

ÜBER DIE FLUORESSENZ DER PORPHYRINE IM ADSORBIERTEN ZUSTAND

K. WEBER und D. DJURIĆ

*Institut für medizinische Forschung und Arbeitsmedizin der Jugoslawischen Akademie
für Wissenschaft und Kunst, Zagreb
(Eingegangen am 10. III. 1961.)*

Die Porphyrine werden an der Oberfläche verschiedener fester Stoffe – wie Tierkohle, Oxyde und Hydroxyde der Erdalkalien, Filtrierpapier, Glasfaser – gut adsorbiert. Sind die Adsorbentien farblos oder weiss, so zeigen die Adsorbate die charakteristische Fluoreszenz der Porphyrine bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht. In bestimmten Fällen wird durch den Adsorptionsvorgang die Intensität der Fluoreszenz der Porphyrine erhöht. Es werden photoelektrische Methoden zur Messung der Fluoreszenzintensität der Porphyrinadsorbate beschrieben. Die Bedeutung solcher Messungen für die quantitative Bestimmung der Porphyrine im Harn und in anderem biologischen Material wird besprochen. Auf Grund der Versuche über die Fluoreszenzintensität der Porphyrinadsorbate können Annahmen über den Bindungszustand der Porphyrine an den Adsorbentien gemacht werden.

Es ist bekannt, dass Porphyrine an verschiedenen festen Stoffen gut adsorbiert werden und diese Eigenschaft hat man öfter zur Isolierung, Reinigung und physikalisch-chemischen Erforschung der Porphyrine herangezogen (1). Als Adsorbentien kommen vorwiegend Tierkohle, Oxyde und Hydroxyde der Erdalkalien und des Aluminiums, schwerlösliche Phosphate, Silikate, Filtrierpapier und Glasfaser in Frage. Die Bindung der Porphyrine an den Adsorbentien ist gewöhnlich sehr fest und sie können oft nur durch chemische Zerlegung des Adsorbates (Auflösung des Adsorbens) wieder in Freiheit gesetzt werden. Diese Tatsache kann hinderlich sein bei der präparativen oder analytischen Bearbeitung von Porphyrinlösungen.

Porphyrinadsorbate an farblosen, bzw. »weissen« Adsorbentien weisen bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht die intensive rote Fluoreszenz des betreffenden Porphyrins auf (2). Dieser Fluoreszenz der Adsorbate widmeten wir unsere Aufmerksamkeit in Anbetracht der Möglichkeit durch direkte fluorometrische Messungen an Adsorbaten Konzentrationsbestimmungen der Porphyrine vornehmen zu können. Da wir

beobachtet haben, dass in bestimmte Fällen die Adsorbate wesentlich intensiver fluoreszieren als die entsprechenden Lösungen, war anzunehmen, dass durch die fluorometrischen Messungen an Adsorbaten eine grössere Empfindlichkeit der Porphyrinbestimmung erzielt werden könnte.

DIE VERSUCHSMETHODEN

Nachdem wir festgestellt haben, dass frisch gefälltes Magnesiumhydroxyd die Porphyrine sehr gut adsorbiert und intensiv fluoreszierende Adsorbate ergibt, wurden die Untersuchungsobjekte durch Fällung von $Mg(OH)_2$ in den alkalischen Porphyrinlösungen dargestellt und die Fluoreszenz dieser Fällungen wurde direkt fluorometrisch gemessen. Die Messobjekte stellten also Aufschlammungen von Magnesiumhydroxyd mit adsorbiertem Porphyrin in alkalischen wässrigen Lösungen dar, wobei sich bezüglich der fluorometrischen Messmethodik zwei Möglichkeiten ergaben. Die Messungen konnten bei durchfallendem, oder aber bei auffallendem primären (anregendem) ultraviolettem Licht durchgeführt werden. Die zweite Möglichkeit schien deshalb wesentlich zu sein, weil die Aufschlammungen mit grösserer Niederschlagsmenge in bestimmten Fällen auch nur eine sehr geringe Durchlässigkeit für Licht haben können. Wir haben beide Möglichkeiten der Messung realisiert.

