyrins, not only of the isomeric types I and III but also of types II and/or IV, are occurring in the urine sample studied.

EINLEITUNG

Die Analyse der im Urin und Faeces ausgeschiedenen Porphyrine vermittelt einen Einblick in den Ablauf der Hämsynthese und gestattet somit Rückschlüsse auf die in pathologischen Fällen vorliegenden Störungen. Um eine eindeutige Identifizierung bezüglich des Carboxylierungsgrades und Isomerentyps zu erzielen, werden, im Hinblick auf die Vielfalt der hierbei auftretenden Hämpräkursoren, an die zur Auftrennung herangezogenen Methoden erhebliche Anforderungen gestellt. Eigene Erfahrungen mit dem an anderer Stelle beschriebenen extraktionschromatographischen Verfahren im Tri-*n*-butylphosphat (TBP)/1 *N* HCl-Verteilungssystem liessen

erkennen¹⁻⁴, dass zumindest in pathologischen Fällen die bei der Hämsynthese mittelbar bzw. unmittelbar auftretenden Metaboliten weit vielfältiger sind, als nach dem vereinfachenden, von Uroporphyrin ausgehenden Syntheschema a priori zu erwarten war. Diese Untersuchungen machten deutlich, dass zur Analyse von Porphyringemischen nicht nur leistungsfähige Trennverfahren sondern darüber hinaus auch ausreichend strenge und zudem leicht nachprüfbare Kriterien zur Identifikation der einzelnen Fraktionen derzeit dringend erforderlich sind. Eine Bestimmung des Schmelzpunktes scheidet oft daran, dass nur geringe Substanzmengen zur Verfügung stehen und zudem bei der Präparation der Proben hohe Reinheitsforderungen gestellt werden müssen; R_F -Werte bei DC-Trennungen, die bei der Zerlegung einfacher Porphyringemische, trotz bisweilen zu beobachtender erheblicher Schwankungen im gleichen System, noch weitgehend charakteristische Kenndaten für die einzelnen Fraktionen darstellen, sind bei der Auftrennung komplexer Systeme zur Identifikation völlig unzureichend.

In der vorliegenden Arbeit wird über ein Verfahren zur Auftrennung von Porphyringemischen auf TBP-Säulen im pH-Gradienten berichtet, mit dem, in Verbindung mit der an anderer Stelle beschriebenen Methode¹⁻⁴, die Zerlegung ausserordentlich komplexer Porphyringemische durchgeführt werden kann. Während diese Methode unter den angegebenen Versuchsbedingungen eine Fraktionierung hinsichtlich des Carboxylierungsgrades ermöglicht, kann in der sich anschliessenden extraktionschromatographischen Auftrennung im TBP/1 N HCl-System sowie in der dünn-schichtchromatographischen Zerlegung im 2,6-Lutidin/Wasser-System nach Decarboxylierung^{2,3} der Isomerentyp der einzelnen Fraktionen ermittelt werden. So konnte das aus dem Urin eines porphyrieeerkrankten Patienten isolierte Porphyringemisch, das dünn-schichtchromatographisch in 9 Bestandteile aufspaltet⁴, mit den angegebenen Methoden in 27 diskrete Einzelfractionen zerlegt werden! Zur Identifikation der einzelnen Verbindungen, die sich hinsichtlich ihrer Intensität ausserordentlich unterscheiden, werden neben den üblichen Grössen, R_F -Wert, Retentionsvolumen $v_{\max}^{\text{corr.}}$ bzw. Retentionszeit $t_{\text{Bl.}}$, die Peaklage der Soretbande λ_p sowie die bei der pH-Gradientenelution auftretenden sehr charakteristischen Dissoziationsstufen x_D herangezogen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Material

Tri-n-butylphosphat (TBP). Das zur Imprägnierung des Trägermaterials Hostaflon C 2 verwendete Extraktionsmittel TBP, ein handelsübliches Produkt (Hersteller: Fa. E. Merck, Darmstadt; Kat.-Nr. 317), wurde ohne jegliche zusätzliche Reinigung zu den Untersuchungen eingesetzt.

Polytrifluorochloräthylen (Hostaflon C 2). Als Trägermaterial wurde die durch Aufbereitung des aus dem Handel bezogenen Produktes (Hersteller: Farbwerke Höchst AG, Frankfurt-Höchst) erhaltene Siebfraction mit der Korngrösse von 50-100 μ verwendet. Zur Imprägnierung wurde TBP tropfenweise unter ständigem Rühren bis zu einem Gewichtsverhältnis von Hostaflon C 2:TBP = 2:1 zugesetzt.

Phosphatpuffer nach Sørensen. Zur Herstellung der 1/15 M Lösungen von Na_2HPO_4 bzw. KH_2PO_4 (Hersteller: Fa. E. Merck, Darmstadt; Kat.-Nr. 6586 bzw. 4873) wurden 9.47 g Na_2HPO_4 bzw. 9.08 g KH_2PO_4 in 1 l Aqua dest. aufgelöst. Beide

Lösungen wurden jeweils in heissem Zustand mit TBP durch Schütteln vorgesättigt.

Standardpufferlösungen. Zur Absoluteichung des verwendeten pH-Meters (pH-Meter 27 der Radiometer, Copenhagen, Dänemark) wurden die Präzisionspufferlösungen S 1500 (pH bei 20°: 6.881 ± 0.005) und Type S 1510 (pH bei 20°: 7.426 ± 0.005) der gleichen Herstellerfirma verwendet.

Salzsäure. Zur Auftrennung der Porphyrine im TBP/1 N HCl-System wurde stets 1 N HCl verwendet, die aus Titrisolkonzentraten (Hersteller: Fa. E. Merck, Darmstadt; Kat.-Nr. 9970/0001) angesetzt und stets in heissem Zustand mit TBP vorgesättigt wurde.

Uroporphyrin-I bzw. -III (UP-I bzw. -III). Beide Uroporphyrinisomere wurden in Form ihrer Oktamethylester durch den Handel bezogen (Hersteller: Koch-Light Laboratories Ltd., Colnbrook, England). Nach dem Verseifen in 5 N HCl wurden die freien Uroporphyrine im 2,6-Lutidin/Wasser-System dünn-schichtchromatographisch gereinigt. Nach der Elution mit 1 N HCl wurden beide aus schwach saurer Lösung ($c_{\text{HCl}} \approx 0.01 \text{ N}$) mit TBP extrahiert. Nach der Rückextraktion mit 5 N HCl wurde die salzsaure Porphyrinlösung mehrfach mit Benzol (5 × 5 ml) zur Entfernung anhaftender TBP-Reste ausgewaschen, auf eine Konzentration von 100 µg UP-I bzw. UP-III/ml 5 N HCl eingestellt und in dieser Form zu den Untersuchungen eingesetzt. Sämtliche Pipettierungen wurden mit einer Aglaspritze vorgenommen, die das bei quantitativem Arbeiten erforderliche exakte Dosieren gestattet.

Coproporphyrin-I bzw. -III (CP-I bzw. -III). Beide Isomere wurden aus UP-I bzw. UP-III durch Decarboxylierung nach der Methode von EDMONDSON UND SCHWARTZ⁵ erhalten^{2,3}. Die Konzentration der eingesetzten Stammlösungen schwankte, je nach Präparation, zwischen 20 und 50 µg/ml 5 N HCl.

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

Methoden

Bestimmung der Verteilungskoeffizienten K_D für Uroporphyrin und Coproporphyrin in Abhängigkeit vom pH-Wert. Zur optimalen Einstellung der Versuchsbedingungen bei der Auftrennung der Porphyrine im pH-Gradienten ist die Kenntnis des Verlaufes der Verteilungskoeffizienten K_D erforderlich. Hieraus können Rückschlüsse auf die zu erwartenden Trennfaktoren α ($\alpha = K_D^a/K_D^b$) bzw. Auflösung β ($\beta = \Delta x_p/\bar{T}_{50}^2$) gezogen und Voraussagen über die Durchführbarkeit einer Trennung gemacht werden.

