

Die Darstellung von reinen Häminen

K. G. PAUL

*Medicinska Nobelinstitutet, Biokemiska avdelningen,
und Wallenbergstiftelsens laboratorium för fysiologisk kemi, Stockholm, Schweden*

Drei Methoden für Hämindarstellung werden mit dem Hämochromogenspektrum als Reinheitsprobe verglichen.

1. Rohporphyrin-Porphyrinester-reines Porphyrin-Hämin. Manchmal werden Produkte erhalten, deren Hämochromogenspektra eine erhöhte Absorption im Rot besitzen.

2. Rohporphyrin-Porphyrinester-Häminester-Hämin. Die Hämochromogenspektra der Häminester wiesen auch manchmal die Rotabsorption auf. Der dafür verantwortliche Abkömmling kann durch Chromatographie auf sekundärem Natriumphosphat weggenommen werden. Die molaren Absorptionskoeffizienten für solche Hämine, die nach Verfahren 3. nicht gereinigt werden können, sind dadurch bestimmbar.

3. Kuppelung eines Hämins mit dem Apoprotein eines Häminproteides und Chromatographie auf Anionenaustauscher. Die Hämochromogenspektra der so erhaltenen Häminproteide sind einwandfrei. Auf diesem Weg können 6,7-dikarboxylige Hämine gereinigt werden, möglicherweise auch Monokarboxyhämine.

Bei der Darstellung von Häminen* werden meistens die entsprechenden Porphyrine über ihre Methylester gereinigt. Nach Hydrolyse des Esters wird Eisen in die Porphyrine eingeführt. Die Reinheit der Hämine wird durch Elementaranalyse, Chromatographie auf Säule oder Papier und Spektrophotometrie geprüft. Auf Grund des Darstellungsverfahrens sind als wahrscheinlichste Verunreinigung Abkömmlinge des gewünschten Hämins zu erwarten. Die Elementaranalyse ist daher als Reinheitsprobe nur von beschränktem Wert. Für die spektrophotometrische Reinheitsprüfung muss das Hämin in eine Form gebracht werden, in der die Abkömmlinge gut hervortreten. Bei Häminproteiden kommen bisweilen eine nicht umkehrbare Inaktivierung und eine erhöhte Lichtabsorption im Rot zusammen vor. Diese Erhöhung, die bei Reduktion mit Dithionit in Gegenwart von hämochromogenbildenden Stoffen, z. B. CO, nicht verschwindet (vgl. Hämoglobin-Choleglobin), ist spektrophotometrisch leicht nachweisbar. Weil die Veränderungen in den Hämin-

* Hämin bedeutet in der vorliegenden Arbeit eine Eisen-Porphyrin-Verbindung im allgemeinen. Bluthämin wird Protohämin genannt.

abkömmlingen wahrscheinlich mit denen in den Häminproteiden verwandt sind, dürfte das Hämochromogen eine geeignete Form der Hämine für die spektrophotometrische Reinheitsprüfung sein. Es wurde bald gefunden, dass ein Hämochromogenspektrum ein Plateau oder sogar ein schwaches Maximum bei 600—620 m μ besitzen könnte, ohne dass das Hämin eine Uneinheitlichkeit im Papierchromatogram aufwies. Messungen des Hämochromogenspektrums wurden deshalb für die zuverlässigste Reinheitsprobe gehalten.

MATERIALIEN UND METHODEN

Alle molaren Lichtabsorptionskoeffizienten (β^*) sind auf Eisenbestimmungen mit Sulphosalicylsäure^{1,2} gegründet. Bei unzureichender Verbrennungszeit mit Schwefelsäure-Wasserstoffperoxyd zeigt die Blindprobe eine gelbe Nuance, die der von Eisen verursachten Farbe ähnelt und Werte bis zu $D_{434} = 0,1$ gibt. Bei der Verbrennung muss wenigstens 10 Min nach dem letzten Peroxydzusatz gekocht werden². Die Einführung des Eisens in die Porphyrine geschah nach den gewöhnlichen Methoden^{3,4}.

Für Papierchromatogramme wurde 2,6-Lutidin/Wasser 100/20, Whatman-Papier No. 1 und Zimmertemperatur verwendet, aber kein Ammoniakdampf im Gefäß^{5,6}.

Die Hämochromogene der freien Hämine mit Pyridin als Base wurden wie gewöhnlich⁷ erhalten (Pyridin/0,1 M NaOH 1/3 + Dithionit). Die Häminester wurden in über KOH destilliertem Pyridin gelöst und die Lösung mit einem Volumen von 0,2 M NaOH versetzt.