Bei dem Fluorometer für *durchfallendes* Licht (3) diente als Lichtquelle eine Quarzquecksilberlampe, deren Licht durch eine Kupfersulfatlösung (5%, Schichtdicke 1 cm) und ein Nickeloxydschwarzglas (Schichtdicke 4 mm) filtrierte auf das Untersuchungsobjekt fiel. Das vom Objekt durchgelassene ultraviolette Licht ($\lambda = 365 \text{ m}\mu$) wurde in einer Pikrinsäure-Gelatinefolie (4), die als Sperrfilter diente, absorbiert. Das emittierte Fluoreszenzlicht wirkte auf das Selenphotoelement, dessen Photostrom durch ein empfindliches Spiegelgalvanometer gemessen wurde.

Bei dem Fluorometer mit *auffallendem* Licht fällt das anregende filtrierte ultraviolette Licht einer Quecksilberhochdrucklampe unter einem Winkel von 45° in Bezug auf die Messrichtung, auf die Oberfläche des Messobjektes. Das Fluoreszenzlicht wird gleichfalls bei Verwendung eines Sperrfilters mittels Selenelement und Spiegelgalvanometer gemessen.

Die Messungen wurden an Lösungen und Adsorbaten von Haematoporphyrin, Koproporphyrin und Uroporphyrin III vorgenommen. Das Haematoporphyrin war ein Handelsprodukt und das Kopro- bzw. Uroporphyrin wurde aus dem Urin von Personen die an chronischer Bleivergiftung bzw. Porphyria cutanea tarda erkrankt waren, isoliert. Als Lösungsmittel diente für Haematoporphyrin 1%-ige Salzsäure, für Koproporphyrin 10%-ige Schwefelsäure (5) und für Uroporphyrin 1,0 norm. Salzsäure. Die Konzentration der Porphyrine in den Messlösun-

gen wurde in den Grenzen von 0,00026 bis 1,40 mg % variiert. Das Volumen der Messobjekte war stets 20 ml. Die Aufschlammungen der Adsorbate wurden in den Porphyrinlösungen durch Zusatz von 2 ml 10 norm. NaOH, Fällung des Niederschlages mit 4 ml 1,0 mol. Lösung von Magnesiumsulfat und Auffüllung mit Wasser auf 20 ml erhalten. Unmittelbar vor der Messung wurden die Aufschlammungen gut durchgeschüttelt.

DIE VERSUCHSERGEBNISSE

Die Abbildungen 1, 2 und 3 zeigen einige der erhaltenen Versuchsergebnisse und sie stellen die Fluoreszenzintensitäten (Φ) in Abhängigkeit von der Porphyrinkonzentration (c) bei Messung im auffallenden