Der Verlauf des K_D -Wertes wurde für UP-III und CP-III im Bereich von pH 4–8 bestimmt: In ein 25 ml Messkölbchen wurden 20 ml Pufferlösung (1/15 M Na_2HPO_4 -1/15 M KH_2PO_4) eingefüllt, 10.0 µg des betr. Hämpräkursors zugesetzt, mit 0.1 N NaOH auf den gewünschten pH eingestellt und schliesslich mit Aqua dest. auf 25 ml aufgefüllt. In drei mit Glasschliff versehenen Extraktionsröhrchen (100 × 16 mm; NS 14.5) werden jeweils 5.00 ml dieser Lösung einpipettiert. Nach Zugabe von 1.50 ml TBP wird für 2 min intensiv geschüttelt und anschliessend für 5 min bei 3000 U.p.m. zentrifugiert (Extraktion I). Vom Überstand (TBP) wird jeweils 1.00 ml TBP in ein gesondertes Röhrchen der gleichen Abmessungen überführt und die vorliegenden Porphyrinanteile mit 5.00 ml 5 N HCl rückextrahiert (Extraktion II). Nach dem Zentrifugieren wird die wässrige porphyrinhaltige Phase in ein weiteres Extraktionsröhrchen eingefüllt (Extraktion III), zur Entfernung der noch anhaftenden

TBP-Reste mehrfach mit Benzol p.A. ausgewaschen und anschliessend in eine Messküvette eingefüllt. Die Bestimmung des Porphyringehaltes erfolgte im Soretmaximum bei drei verschiedenen Wellenlängen (380, 405 bzw. 410 und 430 nm¹) mit einem Spektralphotometer (Zeiss Spektralphotometer PMQ II mit Monochromator M 4 Q III) in der üblichen Weise. Bei allen Extraktionen wurde eine unter den gleichen Bedingungen behandelte Standardprobe mitgeführt: Hierzu wurden 5,00 ml der Ausgangslösung mit 1 N HCl auf pH 1–2 angesäuert und der Hämpräkursor mit 1,50 ml TBP extrahiert. Aus 1,00 ml TBP wird wiederum, wie vorangehend beschrieben, mit 5,00 ml 5 N HCl rückextrahiert; nach dem Waschen der wässrigen Phase mit 5 × 5 ml Benzol wird der Porphyringehalt wiederum spektralphotometrisch bestimmt. Die Berechnung der K_D -Werte erfolgte unter Beachtung der bei den Extraktionen vorliegenden Phasenvolumenverhältnisse. Zur Bestimmung des pH-Wertes werden die wässrigen Phasen nach der I. Extraktion vereinigt (drei Röhrchen) und der pH mit einem absolut geeichten pH-Meter (pH-Meter 27 der Radiometer, Copenhagen, Dänemark) gemessen.

Auftrennung der freien Porphyrine auf TBP-Säulen im pH-Gradienten. Zur Durchführung der Trennungen wurde eine weitgehend automatisierte Versuchsanordnung eingesetzt (Fig. 1), wie sie bereits in modifizierter Form zur Auftrennung der Porphyrine im TBP/1 N HCl-System^{1–3} Verwendung fand. Kernstück dieser Anordnung ist die eigentliche Trennkolonne (Länge: $L_s = 120$ cm; innerer Durchmesser: $D_s = 5$ mm), die zusammen mit einer sog. Vorwaschkolonne (Länge: $L_{vs} = 15$ cm; innerer Durchmesser: $D_{vs} = 15$ mm) durch einen Ultrathermostaten (Hersteller: Fa. Gebr. Haake KG, Berlin) auf die gewünschte Temperatur T_s gebracht wird. Beide Säulen wurden mit dem gleichen Füllmaterial, Hostaffon C 2 mit TBP im Verhältnis 2:1 imprägniert, beschickt. Hierbei hat die Vorwaschsäule die Aufgabe, die in die Trennkolonne eintretende Elutionslösung mit TBP abzusättigen. Zur Herstellung des pH-Gradienten wird das Puffergemisch 1/15 M Na₂HPO₄-KH₂PO₄ verwendet: In ein vorgegebenes Volumen einer 1/15 M KH₂PO₄-Lösung (V_{KP}) tropft 1/15 M Na₂HPO₄-Lösung ein, wobei die Eintropfgeschwindigkeit der Durchflussgeschwindigkeit der Säule entspricht. Letztere wird durch die Schlauchabmessungen der Proportionierpumpe (Lieferfirma: Technicon GmbH, Frankfurt/M.), die die Elutionslösung sowohl unter leichtem Überdruck in die Vorwaschsäule eindrückt als auch von der Trennsäule unter leichtem Unterdruck absaugt, bestimmt. Der Anstieg des pH-Gradienten und damit die zur Trennung erforderliche Zeitspanne wird weitgehend durch das vorgelegte Volumen V_{KP} bestimmt (Fig. 7 und 9). Hierdurch können die Versuchsbedingungen auf einfache Weise einem gegebenen Trennproblem optimal angepasst werden. Die aus der Trennsäule austretende Elutionslösung wird durch eine Durchflussküvette (1 cm MR 1 D; Hersteller: Fa. C. Zeiss, Oberkochen) geleitet, wo kontinuierlich die Transmission der Lösung bei $\lambda_{gem.} = 395$ nm gemessen (Zeiss-Spektralphotometer PMQ II mit Monochromator M 4 Q III) und mit einem Potentiometerschreiber (Servo/Riter II, Texas Instruments, Houston, Tex., U.S.A.) fortlaufend registriert wird. Die einzelnen Fraktionen werden in einem zeitgesteuerten Fraktionssammler aufgefangen und anschliessend in der gleichen Versuchsanordnung unter Verwendung von 1 N HCl als Elutionsmittel weiter aufgetrennt^{2,3}.

Zur Isolierung und Auftrennung von im Urin auftretenden Porphyrinen wird wie folgt vorgegangen: Der schwach salzsaure Urin (pH 1–3) von einem Volumen von 20–200 ml (je nach der Höhe der vorliegenden Porphyrinkonzentration) wird mit

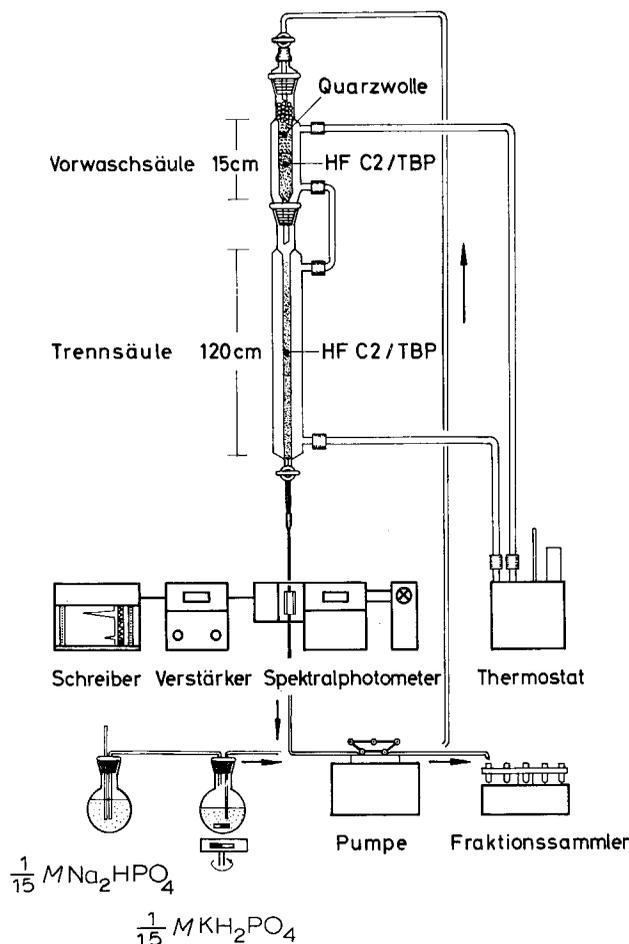


Fig. 1. Versuchsanordnung zur extraktionschromatographischen Auftrennung der freien Porphyrine durch pH-Gradientenelution mit $1/15\text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ - $1/15\text{ M KH}_2\text{PO}_4$ -Pufferlösung.