Meerrettichperoxydase war mit Dowex-2 gereinigt, nicht aber auf Karboxymethylcellulose chromatographiert⁸. Für die Spaltung wurde die Lösung mit 0,2 Vol. von 5 % NaCl und 0,1 M HCl bis an pH 2 versetzt und nach 5 Min in 10 Vol. Azeton von -13° unter Umrühren langsam gegossen. Das Eiweiss wurde in der Kälte abzentrifugiert, ohne Waschen in Wasser aufgelöst und über Nacht gegen kaltes Wasser dialysiert. Ein ähnliches Verfahren ohne Neutralisation wurde früher für Cytochrom c verwendet⁹. Die Peroxydaseaktivität in der Mesidinprobe war mit Protohämin vollständig wiederherstellbar.

Myoglobin I (Mb), von Herrn Å. Åkeson erhalten, wurde wie früher beschrieben¹¹ gespalten.

Bluthämin wurde nach Chu und Chu¹² oder Fischer¹³ erhalten (Tabelle 1). Koproporphyrin III wurde aus *Corynebact. diphtheriae*-Bouillon (von Dr. G. Norlin erhalten) isoliert¹⁴ (Fp. des Esters 153 und 178°, korr.). Koproporphyrin I, eine Gabe von Dr. J. J. Scott, enthielt nach Scott höchstens 5 % Koproporphyrin III. Mesoporphyrin I-Ester wurde aus der Fischer-Sammlung durch Professor S. Goldschmidt erhalten. Die übrigen Porphyrine wurden nach Fischer-Orth¹⁵ dargestellt. Zweimal kristallisiertes Cytochrom c wurde von Doz. S. Paléus erhalten.

Tabelle 1. Ausbeute an Protohämin (mg/100 ml Blut) und molare Absorptionskoeffizienten der α -Bande des Pyridinhämochromogens ohne Umkristallisierung.

Ausbeute	Darstellung nach	
	Fischer $\beta \times 10^{-7}$	Chu und Chu Ausbeute $\beta \times 10^{-7}$
210	6,45	440 7,68
470	7,38	300 7,79 **
360		350 7,72
		460 7,96

$$* \beta = \frac{1}{c} \times \frac{1}{d} \times \ln \frac{I_0}{I}; \quad \text{wo } c = \text{Konzentration in Mole} \times \text{cm}^{-3}$$

$$d = \text{Schichtdicke in cm}$$

** Nach Umkristallisierung 7,60.

ERGEBNISSE

Drei Wege für die Darstellung von reinen Häminen wurden probiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 gesammelt.

Tabelle 2. Molare Absorptionskoeffizienten der Hämochromogene für Hämine die nach den drei Methoden erhalten sind. Alle Wellenlängen mittels Beckman DU Spektrophotometer erhalten. "Rot" bedeutet die Wellenlänge 50 μ rotwärts der α -Bande.

Hämin	Methode	α -Bande		Minimum		β -Bande		Rot β
		λ	β	λ	β	λ	β	
PH	1 ¹⁾	556	7,44	540	2,05	525	3,65	0,18
PH	1 ²⁾	557	7,68	540	2,05	525	3,73	0,13
PH	1 ³⁾	557	7,60	540	2,11	525	3,79	0,24
Hämoglobin	4)	558	8,04	541	2,18	526	3,96	0,09
PH	3	557	7,83	541	2,03	526	3,70	0,11
MH	1	547	7,50	532	2,05	517	4,30	0,28
MH-Ester	2	546	7,80	532	2,01	514	4,39	0,20
MH	3	547	7,84	532	2,09	517	4,47	0,16
MH I	1	547	6,64	531	2,02	515	4,03	0,36
HH	1	550	5,71	535	2,40	519	3,79	0,55
HH	3	547	7,64	532	2,09	517	4,41	0,21
Zytochrom c	5)	551	7,18	537	2,01	522	4,28	0,18
DH	1	544	6,14	530	1,98	514	4,25	0,27
DH	1 ³⁾	544	6,46	530	2,00	514	4,42	0,24
DH-Ester	2	545	6,40	530	1,91	514	4,35	0,08
DH	2 ⁶⁾	544	6,03	530	1,90	515	4,21	0,25
DH	3	544	6,27	530	1,91	515	4,27	0,13
DiAcDH	1	574	3,22	555	2,12	539	2,40	0,32
DiAcDH	3	575	3,80	556	2,37	542	2,82	0,09
KH III	1	548	6,68	532	1,93	517	4,02	0,26
KH I	1	548	6,36	530	1,93	517	3,92	0,28
KH I-Ester	2	548	6,16	533	1,94	518	4,04	0,13

¹⁾ Nach Fischer. ²⁾ Nach Chu und Chu. ³⁾ Dasselbe Präparat umkristallisiert. ⁴⁾ Gewaschene Erythrozyten. ⁵⁾ In Pyridin-Lauge. ⁶⁾ Freies Deuterohämin nach Verf. 2 und Verseifung (2,2 μ Mole, S. 1616).

1. Rohporphyrin — Porphyrinester — reines Porphyrin — Hämin

Mesohämin wird als Beispiel gegeben.