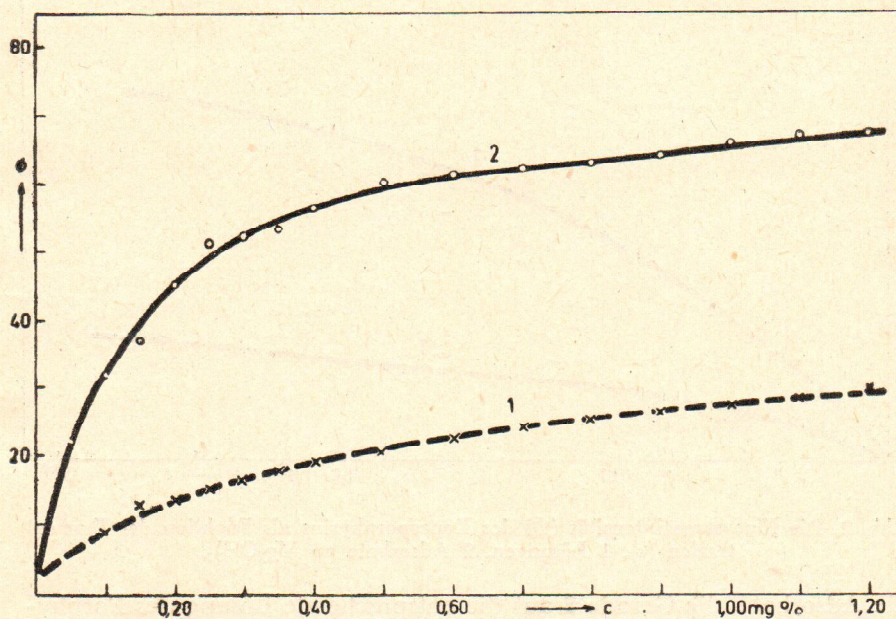


Abb. 1. Die Fluoreszenzintensität (Φ) des Haematoporphyrins als Funktion der Konzentration (c). 1. Lösungen, 2 Adsorbate an $Mg(OH)_2$.

Licht graphisch dar. Die Kurven mit der Bezeichnung 1 beziehen sich auf Lösungen und die Kurven 2 auf Adsorbate. Es ist ersichtlich, dass in allen Fällen die Adsorbate wesentlich höhere Fluoreszenzintensitäten ergeben, als die entsprechenden Lösungen.

Die Abb. 4 bezieht sich auf Lösungen mit sehr kleinen Konzentrationen des Koproporphyrins und auf Messungen im durchfallenden Licht. Diese Konzentrationen liegen in den Grenzen der physiologischen Mengen des Koproporphyrins im menschlichen Harn und es ist ersicht-

lich, dass durch die Adsorptionsmethode wesentlich höhere Fluoreszenzintensitäten und dadurch empfindlichere fluorometrische Bestimmungen auch für sehr kleine Porphyrinkonzentration zu erreichen sind.

Die Abb. 5. zeigt Änderung der Fluoreszenzintensität mit der Konzentration des zugesetzten Magnesiumsulfates, also mit der Menge des Niederschlages in der Aufschlämmung, bei konstanter Konzentration des Haematoporphyrins. Die Kurve 1 dieser Abbildung bezieht sich auf

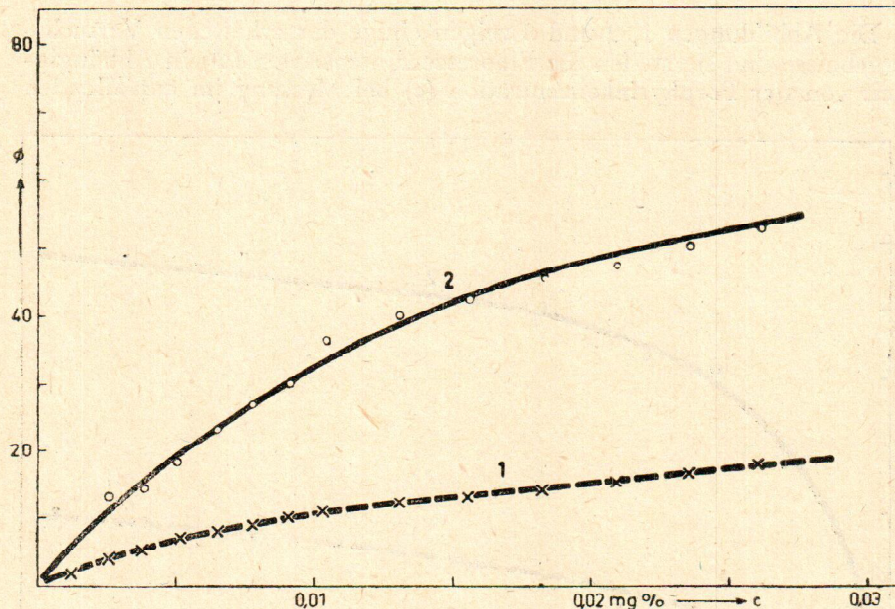


Abb. 2. Die Fluoreszenzintensität (Φ) des Koproporphyrins als Funktion der Konzentration (c). 1 Lösungen, 2 Adsorbate an $Mg(OH)_2$.