1–10 g imprägniertem Filterbodenmaterial⁴ versetzt, kurz geschüttelt und anschließend über eine Glasnutsche (Porenweite: G 2; Durchmesser: 50–100 mm) abgesaugt. Das Filtrat wird stets noch ein- bis zweimal über den gleichen Filterboden gegeben. Anschliessend wird mit 0.1 N HCl gründlich nachgewaschen. Die durch den Filterboden extrahierten Porphyrine werden nun mit $3 \times 3\text{ ml } 5\text{ N HCl}$ 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 mit 1 N NaOH auf eine Säurekonzentration von $c_{\text{HCl}} = 0.01$ – 0.1 N , zur Auftrennung der Porphyrine auf der Säule eingesetzt. Hierzu wird die Lösung in den Vorraum der Trennsäule eingefüllt. Bei kleinem Durchfluss ($D = 10$ – 20 ml/h) erfolgt vollständige Absorption der Porphyrine in der obersten Schicht des Füllmaterials ($K_{\text{DB}} \geq 1000$)⁴. Anschliessend wird mit 5 – $10\text{ ml } 0.01\text{ N HCl}$ nachgewaschen, die Vorwaschsäule aufgesetzt und die Elution durch Einschalten der Pumpe eingeleitet. Der entscheidende

Vorzug dieser Trennmethode besteht darin, dass Porphyrine aus biologischem Material in einem einzigen Trennschritt konzentriert und ohne jegliche weitere chemische Umsetzung in freier Form unmittelbar zur Auftrennung eingesetzt werden können.

Absorptionsphotometrische Messungen. Zur Charakterisierung der bei der Auftrennung im TBP/1 N HCl-System erhaltenen Fraktionen wird eine Bestimmung der Peaklage λ_p der Soretbande vorgenommen. Hierzu wird der Absorptionsverlauf der salzsauren Lösungen ($c_{\text{HCl}} = 1.00 \text{ N}$) im Bereich von 380 bis 450 nm bei kleiner Spaltbreite ($S = 0.02\text{--}0.04 \text{ mm}$) gemessen. Durch graphische Differentiation wird λ_p mit hoher Genauigkeit erhalten^{6,7}. Zur Durchführung der Bestimmung werden Porphyrinmengen von min. $0.2 \mu\text{g}$ benötigt, um λ_p auf $\pm 0.1 \text{ nm}$ genau bestimmen zu können (5 cm Mikroküvette MT 4; Hersteller: Fa. C. Zeiss, Oberkochen). Auf die Einhaltung der Säurekonzentration ist hierbei streng zu achten.

Der Einfluss des pH-Wertes auf den Verlauf der Soretbande wird für Uroporphyrin-III und Coproporphyrin-III in $1/15 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4\text{--}1/15 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$ -Pufferlösung eingehend untersucht (Fig. 4–6). Die Lage der jeweils intensivsten Bande wird, wie vorangehend beschrieben, durch graphische Differentiation ermittelt und in Abhängigkeit vom pH in Fig. 6 aufgetragen. In beiden Fällen wurden jeweils gleiche Porphyrinmengen zur Ermittlung des Absorptionsverlaufes eingesetzt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Verlauf der Verteilungskoeffizienten K_D für Uroporphyrin und Coproporphyrin

Voraussetzung für die Durchführbarkeit einer Trennung der Porphyrine auf den verwendeten TBP-Säulen ist ein ausreichend hoher Trennfaktor α . Dieser kann aus den Verteilungskoeffizienten K_D der betrachteten Hämpräkursoren unmittelbar berechnet werden.

Für die beiden physiologisch wichtigsten Porphyrine, Coproporphyrin und

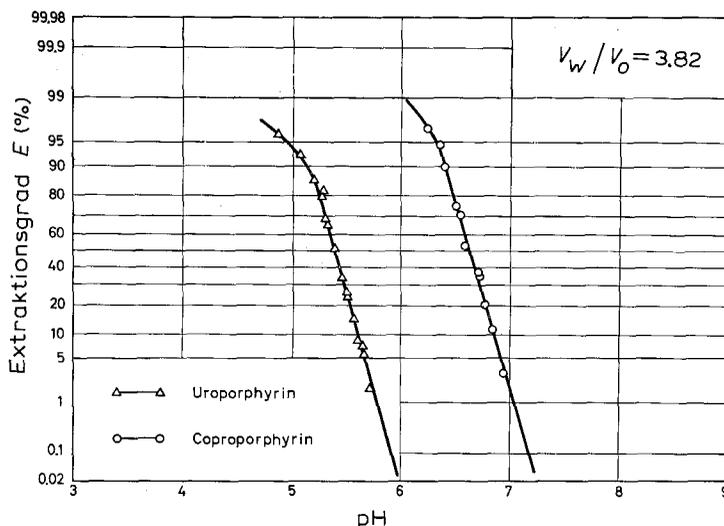


Fig. 2. Abhängigkeit des Extraktionsgrades E (Phasenvolumenquotient: $v_w/v_o = 3.84$) vom pH bei der Extraktion von Uroporphyrin und Coproporphyrin mit TBP im System TBP- $1/15 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4\text{--}1/15 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$.

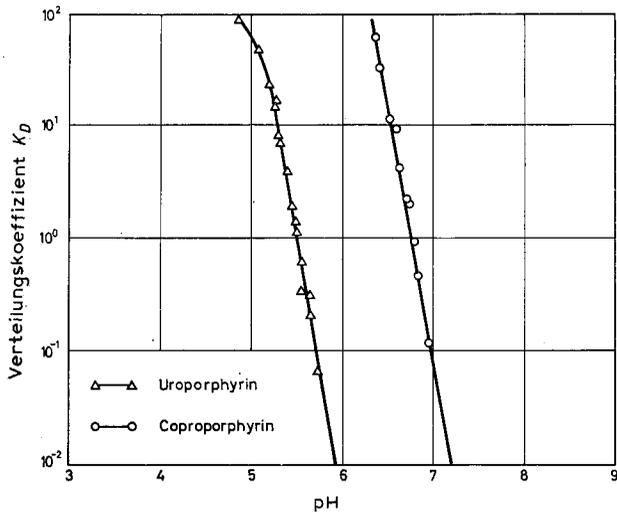


Fig. 3. Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten K_D vom pH bei der Extraktion von Uroporphyrin bzw. Coproporphyrin mit TBP im System TBP/ $1/15 M Na_2HPO_4-1/15 M KH_2PO_4$.

Uroporphyrin, wurden die Extraktionsgrade E in dem interessierenden pH-Bereich zwischen 4–8 im Batch-Versuch ermittelt und unter Berücksichtigung der vorliegenden Phasenvolumenverhältnisse in die entsprechenden K_D -Werte umgerechnet. Aus dem in Fig. 2 und 3 dargestellten Verlauf geht hervor, dass in beiden Fällen die Umwandlung einer durch TBP extrahierbaren Molekül- bzw. Ionenspezies (Zustand I) in eine nicht extrahierbare (Zustand II) innerhalb eines sehr begrenzten pH-Intervalls erfolgt. So vollzieht sich die Umwandlung von 95.4% der vorliegenden Porphy-

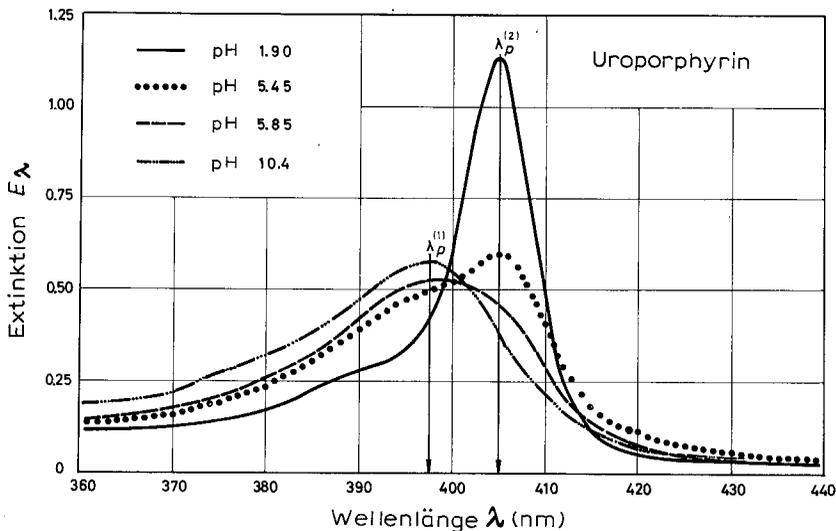


Fig. 4. Verlauf der Soretbande von Uroporphyrin bei verschiedenen pH-Werten in $1/15 M Na_2HPO_4-1/15 M KH_2PO_4$ -Pufferlösung. In allen Fällen wurde die gleiche Uroporphyrinmenge vorgegeben.

rinmoleküle von Zustand I nach Zustand II innerhalb eines pH-Bereiches von 0.8–0.9 pH-Einheiten.