Mesoporphyrin wurde mit Methanol-HCl verestert und durch Chromatographie (Aluminiumoxyd Merck, nach Brockmann, Grad IV, 125 mM Methanol in Chloroform¹⁶⁾ und Kristallisation bis zum konstanten Schmelzpunkt (216°) gereinigt. Der Ester wurde mit 4 M HCl bei Zimmertemperatur während 48 St verseift und das Porphyrin in Äther getrieben. Es wurde mit 0,02 M HCl gewaschen (geringe Ausbeute, verworfen) und das Porphyrin mit 0,15 M HCl herausgenommen. Gegenstromverteilung¹⁷ zeigte Einheitlichkeit. Der Äther wurde *in vacuo* verjagt, das Porphyrin ausgeflockt, gewaschen, getrocknet und in Hämin überführt.

Ohwohl das Porphyrin also bestimmt rein gewesen war, zeigte das Hämochromogenspektrum erhöhte Absorption bei 600—640 μ (Abb. 1). Eisen, als

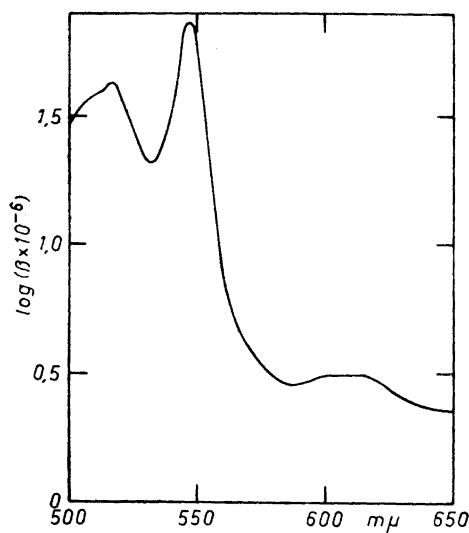


Abb. 1. Pyridinhämochromogen des Meso-hämins nach Verfahren 1 erhalten.

Eisen(II)Acetat, gab unter den Bedingungen der Hämochromogenbestimmung $\beta_{600} = 0,02 \times 10^7 \text{ cm}^2 \times \text{Mole}^{-1}$ und ist also als Ursache der Absorption auszuschliessen. Umkristallisation des Hämins aus Pyridin-Eisessig oder einfache Fällung aus alkalischer Lösung mit Überschuss an Säure reduzierte nicht die Absorption im Rot. Freies Porphyrin war in den Mutterlaugen nicht nachweisbar. Versuche, die erhöhte Absorption im Rot zu vermeiden durch Eiseneinführung in N_2 - oder CO_2 -Atmosphäre mit nachfolgender Oxydation des Ferroeisens mit Cerisulfat oder grossem Überschuss an Ferrichlorid blieben erfolglos. Die erhöhte Absorption im Rot trat auch hier öfters auf.

2. Rohporphyrin — Porphyrinester — Häminester — Hämin

Auch bei Eiseneinführung in Porphyrinester trat die erhöhte Absorption im Rot auf. Die Trennung von reinen Häminestern und ihren Abkömmlingen ging durch Chromatographie auf sekundärem Phosphat¹⁸ glatt.

Deuterohäminester wurde aus Protohämin über Deuteroporphyrinester (Reinigung wie beim Mesoester, Fp. 218°) erhalten und aus Chloroform-Eisessig kristallisiert (Fp. 242—244°). Nach Trocknen *in vacuo* über KOH wurde auf $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / Chloroform ($13 \times 1 \text{ cm}$) chromatographiert. Der Ester (4,8 μMole nach der Eisenbestimmung) wurde in Chloroform aufgetragen. 15 mM Methanol in Chloroform eluierte eine rote, gut begrenzte Fraktion (3,7 μMole), die sich bei wiederholtem Chromatographieren mit 10 mM Methanol nicht aufteilen liess. Deuterohäminester (Fp. 251°) kristallisierte aus Chloroform und kochsalzgesättigtem Eisessig. Aus der Säule war mit 70 mM Methanol nichts, mit reinem Methanol 0,4 μMole eluierbar; dabei sinterte die Säule.