die Adsorbate, die Gerade 2 auf die entsprechende Lösung des Porphyrins, und die Kurve 3 gibt die Intensität der Eigenfluoreszenz des $Mg(OH)_2$ wieder. Diese Eigenfluoreszenz des Adsorbens ist – wie ersichtlich – gering und sie wird im Adsorbat noch wesentlich vermindert durch die Verminderung der Lichtabsorption im Adsorbens nach der Adsorption des Porphyrins. Da die Porphyrine das anregende ultraviolette Licht wesentlich stärker absorbieren als das Magnesiumhydroxyd, erfolgt im Adsorbat eine Absorptionsverteilung des Lichtes zu Gunsten des Porphyrins, wodurch die Eigenfluoreszenz des Adsorbens wesentlich herabgesetzt wird. Weiterhin ist ersichtlich, dass die Adsorbate bei jeder Menge des Adsorbens in der Aufschlämmung wesentlich intensiver fluoreszieren als die Lösung des Porphyrins.

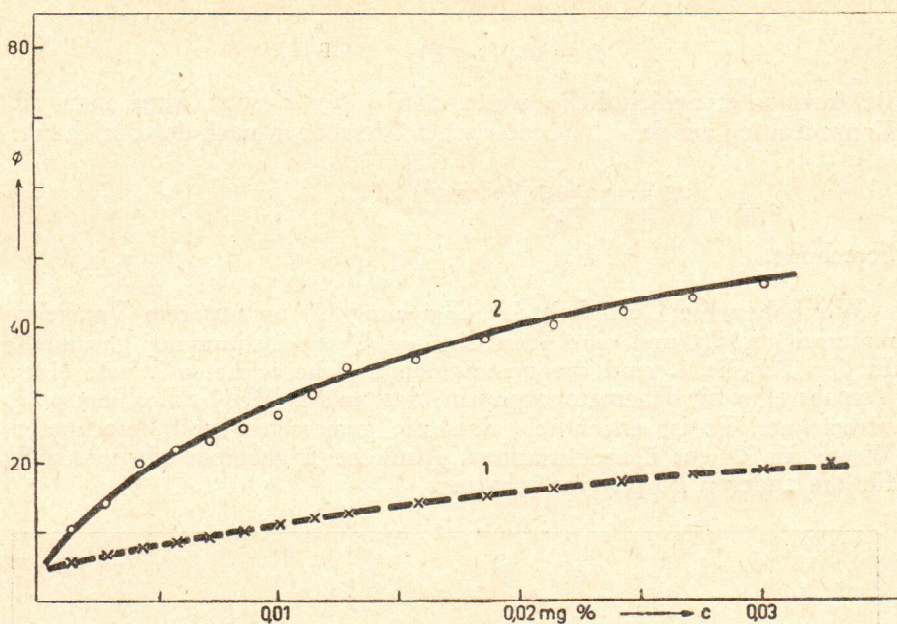


Abb. 3. Die Fluoreszenzintensität (Φ) des Uroporphyrins III als Funktion der Konzentration (c). 1 Lösungen, 2 Adsorbate an $\text{Mg}(\text{OH})_2$.

Will man den Verlauf der Intensitäts-Konzentrationskurven der Adsorbate (Kurven 2 der Abb. 1. 2. 3. und 4.), die als fluorometrische Eichkurven betrachtet werden können, rechnerisch interpretieren, so ist zu beachten, dass die Werte der Fluoreszenzintensität durch die Lichtabsorption (A) der adsorbierten Porphyrinmoleküle und weiterhin durch einen Faktor (k) bedingt werden, den man als Fluoreszenzausbeute bezeichnet. Nimmt man auch für die adsorbierten Porphyrine die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes an, so erhält man für die Fluoreszenzintensität (Φ) die Gleichung:

$$\Phi = k \cdot A = k \cdot J_0 (1 - 10^{-\epsilon c p}) \quad (1)$$

in welcher J_0 die Intensität des anregenden ultravioletten Lichtes, ϵ den Extinktionskoeffizienten, c die Konzentration des Porphyrins und p die Schichtdicke bedeuten. Ist die Konzentration so gross, dass die Lichtabsorption praktisch vollständig zu betrachten ist, so wird eine maximale Fluoreszenzintensität erreicht (Φ_m), für die offenbar:

$$\Phi_m = k \cdot J_0 \quad (2)$$

zu setzen ist. Durch Verbindung der Gleichungen (1) und (2) erhält man für eine beliebige Porphyrinkonzentration:

$$\Phi = \Phi_m (1 - 10^{-\varepsilon c p}) \quad (3)$$

Bei konstanter Schichtdicke, wenn man $\varepsilon \cdot p = \varepsilon'$ setzt, kann man die Konzentration aus den fluorometrischen Messungen nach der Beziehung:

$$c = \frac{\log \Phi_m - \log (\Phi_m - \Phi)}{\varepsilon'} \quad (4)$$

berechnen.

Wir haben die Gültigkeit der Gleichung (3) an unserem Versuchsmaterial geprüft und eine befriedigende Übereinstimmung gefunden. In der Tabelle 1. sind die gemessenen und berechneten Werte einer Versuchsreihe für Haematoporphyrin, das an $\text{Mg}(\text{OH})_2$ adsorbiert war, verzeichnet. Es ist ersichtlich, dass die gemessenen und berechneten Werte für Φ gut übereinstimmen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die anderen Porphyrine erhalten.

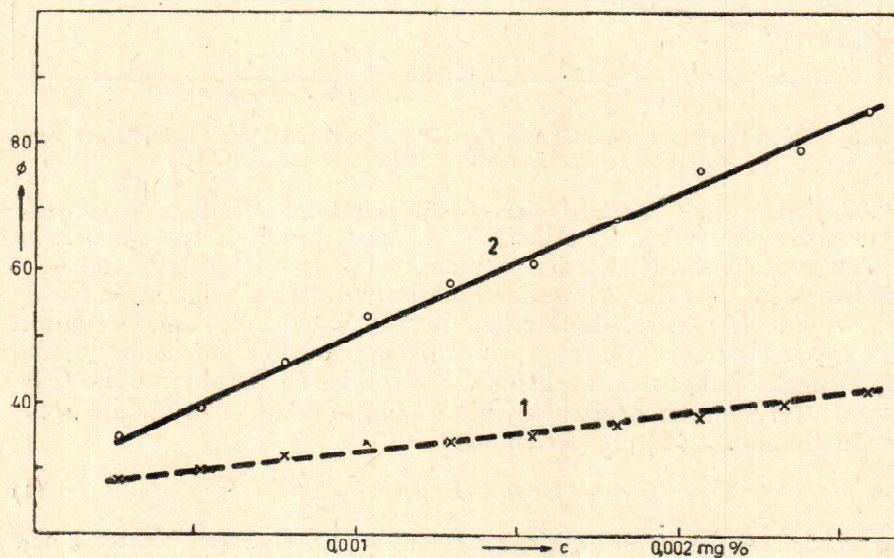


Abb. 4. Die Fluoreszenzintensität (Φ) des Koproporphyrins als Funktion der Konzentration (c) im Gebiete der physiologischen Porphyrinkonzentrationen im Harn. 1 Lösungen, 2 Adsorbate an $\text{Mg}(\text{OH})_2$.

Man kann demzufolge feststellen, dass die Messergebnisse der Fluoreszenzintensität an den Adsorbaten der Porphyrine nach den üblichen fluorometrischen Gesetzmässigkeiten rechnerisch ausgewertet und zu Konzentrationsbestimmungen der Porphyrine verwendet werden können.