Aus den K_D -Werten kann für die beiden Hämpräkursoren in dem gesamten, interessierenden pH-Bereich ein Trennfaktor von $\alpha = 10^7$ – 10^8 abgeschätzt werden. Somit sind für eine säulenchromatographische Auftrennung der beiden Porphyrine sehr günstige Voraussetzungen gegeben.

Verlauf der Absorptionsspektren von Uroporphyrin und Coproporphyrin im pH-Bereich zwischen 2–12

Aus dem Verlauf der Absorptionsspektren kann auf den Dissoziationszustand der Porphyrinmoleküle in den verschiedenen pH-Bereichen geschlossen werden. So wird aus der Verschiebung der Soretbande von Coproporphyrin von 402 auf 372 nm bei pH 4 bzw. von 372 auf 391 nm bei pH 7 auf das Vorliegen einer di- bzw. monokationischen Form dieses Hämpräkursors geschlossen⁸. Oberhalb von pH 7 existiert Coproporphyrin nur als freie Base, der die Soretbande bei $\lambda_p = 391$ nm zugeschrieben

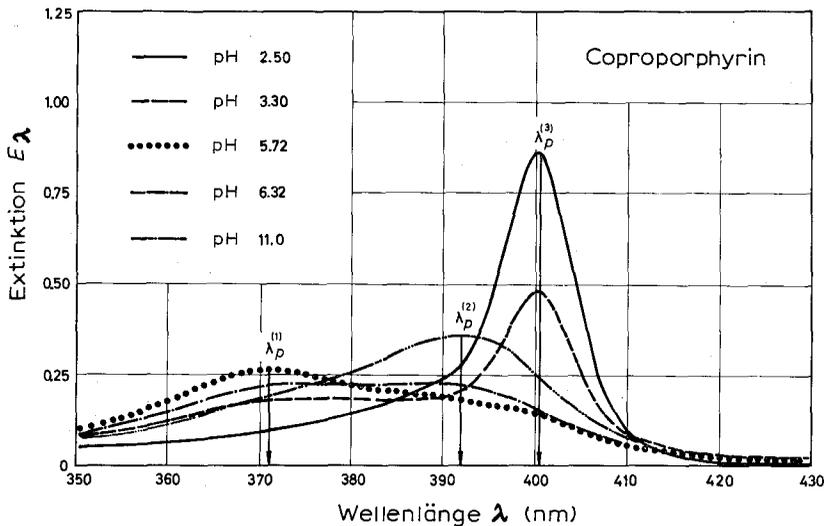


Fig. 5. Verlauf der Soretbande von Coproporphyrin bei verschiedenen pH-Werten in $1/15M$ Na_2HPO_4 - $1/15M$ KH_2PO_4 -Pufferlösung. In allen Fällen wurde die gleiche Coproporphyrinmenge vorgegeben.

wird. Es war nun naheliegend zu prüfen, inwieweit der Dissoziationszustand dieser beiden Hämpräkursoren mit dem Extraktionsverhalten im TBP/ Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 -Puffersystem korreliert werden kann.

Hierzu wurden die Absorptionsspektren von Uroporphyrin und Coproporphyrin zwischen 350–430 nm im pH-Bereich von 2 bis 12 aufgenommen und die Peaklage λ_p der jeweils intensivsten Bande durch graphische Differentiation des Bandenverlaufes ermittelt. Die für beide Porphyrine erhaltenen λ_p -Werte sind in Fig. 6 in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgetragen.

Bemerkenswert sind hierbei die in beiden Fällen auftretenden Unstetigkeitsstufen x_u , wobei für Coproporphyrin eine bei pH 4 und 6.6, für Uroporphyrin ledig-

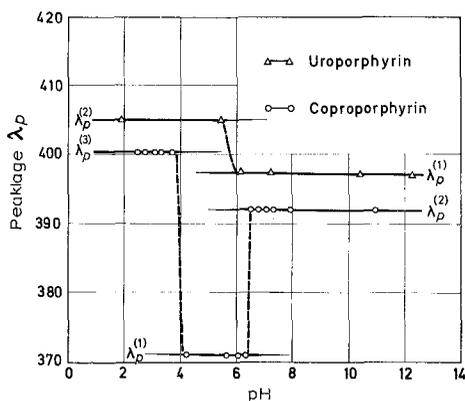


Fig. 6. Abhängigkeit der Peaklage λ_p der Soretbande von Uroporphyrin und Coproporphyrin vom pH-Wert in $1/15 M$ Na_2HPO_4 - $1/15 M$ KH_2PO_4 -Pufferlösung. Die ausgezogenen Pfeile deuten an, dass bei der Umwandlung die zunächst intensivste Bande über die Unstetigkeitsstelle hinaus, jedoch mit abnehmender Intensität, noch zu beobachten ist.

lich eine bei pH 5.7 beobachtet werden kann. Die keilförmig ausgezogenen Pfeile (Fig. 6) sollen qualitativ andeuten, dass die zunächst intensivste Bande auch nach der Umwandlung über die Unstetigkeitsstelle hinaus mit abnehmender Intensität im Absorptionsspektrum noch nachzuweisen ist. Die Lage dieser Unstetigkeitsstellen stimmt befriedigend mit den in der Literatur angegebenen p_K -Werten für die an den Stickstoffatomen von zwei Pyrrolkernen der Porphyrinmolekel eintretende Protonisierung überein⁸. Besonders auffallend jedoch ist die Übereinstimmung der x_u -Werte mit dem Mittelpunkt der Kurve der Verteilungskoeffizienten K_D ($K_D = 1$; Fig. 3), der bei der Säulentrennung der Lage der Elutionspeaks x_D entspricht. Hieraus kann gefolgert werden, dass die absorptionsphotometrisch nachweisbare Umwandlung der Porphyrinmoleküle dem Übergang einer durch TBP extrahierbaren Form in eine nicht extrahierbare entspricht. Hierbei kann im Extraktionsverhalten der beiden Hämpräkursoren, Uroporphyrin und Coproporphyrin, jedoch jeweils nur ein Übergang beobachtet werden (Uroporphyrin: pH 5.5; Coproporphyrin: pH 6.8). Es wird hierbei angenommen, dass diese Umwandlung der Porphyrinmoleküle auf eine Dissoziation der in den Seitenketten gebundenen Carboxylgruppen zurückgeht. Hierfür spricht die Tatsache, dass bei der Veresterung der Carboxylgruppen die Ester, im Gegensatz zu den freien Säuren, durch alkalische Lösung aus TBP nicht rückextrahiert werden können. Bei Einlagerung von Eisen in das Porphyrinmolekül, bei der eine Protonisierung a priori nicht mehr möglich ist, erhält man im Falle von Protoporphyrin das Hämin bzw. Hämatin, das sich im Extraktionsverhalten von dem der reinen Porphyrine nur graduell unterscheidet: Hämin ist aus alkalischer Lösung nicht, aus saurer und neutraler Suspension dagegen durch TBP ausgezeichnet extrahierbar.