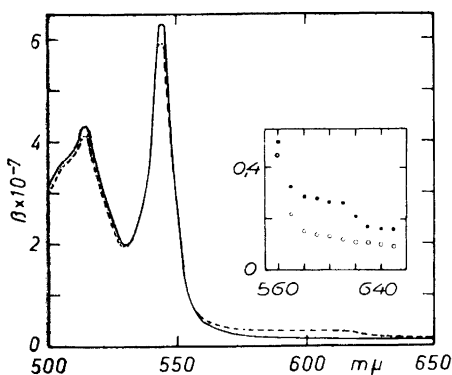


Abb. 2. Pyridinhämochromogen des Deuterohämoinesters vor (---) und nach (—) Chromatographie auf $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

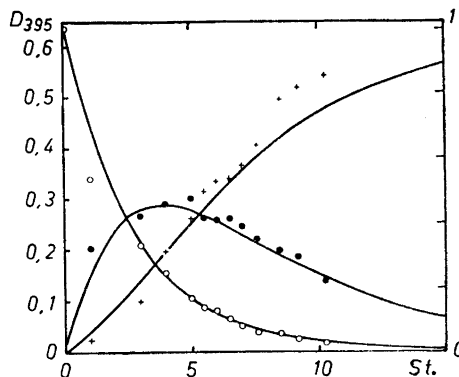


Abb. 3. Verseifung von Mesohämindimethylester mit HCl in Azeton. $\odot \bullet +$ bedeuten Absorption der Flecke mit R_F -Werten entsprechend Diester, Monoester und freies Hämin (Ordinate links). Kurven bedeuten Molbrüche (Ordinate rechts), für $k_1 = 0,360$ und $k_2 = 0,193 \text{ St}^{-1}$ berechnet.

Bei Umchromatographieren mit Gemischen von Chloroform und Methanol erwies sich diese Fraktion als uneinheitlich. Die Hämochromogenspektren der Ausgangsmaterialien und der roten Fraktionen sind in Abb. 2 gegeben.

In der nachfolgenden Verseifung des Hämინesters waren alkalische Lösungen wegen Gefahr der Hämინzerstörung zu vermeiden. Die Wahl des Lösungsmittels war bei der sauren Verseifung durch die Anwesenheit von sowohl Ester als freiem Hämın beschränkt. Für Hydrolyse bei Zimmertemperatur, z. B. für die Isolierung des Monoesters, war über Zinn(II)Chlorid gereinigtes Dioxan brauchbar. Bei Temperaturen über 40° trat aber allmählich merkbare Porphyrinfreisetzung und Bildung von Hämınabkömmlingen mit niedrigen R_F -Werten auf. Aceton wurde bei mässigen Temperaturen verwandt. Die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 der Verseifung wurden in einem Versuch experimentell bestimmt.



Während einer Verseifung (Abb. 3) wurden Proben entnommen, auf Papier chromatographiert, die Flecke ausgeschnitten und mit kochendem Eisessig eluiert. Die R_F -Werte waren 0,92 (0,87—0,96), 0,80 (0,74—0,84) und 0,68 (0,61—0,77). Diester und freies Hämın als Vergleichsstoffe gaben den ersten bzw. letzten Wert. Die Konstanten k_1 und k_2 wurden berechnet¹⁹ aus

$$\begin{aligned} \text{Diester}_{t_1} &= \text{Diester}_{t_0} \times e^{-k_1 t_1} \\ \text{Freies Hämın} &= 2 (1 - e^{-k_2 t_1}) - (1 - e^{-k_1 t_1}) \\ \text{Diester} + \text{Monoester} + \text{freies Hämın} &= 1 \end{aligned}$$

Die Molbrüche wurden aus den Lichtabsorptionen erhalten, z. B.

$$\text{Diester} = \frac{\text{Abs. d. Fleckes mit } R_F = 0,92}{\text{Summe Abs. d. drei Flecke}}$$

k_1 wurde als $0,360 \text{ St}^{-1}$ gefunden. k_2 wurde aus den Messwerten für sowohl freies Hämin als auch Monoester berechnet; beide Möglichkeiten gaben den Wert $0,193 \text{ St}^{-1}$. Wenn Dioxan-10 M HCl, 2:1, für die Verseifung verwendet wurde verschwand der Diester bei 100, 50 und 20° mit den Geschwindigkeiten $t_{\frac{1}{2}}$ 0, 8, 40 und 1 200 Min, was eine scheinbare Aktivierungsenergie von 21 000 cal/Mol entspricht.

4,2 μ Mole von Deuterohäminester, die auf sekundärem Phosphat (15 mM Methanol in Chloroform) gereinigt waren, wurden bei 50° während 4 St in geschmolzenem Rohr mit 0,8 ml 8 M HCl in 4 ml Aceton verseift. Die Lösung wurde dann mit Chloroform verdünnt und mit Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Das dabei ausgefallene freie Hämin (2,2 μ Mole) war papierchromatographisch einheitlich. Sein Hämochromogen zeigte aber im Vergleich mit dem des Esters erhöhte Absorption im Rot mit einem Maximum bei 602 m μ . Ein Teil der Chloroformlösung wurde getrocknet (Tabelle 2) und auf einer Phosphatsäule ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}/\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ 1/10, $10 \times 1 \text{ cm}$, rein Chloroform) chromatographiert, erwies sich aber als uneinheitlich mit niedrigem Quotient α -Bande/Minimum.