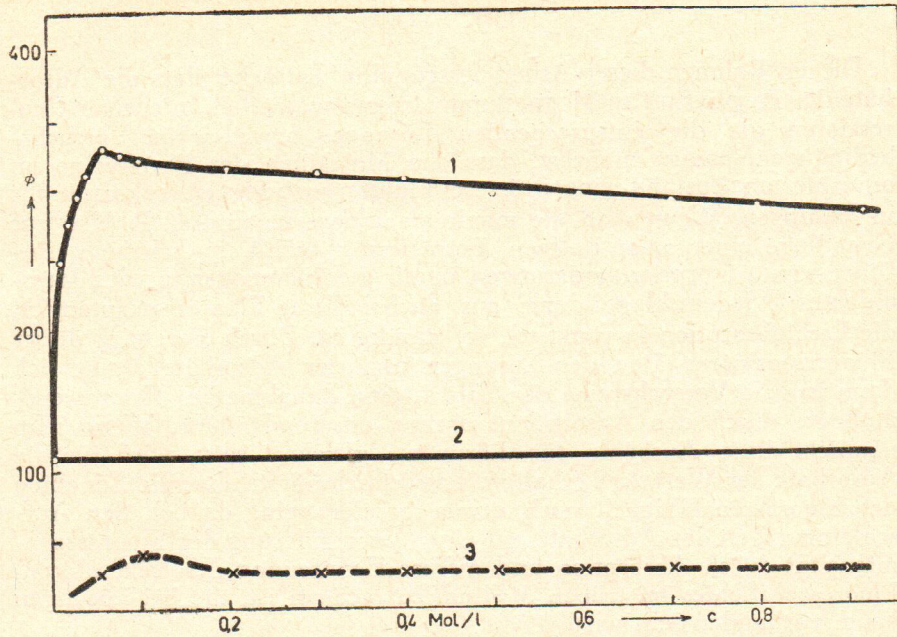


Abb. 5. Die Fluoreszenzintensität (Φ) des Haematoporphyrins als Funktion der Konzentration (c) des zugesetzten $MgSO_4$. 1 Adsorbate an zunehmenden Mengen von $Mg(OH)_2$, 2 Lösung in 1 %iger HCl , 3 Aufschlämmungen von $Mg(OH)_2$ ohne Porphyrin.

Tabelle 1.

Haematoporphyrin an $Mg(OH)_2$

c mg ⁰ / ₀	Φ gemessen	ϵ'	Φ berechnet
0,05	54	1,552	53,5
0,10	103	1,624	100,4
0,15	132	1,473	143,0
0,20	166	1,518	170,3
0,25	192	1,513	169,7
0,30	226	1,404	218,9
0,35	224	1,409	237,3
0,40	264	1,748	253,1
0,45	272	1,678	265,6
0,50	278	1,605	276,2
0,55	286	1,591	285,5
0,60	305	1,800	295,8

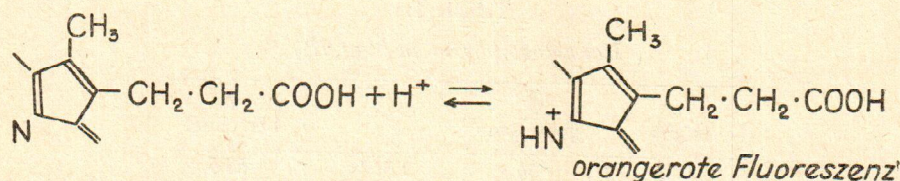
$$\Phi_m = 330$$

Mittelwert:
 $\epsilon' = 1,576$

DISKUSION

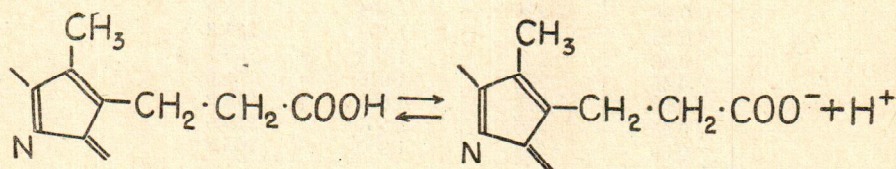
Die im Rahmen dieser Arbeit festgestellte Tatsache, dass die Adsorbate der Porphyrine an Magnesiumhydroxyd wesentlich intensiver fluoreszieren als die entsprechenden Lösungen bei gleichen Versuchsbedingungen, besagt zunächst, dass den Molekülen der Porphyrine im adsorbierten Zustand eine grössere Fluoreszenzfähigkeit zukommt als in Lösungen. Wenn man die maximale Fluoreszenzintensität (Φ_m) zur Grundlage einer quantitativen Betrachtung wählt, so scheiden Einflüsse von Absorptionsänderungen durch die Inhomogenität des Messobjektes (Niederschlagbildung) aus, da bei dieser Fluoreszenzintensität die Lichtabsorption ja praktisch vollständig ist. Durch Vergleich dieser Fluoreszenzintensitäten der Lösungen und der Adsorbate ergibt sich dann für die Versuchsreihe der Tab. 1. eine Zunahme der Fluoreszenzausbeute durch den Adsorptionsvorgang um rund 100%. Wenn man nämlich diese Ausbeute für Lösungen gleich 1 setzt, wird für die Adsorbate der Wert 2,18 erhalten. Tatsächlich dürfte aber die Zunahme der Fluoreszenzfähigkeit noch etwas grösser sein, da bei den Aufschlämmungen der Adsorbate mit einer Verminderung der Fluoreszenzintensität durch Absorption und diffuse Zerstreuung des (sekundären) Fluoreszenzlichtes im trüben Medium zu rechnen ist, die bei Lösungen kaum vorhanden sein wird.