Trennung der freien Porphyrine auf TBP-Säulen im pH-Gradienten

Über eine säulenchromatographische Trennung der freien Porphyrine wurde bisher in der Literatur nur vereinzelt berichtet. Bei diesen Verfahren⁹⁻¹¹ erfolgt, an relativ einfachen Testgemischen demonstriert, Differenzierung der einzelnen Porphyrine entsprechend des Carboxylierungsgrades. Eine Auftrennung von Isomeren wurde

hierbei nicht beobachtet. Wie an anderer Stelle bereits ausführlich beschrieben¹⁻³, ist es möglich, freie Porphyrine säulenchromatographisch im TBP/1 N HCl-System nicht nur aufzutrennen, sondern darüber hinaus auch simultan quantitativ zu bestimmen. Daneben konnten mit der beschriebenen Methode erstmals die freien Uroporphyrinisomere I und III selbst unter sehr ungünstigen Intensitätsverhältnissen aufgetrennt und ebenfalls quantitativ bestimmt werden².

Im Hinblick auf den sehr scharf ausgeprägten Verlauf der K_D -Werte von Uroporphyrin und Coproporphyrin (Fig. 2 und 3) war es naheliegend zu prüfen, inwieweit dieses Verhalten zur Auftrennung der Porphyrine unter diesen Versuchsbedingungen ausgenutzt werden kann. Hieraus wurden weitere Aufschlüsse über die Zusammensetzung des aus dem Urin eines porphyrieerkrankten Patienten (Pat. U.) isolierten, ausserordentlich komplexen Porphyringemisches, über das an anderer Stelle bereits ausführlich berichtet wurde¹⁻³, erwartet.

In Anbetracht des sehr begrenzten Umwandlungsintervalles, in dem die Dissoziation der Carboxylgruppen sich vollzieht, und der vorliegenden grossen Anzahl von Einzelfraktionen wurde die Gradientenelution einer Elution mit Lösungen diskreter pH-Werte vorgezogen. Hierbei erwies sich die in Fig. 1 dargestellte, sehr einfache Vorrichtung zur Herstellung eines (nichtlinearen) pH-Gradienten als sehr vorteilhaft: Durch Variation des Volumens der vorgelegten KH_2PO_4 -Lösung (V_{KP}) konnte die Steigung des pH-Gradienten in nahezu beliebigen Grenzen variiert werden. Eine Anpassung der Versuchsbedingungen an das jeweils vorliegende Trennproblem kann hierbei in optimaler Weise vorgenommen werden. Der Einfluss von V_{KP} und damit der Steilheit des pH-Gradienten auf die Auftrennung von Uroporphyrin (UP-I/UP-III), Pentacarboxylporphyrin (5-III) und Coproporphyrin (CP-I/CP-III) kann aus den beiden in Fig. 7 dargestellten Beispielen entnommen werden. Je nach Anzahl der aufzutrennenden Komponenten kann somit die zur Trennung erforderliche Steilheit über das vorgelegte Volumen V_{KP} gewählt werden. Bemerkenswert ist bei allen in diesem System durchgeführten Trennungen, dass eine Aufspaltung in Isomere

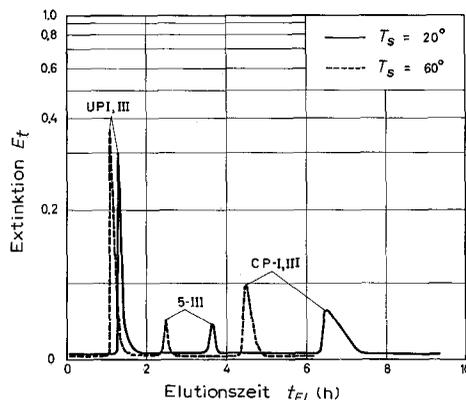
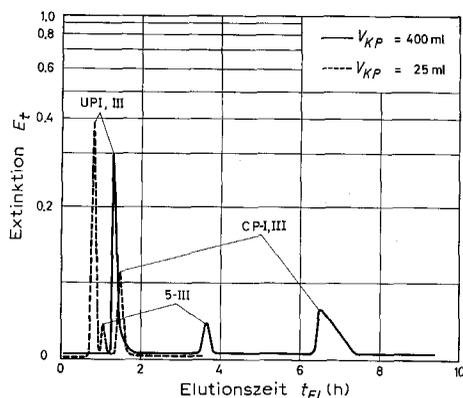


Fig. 7. Einfluss des vorgelegten Volumens V_{KP} der $1/15 M \text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung auf die Auftrennung von UP-I/UP-III, 5-III und CP-I/CP-III bei konstanten Versuchsbedingungen ($T_s = 20^\circ$; $D = 25 \text{ ml/h}$; $\lambda_{\text{gem.}} = 395 \text{ nm.}$)

Fig. 8. Einfluss der Säulentemperatur T_s auf die Auftrennung von UP-I/UP-III, 5-III und CP-I/CP-III bei konstanten Versuchsbedingungen ($V_{KP} = 400 \text{ ml}$; $D = 25 \text{ ml/h}$; $\lambda_{\text{gem.}} = 395 \text{ nm.}$)

selbst bei Gradientensteilheiten von 0.5 pH-Einheiten/h (UP-I/III) bzw. 0.1 pH-Einheiten/h (CP-I/III) nicht beobachtet werden konnte.

Der Einfluss der Säulentemperatur T_s auf die Auftrennung von Uroporphyrin (UP-I/UP-III), Pentacarboxylporphyrin (5-III) und Coproporphyrin (CP-I/CP-III) kann aus den in Fig. 8 dargestellten Beispielen ersehen werden. Im Gegensatz zur Trennung im TBP/1 N HCl-System¹⁻³ ist der Temperatureinfluss im vorliegenden Trennsystem nicht sehr ausgeprägt. Neben einer leichten Verkürzung der Elutionszeiten t_{El} mit zunehmender Temperatur T_s kann eine signifikante Zunahme der Auflösung β beobachtet werden¹.

Zur Prüfung der Leistungsfähigkeit des beschriebenen Verfahrens wurde eine Zerlegung des aus dem Urin einer hyporegenerativen Anämie (Pat. U.) isolierten Porphyringemisches, das bereits im TBP/1 N HCl-System aufgetrennt und analysiert wurde^{2,3}, vorgenommen (Fig. 9). Wie bereits nach Fig. 2 und 3 zu erwarten, tritt

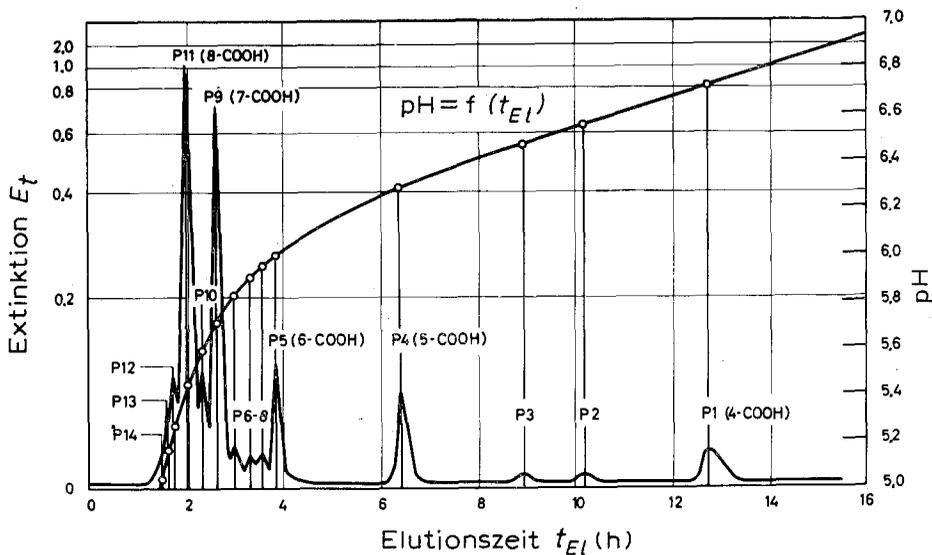


Fig. 9. Auftrennung des aus dem Urin von Pat. U. isolierten Porphyringemisches auf einer 120 cm TBP-Säule im pH-Gradienten ($V_{KP} = 800$ ml; $T_s = 20^\circ$; $\lambda_{gem.} = 395$ nm; $D = 25$ ml/h) und Ermittlung der für jede Fraktion charakteristischen Dissoziationsstufen x_D .