3. Kuppelung an das Apoprotein eines Häminproteides und Isolierung des wiedergebildeten Häminproteides

Eine dritte Möglichkeit wäre, ein Hämin, z. B. nach Methode 1 erhalten, mit einem Ionenaustauscher reagieren zu lassen, aus dem die Abkömmlinge durch reines Hämin völlig verdrängt werden. Ein Ionenaustauscher mit solchen Eigenschaften wäre möglicherweise im Apoprotein eines Häminproteides zu erwarten. Der Arbeitsgang würde demnach, das Apoprotein mit einem — nach dem Gewicht oder der Eisenmenge — so grossen Überschuss an Hämin reagieren zu lassen, dass das molare Verhältnis 1:1 zwischen reinem Hämin und Apoprotein überschritten würde. Der Überschuss an reinem Hämin und die Abkömmlinge wären dann mit einem unspezifischen, starken Anionenaustauscher wegzunehmen.

Meerrettichperoxydase, Pferdeleberkatalase, Methämoglobin, Karboxyhämoglobin, Metmyoglobin und Karboxymyoglobin wanderten auf Dowex-2 (200—400 mesh, 8 % Querbindung, pH 7,4, 0,03—0,15 M Phosphat) mit R_F -Werten $>0,9$. Bei niedriger Durchlaufgeschwindigkeit der Flüssigkeit wurde freies Hämin als eine braune Zone am obersten Teil der Säule adsorbiert, bei hoher Geschwindigkeit aber verfärbte sich die ganze Säule braun. Die Reaktion zwischen Hämin* und Austauscher war also nicht momentan. Bei konstanter Durchlaufgeschwindigkeit war die Länge der braunen Zone dem Häminüberschuss proportional. Für die Vermeidung von freiem Hämin im Eluat wurde immer das Chromatographieren während etwa einer halben Stunde unterbrochen sobald die Lösung in der Säule gesunken war; erst dann wurde das Häminprotein eluiert.

Aus Protohämin und Peroxydaseapoprotein rekombinierte Peroxydase war von ungespaltener Peroxydase auf Dowex-2 nicht zu trennen. In qualitativen

* In NaOH-Phosphat, s. unten.

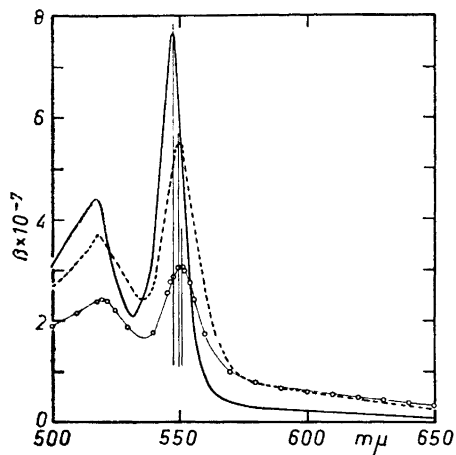


Abb. 4. Pyridinhämochromogen des Hämatohämins vor (---) und nach (—) Kuppelung an Apomyoglobin und Chromatographie auf Dowex-2. —○— ist das Hämochromogenspektrum der mit 1 M HCl eluierten Fraktion. Die Säule war nach der Eluierung mit der Säure nicht häminfrei, weswegen die Kurven nicht ohne weiteres addiert werden können.

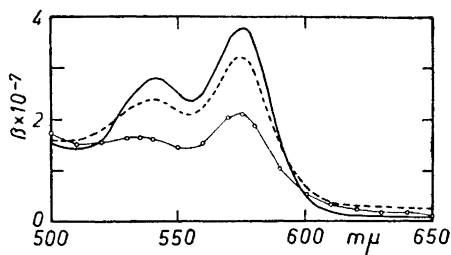


Abb. 5. Pyridinhämochromogen des Diacetyldeuterohämins. Symbolen vgl. Abb. 4.

Versuchen mit einigen Häminen zeigten die Hämochromogenspektren der rekombinierten und chromatographierten Peroxydase in Vergleich mit den der Ausgangshämene gesteigerte Verhältnisse zwischen Maxima und Minima und Verschwinden der Erhöhung im Rot. Apoprotein "wählt" also reines Hämin aus. Kuppelung ohne Chromatographie von Apoperoxydase mit einer nach dem Eisengehalt äquivalenten Häminmenge beeinflusste nicht das Hämochromogenspektrum.

Bei der Bestimmung der molaren Absorptionskoeffizienten der verschiedenen Hämochromogene wurde wegen des grossen Materialverbrauches in den Eisenbestimmungen Myoglobin I statt Peroxydase verwendet. Rekombiniertes Hämoglobin dürfte mit ungespaltenem Hämoglobin nicht identisch sein²⁰. Rekombiniertes und ungespaltenes Myoglobin I zeigen identische Kristallformen, Spektren und elektrophoretische Eigenschaften¹¹, auch waren sie auf Dowex-2 nicht zu trennen. Es dürfte deshalb gestattet sein, Myoglobin-Apoprotein als "Ionenaustauscher" zu verwenden obwohl die gasbindende Wirkung hier nicht geprüft wurde.

Für jede Kuppelung wurde abgemessen

Mb-Apoprotein	(0,58 μMole/ml)	3,0 ml
Phosphatpuffer	(0,03 M, pH 7,3)	0,2 ml
Hämin	(in M/30 NaOH, NaOH : Hämin = 5)	0,5 ml
Hämin/Protein = 2		

Nach 55 St im Kühlschrank wurden die Lösungen chromatographiert (Dowex-2, 15 × 1 cm, 0,03 M Phosphat, pH 7,3) und Hämochromogen und

Eisen in den Eluaten bestimmt. Die Reinigungen von Hämatohämin und Diacetyldeuterohämin werden als Beispiele gegeben (Abb. 4, 5).

Ausser Apoperoxydase und Apomyoglobin wurde Serumalbumin für die Reinigung probiert. Bei dem Verhältnis 1:1 zwischen Protohämin und Albumin wurde das Hämin von der Säule quantitativ aufgenommen. Bei derselben Durchlaufgeschwindigkeit zog sich aber die braune Farbe weiter hinunter als in Abwesenheit von Eiweiss. Je grösser das Verhältnis von Albumin zu Hämin war je weiter färbte sich die Säule braun, und Hämin trat zuletzt im Eluat auf. Keine Reinigung des Hämins wurde dabei beobachtet. Durch Alter völlig inaktivierte Apoperoxydase verhielt sich wie Serumalbumin.

Verfahren 3 wurde auf einigen anderen Porphyrinverbindungen als 6,7-Dikarboxyl-Häminen geprüft. Apomyoglobin und die oben (S. 1617) gegebenen Bedingungen wurde benutzt. Mesohämin I (6,8-diCOOH) wurde bei dem Verhältnis Hämin/Protein 1:1 von dem Anionenaustauscher zurückgehalten und zwar so, dass der oberste Teil der Säule am stärksten gefärbt wurde mit abwärts abnehmender Verfärbung ohne getrennten Fraktionen. Mit Überschuss an Eiweiss oder schnellem Chromatographieren wurde die ganze Säule braun. Koprohämin III (2,4,6,7-tetraCOOH) gab einen ähnlichen Befund aber ausgeprägter, so dass das Hämin am Anfang der Säule eine scharfe Bande bildete.

Tabelle 3. Chromatogramme auf Dowex-2 Häminisomeren nach Kuppelung an Apoperoxydase. Apoenzym (0,40 ml = 0,72 mg N) und Hämin (0,60 = 0,01 mg N, Hämin:Eiweiss 2,5) während 10 St bei Zimmertemperatur gelassen. Alle Lösungen und Puffern pH 7,6, 0,03 M Phosphat. 0,80 ml der Gemische wurden für Chromatographie genommen. Säulen: Dowex-2, 16 × 0,9 cm.

Hämin	Gesamt-N im Eluat mg	$\frac{D_{400}}{D_{280}}$ im Eluat
MH IX	0,50	2,67
MH I	0,52	1,98
KH III	0,52	0,40
KH I	0,55	0,24
Apoperoxydase	0,54	0,02

Koprohämin I (2,4,6,8-tetraCOOH) benahm sich genau wie sein Isomer. Aus Tabelle 3 geht hervor, dass das Eiweiss bei den drei Häminen fast quantitativ eluiert wurde. Bei Pyrrohämin (7-monoCOOH) war der Befund wegen der niedrigen Löslichkeit dieser Verbindung in Lauge nicht ganz klar. Eine freie, wandernde Bande war aber gut wahrnehmbar; bei Umchromatographieren auf Dowex zeigte sie Einheitlichkeit. Mesoporphyrin IX (6,7-diCOOH) zeigte zwar eine Spektrumänderung bei Zusatz von Apomyoglobin oder Serumalbumin, bei Chromatographieren auf Dowex-2 wurde es aber zurückgehalten, und das Eiweiss trat im Eluat allein auf. Kobalt (III) Mesoporphyrin IX gab denselben Befund wie die 6,7-Dikarboxyl-Hämene. Es wird auch hier daran erinnert, dass die geprüften Eisen(II)Protoporphyrin-Protein-Verbindungen ohne Zerlegung wanderten. Karboxyhämoglobin wanderte schneller als Methämoglobin und Paraperoxydase schneller als Peroxydase; in beiden Fällen waren die relativen R_F -Werte etwa 1:0,9. Diese Beobachtungen stimmen mit denen bei elektrophoretischen Untersuchungen überein.