in diesem Trennsystem eine Umkehr der Peakfolge ein: Uroporphyrin weist die kleinere, Coproporphyrin die grössere Elutionszeit t_{El} auf. Der Verlauf des pH-Wertes der aus der Trennsäule austretenden Elutionslösung ist in der gleichen Darstellung eingetragen. Hieraus kann der jeder Fraktion entsprechende pH-Wert, der in einer grossen Versuchsreihe für die gleiche Fraktion stets innerhalb enger Grenzen (± 0.05 pH-Einheiten) reproduziert werden konnte, ermittelt werden. Die im Falle von Coproporphyrin und Uroporphyrin säulenchromatographisch erhaltenen Werte stimmen mit den im Batch-Versuch ermittelten (Fig. 2 und 3; $K_D = 1$) überein. Weiterhin kann im Elutionschromatogramm eine ausgeprägte Fraktionierung nach Anzahl der vorhandenen Carboxylgruppen n beobachtet werden, was leicht anhand vergleichender Untersuchungen nachzuweisen war (Bestimmung der Peaklage λ_p ; Auf-

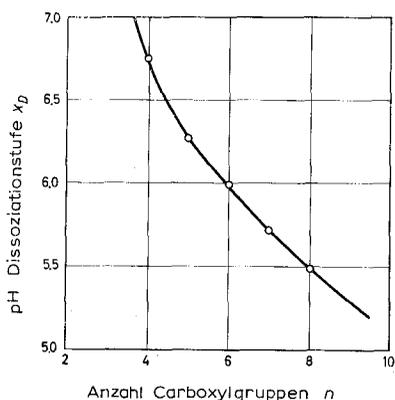


Fig. 10. Abhängigkeit der ermittelten x_D -Werte von der Anzahl der pro Porphyrinmolekül vorhandenen Carboxylgruppen n .

TABELLE I

ZUSAMMENSTELLUNG ALLER BEI DER AUFTRENNUNG DES AUS DEM URIN VON PAT. U. ISOLIERTEN PORPHYRINGEMISCHES ERHALTENEN CHARAKTERISTISCHEN KENNDATEN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER BEI DEN EINZELNEN TRENNSYSTEMEN BENUTZTEN BEZEICHNUNGEN

λ_p = Peaklage der Soretbande; t_{EL} = Elutionszeit bei Auftrennung im System TBP/I N HCl; x_D = Dissoziationsstufe der einzelnen Fraktionen bei der pH-Gradientenelution; R_F = R_F -Wert bei der DC-Trennung im 2,6-Lutidin/Wasser-System. DC-Trennung im 2,6-Lutidin/Wasser-System; f; Auftrennung im TBP/I N HCl-System; F; Auftrennung im pH-Gradienten: P.

EC/HCl	t_{EL} (h)	λ_p (nm)	DC	R_F	EC/pH	x_D	Zuordg.
F 6	2.2	401.3	f 9	0.43	P 1a	6.75	4-III
F 6	2.2	401.3	f 8	0.40	P 1b	6.75	4-I
—	10.0	—	—	—	P 2	6.53	?
—	16.5	—	—	—	P 3a	6.45	?
—	21.0	—	—	—	P 3b	6.45	?
F 7	1.6	403.1	(f 10)	0.46	P 4a	6.27	?
F 5a	3.0	402.5	f 7	0.34	P 4b	6.27	5-III
F 5	3.6	402.3	f 6	0.29	P 4c	6.27	5-I
F 4	5.4	403.5	f 5	0.19	P 5a	5.98	6-III
F 3a	6.8	403.4	f 3,4	0.10	P 5b	5.98	6-I
F 3a	7.3	403.3	f 3,4	0.10	P 5c	5.98	?
—	—	—	—	—	P 6	5.94	?
—	—	—	—	—	P 7	5.88	?
—	—	—	—	—	P 8	5.82	?
F 2	16.0	404.6	f 2	0.05	P 9a	5.72	7-III
—	20.5	404.4	—	—	P 9b	5.72	7-I
—	24.2	—	—	—	P 9c	5.72	?
(F 3)	9.0	405.6	—	—	P 10	5.58	?
F 8	1.2	405.9	—	0.43	P 11a	5.48	?
—	3.1	405.2	—	—	P 11b	5.48	?
—	4.1	405.7	—	—	P 11c	5.48	?
(F 3)	8.8	405.9	—	—	P 11d	5.48	?
F 1a	23.5	405.7	f 1	0.02	P 11e	5.48	8-III
F 1	27.8	405.7	f 1	0.02	P 11f	5.48	8-I
—	(2.4)	(405.9)	—	—	P 12	5.28	?
—	(4.4)	(405.9)	—	—	P 13	5.12	?
—	(20.5)	(405.9)	—	—	P 14	5.04	?

trennung im System TBP/1 *N* HCl; DC-Trennung im 2,6-Lutidin/Wasser-System). Eine Aufspaltung in Isomere bei den zwischen Uroporphyrin und Coproporphyrin liegenden Hämpräkursoren (Hepta-, Hexa- und Pentacarboxylporphyrin), wie sie im System TBP/1 *N* HCl eintritt, kann nicht beobachtet werden.

Hieraus folgt, dass Porphyrine bei einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration eine Umwandlung erleiden, von der, wie vorangehend erläutert, angenommen wird, dass es sich um den Übergang der Carboxylgruppen der Seitenketten in die anionische Form handelt. Die erhaltenen diskreten Dissoziationsstufen x_D sind für

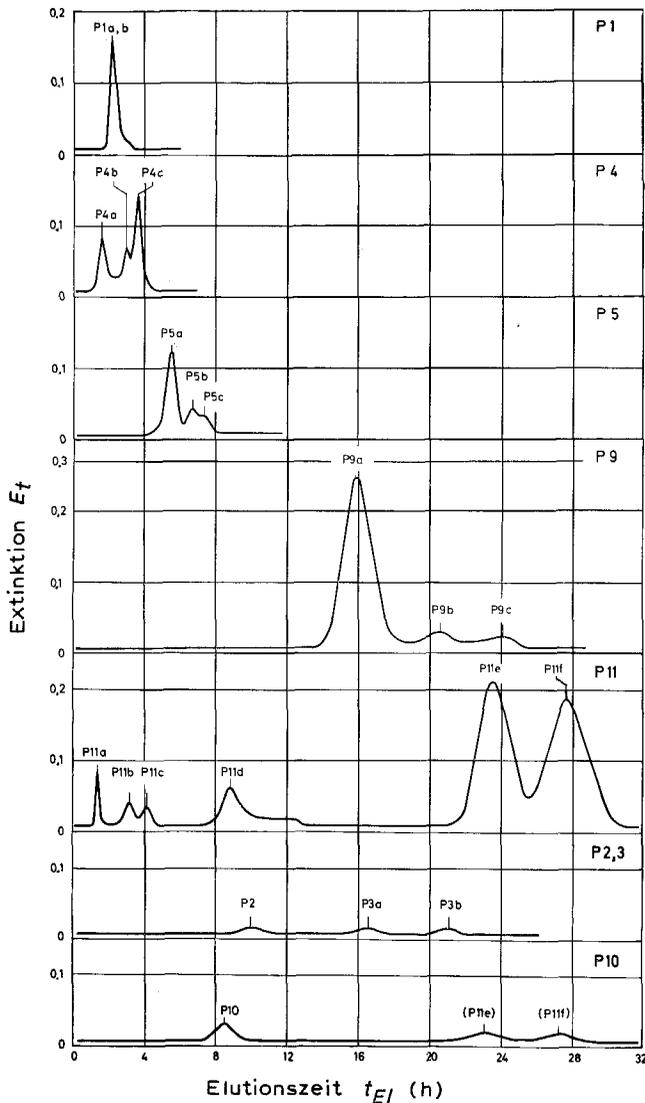


Fig. 11. Extraktionschromatographische Auftrennung der bei der pH-Gradientenelution erhaltenen einzelnen Fraktionen im Trennsystem TBP/1 *N* HCl. Bei allen Trennungen wurde die gleiche Säule ($L_s = 120$ cm Säule) verwendet.

jeden Hämpräkursor charakteristisch: Ihre Lage wird allein durch die Anzahl der in der Molekel vorliegenden Carboxylgruppen n bestimmt (Fig. 10). Isomere weisen bei den unter den angegebenen Versuchsbedingungen durchgeführten Untersuchungen identische x_D -Werte auf. Damit erhält man für Porphyrine mit den x_D -Werten weitere charakteristische Kenndaten, die bereits mit kleinen Substanzmengen ermittelt und somit zur Identifikation unbekannter Fraktionen herangezogen werden können. Die für sämtliche Fraktionen des aus dem Urin von Pat. U. isolierten Porphyringemisches erhaltenen x_D -Werte sind zusammen mit den bei anderen Trennungen erhaltenen Kenndaten (R_F -Werte bei DC-Trennung; x_p - und λ_p -Werte bei Trennung im TBP/1 N HCl-System) in Tabelle I zusammengestellt.