DISKUSSION

Das übliche Verfahren für Hämindarstellung, hier als Methode I bezeichnet, gibt zwar bisweilen Präparate, deren Pyridinhämochromogenspektren niedrige Absorption im Rot zeigen. Meistens aber werden Spektren erhalten, die im Vergleich mit den Hämochromogenspektren von z. B. Erythrocyten oder Cytochrom c gesteigerte Absorption im Rot zeigen. Niedrige Absorption gibt auch aus Blut isoliertes Protohäm. Mit dem beschriebenen Verfahren für die Reinigung von Mesoporphyrin ist es sicher, dass das Porphyrin rein war. Das deutet auf die Eiseneinführung, wahrscheinlicherweise die mit den Redoxverläufen verbundene Bildung von freien Radikalen, als das schädigende Moment. Der geringe Wert τ der Umkristallisierung aus Pyridin-Eisessig als Reinigungsmethode für schon kristallisierte Hämine wurde bestätigt.

Auch wenn es nicht gelungen ist die Verseifung des Häminesters ohne Nebenreaktionen durchzuführen sind doch die molaren Absorptionskoeffizienten des Hämochromogens des freien Hämins mittels dem Ester erreichbar. Bei der Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 der Verseifung wurde dieselbe molare Absorption in Eisessig für Diester, Monoester und freies Häm in angenommen. Dies mag nur annähernd richtig sein, weil eine Auflösung von freiem Häm in Eisessig nicht stabil ist, und ein Zuwachs der Gesamtabsorption von etwa 10 % während der Verseifung (Abb. 3) wurde in der Tat beobachtet. Dies erklärt warum k_2 etwas grösser als $k_1/2$ gefunden wurde. Die k -Werte zeigen, dass die beiden Carboxylgruppen von einander unabhängig verseift werden.

Die Reinigung mittels Apoprotein gelang bei Proto-, Meso-, Hämato-, Deutero- und Diacetyldeuterohäm, die alle zwei Carboxylgruppen, in 6- und 7-Stellung, besitzen. Die Hämochromogenspektren der vier erstgenannten sind einander sehr ähnlich mit einer engen α -Bande. Aus Abb. 4 geht hervor, dass die Hämatohäminkömmlinge nicht nur flachere sondern auch langwelligere Hämochromogenbanden als das reine Häm besitzen. Es war darum von Interesse zu finden, dass Diacetyldeuterohäm, trotz der Ausdehnung und Rotverschiebung seines Hämochromogenspektrums, durch Kuppelung und Anionenaustauscherchromatographie gereinigt werden konnte (Abb. 5). Die relativen Affinitäten der fünf Dicarboxyl-Hämine zu Apoproteinen werden in einer späteren Arbeit näher untersucht; hier wird nur vorläufig erwähnt, dass die Proto-, Meso- und Hämatohämperoxydase dieselbe Aktivität in der Mesidinprobe zeigen; Diacetyldeuterohäm dagegen ist völlig inaktiv.

Die fünf genannten 6,7-Dicarboxyl-Hämine (Eisen(III)Porphyrine) ebenso wie Kobalt(III)Mesoporphyrin, Eisen(II)Protoporphyryn und Pyrrohäm wanderten, nach Kuppelung an Apoeiweiss, wie gut begrenzte Banden abwärts auf der Säule. Das Eluat konnte mehrmals ohne Aufteilung umchromatographiert werden. Alle anderen geprüften Hämine und Mesoporphyrin IX wurden trotz »Kuppelung« von der Säule adsorbiert. Die Versuche mit verschiedenen Eiweisskörpern — zwei nativen Apoproteinen und zwei unspezifischen Substanzen (Serumalbumin und gealterte Apoperoxydase) — zeigen, dass eine bestimmte Konfiguration im Träger vorhanden sein muss. Es mag angenommen werden, dass die Konfiguration zwei Gruppen umfasst, die imstande sind mit den Häminkarboxylgruppen 6 und 7, oder mit an-

deren Säuregruppen, die ebensoweit von einander getrennt sind, zu reagieren. Gekuppeltes Mesohäm in I bekomme dadurch eine freie Karboxylgruppe, die mit Dowex reagieren könnte. Nach dem Befund mit Pyrrohäm in genügen Eisen + eine Karboxyäthylgruppe um eine einheitlich wandernde Verbindung zu schaffen. Mesoporphyrin IX zeigt, dass die Karboxylgruppen nicht allein die Bindung Wirkungsgruppe-Eiweiss vermitteln können. Bei pH 7,3 sind die pyrrolischen Stickstoffatomen ungeladen²¹, und man muss deshalb schliessen, dass bei den Karboxylgruppen in Mesoporphyrin IX das Apoeiweiss von dem Dowex ersetzt wird. In Kobaltmesoporphyrin gibt es noch eine Bindungsmöglichkeit.