Verschiedene experimentelle Befunde (Verlauf der Peaklage bei Trennung im TBP/1 N HCl-System, vor und nach Decarboxylierung^{2,3}; DC-Trennung vor und nach Decarboxylierung^{2,3}) deuteten darauf hin, dass die Zusammensetzung des aus dem Urin von Pat. U. isolierten Porphyringemisches weit komplexer ist, als es nach der DC-Trennung im 2,6-Lutidin/Wasser-System (neun Fraktionen²⁻⁴) und der extraktionschromatographischen Auftrennung im TBP/1 N HCl-System (elf Fraktionen³) zunächst angenommen werden konnte. Bei der Gradientenelution treten ebenfalls eine Reihe von Fraktionen auf (Fig. 9: P 2, 3, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14), die sich nicht in das der Hämsynthese zugrundeliegende Schema einordnen lassen. Eine Identifikation dieser Fraktionen wurde z.T. dadurch erschwert, dass die auftretenden Konzentrationen der einzelnen Fraktionen nicht ausreichten, um weitere Umsetzungen bzw. Bestimmungen vornehmen zu können. Lediglich die bei der Auftrennung unmittelbar erhaltenen charakteristischen Dissoziationsstufen x_D sowie die in einigen Fällen ermittelten x_p -Werte im TBP/1 N HCl-System können für diese Fraktionen als spezifische Kenndaten angegeben werden (Tabelle I).

Da bei der Gradientenelution auf TBP-Säulen eine Trennung der Porphyrine entsprechend des Carboxylierungsgrades eintritt, eine Isomerentrennung nicht beobachtet wurde, war es naheliegend, die in diesem Trennsystem erhaltenen diskreten Fraktionen (P 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11) im TBP/1 N HCl-System, in dem eine Isomerentrennung möglich ist¹⁻⁴, weiter aufzutrennen. Die mit den einzelnen Fraktionen P erhaltenen Elutionschromatogramme sind in Fig. 11 zusammengestellt. Die sich hieraus ergebende Zuordnung der einzelnen Elutionspeaks in beiden Systemen, TBP/1 N HCl-System und TBP/Na₂HPO₄-KH₂PO₄-Puffersystem, kann aus der Gegenüberstellung der beiden Elutionschromatogramme in Fig. 12 entnommen werden.

Wie aus den in Fig. 11 dargestellten Beispielen hervorgeht, können die bei der Gradientenelution erhaltenen diskreten Elutionspeaks im TBP/1 N HCl-System in z.T. mehrere Fraktionen zerlegt werden. Lediglich Coproporphyrin (P 1), das dünn-schichtchromatographisch im 2,6-Lutidin/Wasser-System in CP-I und CP-III aufgetrennt werden konnte³, liess sich unter den vorliegenden Versuchsbedingungen im TBP/1 N HCl-System nicht weiter zerlegen.

Die Pentacarboxylfraktion P 4 dagegen spaltet in drei Fraktionen (P 4a, b und c), die auch bereits bei der unmittelbaren Trennung im TBP/1 N HCl-System^{2,3} beobachtet wurden (F 5, 5a und 7) auf. Aus der Übereinstimmung der Peaklage der Soretbande λ_p von P 4b ($\lambda_p = 402.5$ nm) und P 4c ($\lambda_p = 402.3$ nm) folgt, dass hier die Isomere 5-I und 5-III vorliegen^{2,3}. Bei P 4a handelt es sich offenbar um ein Pentacarboxylporphyrin ($\lambda_p = 403.1$ nm), das sich durch die an den Pyrrolokernen auftretenden Substituenten von den Verbindungen der Isomerenreihen I und III

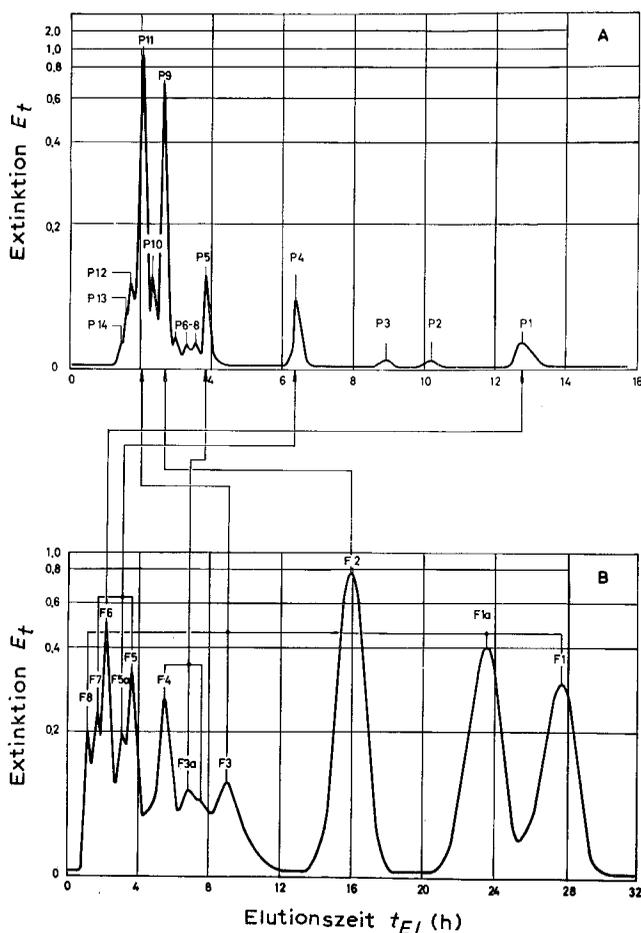


Fig. 12. Gegenüberstellung der bei der pH-Gradientenelution und im Verteilungssystem TBP/1 N HCl erhaltenen Elutionschromatogramme des aus dem Urin von Pat. U. isolierten Porphyringemisches sowie Zuordnung der einzelnen Fraktionen.

unterscheidet. Diese Interpretation stützt sich auf die bisher nicht bewiesene Annahme, dass alle Isomere die gleiche Lage der Soretbande aufweisen müssen. Es erscheint angebracht, diese naheliegende Annahme, die im Falle von UP-I/UP-III und CP-I/CP-III experimentell bestätigt wurde, einmal mit synthetischen Produkten bekannter Zusammensetzung und Struktur, die dem Verfasser nicht zur Verfügung standen, auf ihre Allgemeingültigkeit hin zu überprüfen.

Bei der Auftrennung der Hexacarboxylporphyrinfraktion (P 5) erhält man ebenfalls drei Fraktionen (P 5a, b und c, entsprechend F 4 und 3a³), deren λ_p -Werte innerhalb der Fehlerspanne der Bestimmung übereinstimmen ($\lambda_p = 403.5$ (5a), 403.4 (5b) und 403.3 (5c)). Hierbei weicht der für P 4b gemessene Wert von dem an anderer Stelle³ für die gleiche Fraktion (F 3a) angegebenen Wert ($\lambda_p = 404.7$ nm) deutlich ab. Diese Abweichung wird nun dadurch erklärt, dass diskrete Fraktionen höher carboxylierter Porphyrine (P 10 u.a.) F 3a überlagert sind und somit diese

Verschiebung der Peaklage nach höheren Werten hin bewirkt⁷. Es wird daher angenommen, dass es sich, entgegen der früheren Einordnung als 7-I^{2,3}, um ein Hexacarboxylporphyrin der Isomerenreihe I handelt (6-I). Über die Identifikation von P 5a (= F 4) wurde bereits ausführlich an anderer Stelle berichtet³.