Der Befund bei Koprohäm in III wäre verständlich wenn das Häm in, ausser dem Eisen, mit nur einer Karboxylgruppe oder einem "falschen" Paar (2—4, 4—6 oder 2—7, nicht aber 6—7) an dem Eiweiss gebunden wäre oder sonst die Bindung Häm in-Anionenaustauscher stärker als die Bindung Häm in und Protein wäre. Die Frage kann nicht beantwortet werden, weil die möglichen Abstände zwischen Eisen und Karboxylgruppen und die Reihenfolge der vier Dissoziationen unbekannt sind. Aus dem Versuch mit Koprohäm in I kann nur geschlossen werden, dass die beiden isomeren Porphyrinen als Hämine unter den hier benutzten Bedingungen nicht zu trennen sind. Bei allen Häminen besteht die Möglichkeit, dass Eisen und Karboxylgruppen in der Bildung von Häm inaggregaten teilnehmen. Es ist aber nicht klar warum sich die Koprohäm ine von den dikarboxyiligen Häminen unterscheiden sollten.

Die Stickstoffatome in Dowex sind bei pH 7 positiv geladen, und eine Eisen-Stickstoff-Bindung ist deshalb sehr unwahrscheinlich²². Dowex-2 besitzt eine alkoholische Hydroxylgruppe, und Alkohole bilden mit Häm in Komplexe¹⁵. Eine Esterbildung ist aber unter den gegebenen Bedingungen bei günstigen sterischen Verhältnissen möglich. Es ist auffallend, dass die Reaktion zwischen Dowex und Häm in so viel Zeit braucht und auch, dass adsorbiertes Häm in mit hohen Eiweisskonzentrationen nicht zu eluieren ist.

Die Beobachtung, dass die Abkömmlinge lockerer als die entsprechenden nativen Hämine gebunden sind, steht in Übereinstimmung mit der Auffassung, dass der Hämoglobinabbau am Häminteil beginnt. Die Bindung an Globin würde dabei aufgelockert werden, und die prosthetische Gruppe könnte von anderen Trägern übernommen werden.

Für die freundliche Überlassung von Präparaten werden gedankt Herrn Å. Åkeson (Myoglobin I) und Doz. S. Paléus (Cytochrom c), Medicinska Nobelinstitutets biokemiska avdelning, Stockholm, Dr. G. Norlin (*Corynebact. diphtheriae*-Bouillon), Statens bakteriologiska Laboratorium, Stockholm, Prof. S. Goldschmidt (Mesoporphyrin I-Ester), Organisch-chemisches Institut, München und Dr. J. J. Scott (Koproporphyrin I-Ester) National Institute for Medical Research, London.

Fräulein A. Harthoorn hat sehr wertvolle Assistenz geliefert. Die Untersuchung wurde von *Statens naturvetenskapliga forskningsråd* unterstützt.

LITERATUR

1. Lorber, F. *Biochem. Z.* **181** (1927) 391.
2. Paul, K. G. *Acta Chem. Scand.* **2** (1948) 430.
3. Warburg, O. und Negelein, R. *Biochem. Z.* **244** (1932) 239.

4. Erdman, J. G. und Corwin, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **69** (1947) 750.
5. Rimington, C. und Nicholas, R. E. H. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1** (1949) 12.
6. Kehl, R. und Stich, W. *Z. physiol. Chem.* **289** (1951) 6.
7. Paul, K. G., Theorell, H. und Åkeson, Å. *Acta Chem. Scand.* **7** (1953) 1284.
8. Paul, K. G. *Acta Chem. Scand.* **12** (1958) 1312.
9. Paul, K. G. *Acta Chem. Scand.* **5** (1951) 379.
10. Paul, K. G. und Avi-Dor, Y. *Acta Chem. Scand.* **8** (1954) 649.
11. Theorell, H. und Åkeson, Å. *Ann. Acad. Sci. Fennicæ A* **60** (1955) (*Festschrift Virtanen*).
12. Chu, T. C. und Chu, E. J.-H. *J. Biol. Chem.* **212** (1955) 1.
13. Fischer, H. *Org. Syntheses* **31** (1941) 53.
14. Gray, C. H. und Holt, L. B. *Biochem. J.* **43** (1948) 191.
15. Fischer, H. und Orth, H. *Die Chemie des Pyrrols*, Leipzig 1937.
16. Nicholas, R. E. H. *Biochem. J.* **48** (1951) 309.
17. Paul, K. G. *Scand. J. Clin. Lab Invest.* **5** (1953) 212.
18. Paul, K. G. *Unveröffentlicht*.
19. Getman, F. H. und Daniels, F. *Outlines of Physical Chemistry*, Ed. 7, John Wiley & Sons, New York und London 1941.
20. Wyman, J. Jr. *Advances in Protein Chem.* **4** (1948) 406.
21. Neuberger, A. und Scott, J. J. *Proc. Roy. Soc. London A* **213** (1952) 307.
22. Cowgill, R. W. und Clark, W. M. *J. Biol. Chem.* **198** (1952) 33.

Eingegangen am 13. Juni 1958.