Bei der Identifikation von P 5c, der bereits im ursprünglichen Porphyringemisch signifikant nachzuweisen war³, wurde Übereinstimmung zwischen λ_p - und x_D -Werten und den für Hexacarboxylporphyrine gemessenen beobachtet. Obwohl eine starke Überlagerung von P 5b/c vorliegt, die λ_p -Bestimmung, in der rechten Flanke von P 5c durchgeführt, somit nicht sehr genau sein kann, scheinen die vorliegenden Kriterien für das Auftreten einer Hexacarboxylfraktion der Isomerenreihe II oder IV zu sprechen.

Die Zerlegung von P 9, dessen Hauptbestandteil an anderer Stelle³ als Heptacarboxylporphyrin (7-III) identifiziert wurde, lieferte ebenfalls drei diskrete Fraktionen (P 9a, b und c), die auf das Vorliegen von Isomeren hinweisen. Während P 9b einen für Heptacarboxylporphyrine charakteristischen λ_p -Wert aufweist ($\lambda_p = 404.4$ nm), war eine solche Bestimmung für P 9c aus Intensitätsgründen nicht mehr möglich. Aus Analogiebetrachtungen kann daher gefolgert werden, dass P 9b ein 7-I-Porphyrin darstellt, eine Annahme, die durch die Übereinstimmung von λ_p -Wert und x_D -Wert mit den für Heptacarboxylporphyrine angenommenen hinreichend gestützt wird. Inwieweit es sich bei P 9c um ein weiteres Heptacarboxylporphyrin-isomere handelt, müsste durch weitere Untersuchungen an grösseren Probenmengen geprüft werden.

Bei der Auftrennung von P 11 wurden neben den erwarteten Fraktionen P 11e (UP-III) und P 11f (UP-I) noch vier weitere Fraktionen mit hohen λ_p -Werten bei relativ kleinen Elutionszeiten t_{El} erhalten. Hierdurch wird das Auftreten von hohen λ_p -Werten im Bereich kleiner Elutionszeiten t_{El} , für das an anderer Stelle eine befriedigende Erklärung nicht gefunden werden konnte^{2,3}, verständlich. Die zunächst naheliegende Vermutung, dass die sehr intensiv auftretenden Uroporphyrinisomere I und III, wegen Kapazitätsüberschreitung der Säule, bereits bei kleinen t_{El} -Werten aus der Säule austreten, ist damit hinfällig. Gleichzeitig geht jedoch hieraus eindeutig hervor, dass in dem untersuchten Porphyringemisch Fraktionen auftreten, die sich nicht mehr in die vier Isomerenreihen der normalen Porphyrine einordnen lassen. Vielmehr wird, wie bereits an anderer Stelle vermutet³, angenommen, dass diese Fraktionen sich in ihren Substituenten von den an der Hämsynthese beteiligten Porphyrinen bzw. den entsprechenden Isomeren unterscheiden. Dass es sich bei diesen Verbindungen um Porphyrinderivate handelt, kann zweifelsfrei aus dem Auftreten diskreter rotfluoreszierender Fraktionen bei der säulenchromatographischen Auftrennung und dem Vorliegen einer ausgeprägten Soretbande geschlossen werden. Zur Klärung der Struktur dieser Verbindungen und Ermittlung der Substituenten sind jedoch weitergehende Untersuchungen erforderlich, die über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinausgehen.

Die neben den normalen *n*-Carboxylporphyrinen ($n = 4, 5, 6, 7$ und 8) auftretenden Fraktionen (P 2, 3, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14) wurden z.T. (P 2, 3 und 10) extraktionschromatographisch im System TBP/1 N HCl aufgetrennt (Fig. 11). Weitergehende Untersuchungen zur Konstitutionsaufklärung waren aus Intensitätsgründen nicht möglich. Auch hier wird, wie vorangehend angedeutet, angenommen, dass es sich um Porphyrine mit abnormaler Substitution in den Seitenketten handelt.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Zerlegung komplexer Porphyringemische wird ein säulenchromatographisches Verfahren beschrieben, das eine Trennung der freien Porphyrine entsprechend des Carboxylierungsgrades auf TBP-Säulen im pH-Gradienten durchzuführen gestattet. Die den Elutionszeiten t_{El} entsprechenden Dissoziationsstufen x_D stellen charakteristische Kenndaten dar, die zur Identifizierung der einzelnen Porphyrinfractionen herangezogen werden können. Die durch die x_D -Werte gekennzeichnete innermolekulare Umlagerung bzw. Dissoziation der Carboxylgruppen, die absorptionsspektrophotometrisch anhand einer Verschiebung der Soretbande nachgewiesen werden kann, vollzieht sich innerhalb eines sehr engen pH-Intervalls (95.4% in 0.8–0.9 pH-Einheiten), worauf die relativ hohe Auflösung der Peaks in diesem Elutionschromatogramm zurückzuführen ist. Eine Auftrennung von Isomeren konnte selbst bei Gradientensteigungen von 0.1 pH-Einheiten/h bzw. 25 ml bisher nicht beobachtet werden.

Durch Kombination der beschriebenen Methode mit den an anderer Stelle angegebenen Verfahren (Extraktionschromatographische Auftrennung im TBP/1 N HCl-System^{2,3}; DC-Trennung im 2,6-Lutidin/Wasser-System) kann eine weitgehende Zerlegung selbst sehr komplexer Porphyringemische erzielt werden. So konnte das aus dem Urin von Pat. U. isolierte Porphyringemisch, das bei der DC-Trennung in neun, bei der EC-Trennung im TBP/1 N HCl-System in elf diskrete Fraktionen aufspaltete, durch Kombination der drei Verfahren in mind. 27 Fraktionen zerlegt werden! Eine Identifikation der einzelnen Porphyrine, die z.T. nur in sehr geringen Konzentrationen vorlagen, wurde anhand der gemessenen x_D -, λ_{p^-} , x_{p^-} und R_F -Werte vorgenommen. Hierbei liess sich ein grosser Teil der aufgefundenen Verbindungen nicht in das der Hämsynthese zugrundeliegende Schema einordnen. Es wird daher angenommen, dass in dem untersuchten Porphyringemisch von Pat. U. Verbindungen auftreten, deren Konstitution durch Substituentenaustausch sich von der normaler Porphyrine unterscheidet. Entgegen einer früheren Annahme kann nach den nun vorliegenden Ergebnissen das Auftreten der Isomeren von Typ II und/oder IV neben den bereits nachgewiesenen (Typ I und III) nicht ausgeschlossen werden. Zur endgültigen Bestätigung dieser Annahme sind jedoch weitergehende Untersuchungen, insbesondere solche mit synthetischen Produkte, zur Gewinnung von dringend benötigten charakteristischen Kenndaten (z.B. λ_{p^-} , x_D - und x_{p^-} -Werte) erforderlich.

LITERATUR

- 1 H. MUNDSCHEK, *Z. Anal. Chem.*, im Druck.
- 2 H. MUNDSCHEK, *J. Chromatog.*, 37 (1968) 431.
- 3 H. MUNDSCHEK, *J. Chromatog.*, 38 (1968) 106.
- 4 H. MUNDSCHEK, *Z. Anal. Chem.*, 233 (1968) 25.
- 5 P. R. EDMONDSON AND S. SCHWARTZ, *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 605.
- 6 H. MUNDSCHEK, *Intern. J. Appl. Radiation Isotopes*, 18 (1967) 365.
- 7 H. MUNDSCHEK, *Z. Anal. Chem.*, 226 (1967) 141.
- 8 A. NEUBERGER AND J. J. SCOTT, *Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A*, 213 (1952) 307.
- 9 A. COMFORT, *Biochem. J.*, 44 (1949) 111.
- 10 L. ERIKSEN, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 9 (1957) 97.
- 11 C. RIMINGTON AND R. V. BELCHER, *J. Chromatog.*, 28 (1967) 112.
- 12 H. MUNDSCHEK, *J. Chromatog.*, 25 (1966) 380.