In den sauren Lösungen der Porphyrine sind die Kationen dieser Stoffe vorhanden, die aus den neutralen Molekülen gemäss eines Gleichgewichtes entstehen (6), das für einen substituierten Pyrrolkern des Koproporphyrins durch die Gleichung



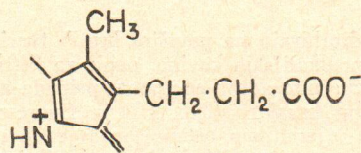
veranschaulicht werden kann.

In den alkalischen Lösungen bilden sich die Anionen der Porphyrine:



die karminrot fluoreszieren. Da die Adsorbate an Magnesiumhydroxyd gleichfalls karminrot fluoreszieren, was besonders bei kleiner Porphyrinkonzentration gut zu beobachten ist, ist anzunehmen, dass die

Anionen der Porphyrine als solche adsorbiert werden. In den Lösungen der Porphyrine sind aber bei mittlerer Acidität vorwiegend Zwitterionen:



vorhanden (6, 7), die aus den neutralen Molekülen durch Protolenwandering entstehen und offenbar fluoreszenzunfähig sind, da in ihrem isoelektrischen pH^- Gebiet die Porphyrine ein Minimum der Fluoreszenzfähigkeit aufweisen.

Man kann nun zur Erklärung der Zunahme der Fluoreszenzintensität durch den Adsorptionsvorgang annehmen, dass die fluoreszenzunfähige Komponente der Porphyringleichgewichte auch in stärker sauren und alkalischen Lösungen in bestimmten Konzentrationen vorhanden ist und eine Fluoreszenzausbeute kleiner als 1 bedingt. Durch die Adsorption des Porphyrins an Magnesiumhydroxyd, die sicherlich eine polare Adsorption, ja vielleicht sogar eine festere chemische Bindung darstellt, wird nun die fluoreszenzfähige anionische Form der Porphyrins in erhöhtem Masse festgelegt und dadurch die Fluoreszenzausbeute wesentlich erhöht. Man kann die Erhöhung der Fluoreszenzausbeute bei der Adsorption auch physikalisch im Sinne einer Fixierung der ebenen Anordnung der Atome in den Porphyrinmolekülen im adsorbierten Zustand (8) deuten.

Literatur

1. Bandow F.: Z. physik. Chem. (B) 34 (1937) 323; 39 (1938) 155;
Bandow F., Klaus E. J.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 238 (1936) 1.
Grinstein, M., S. Schwartz, C. J. Watson. J.: J. Biol. Chem. 157 (1945) 323
Sveinsson S. T., Rimington C., Berne H. D.: J. Clin. & Lab. Investigation 1, (1949) 2.
Rimington C., Sveinsson S. L.: Scand. J. Clin & Lab. Invest. 2 (1950) 209.
Askevold R.: Scand. J. Clin. & Lab. Invest. 3 (1951) 318.
2. Bandow F.: l. c.
3. Weber K.: Z. physik. Chem. (B) 30 (1935) 69;
Weber, K., Karahanjan G.: Acta med. Jugosl. 2 (1948) 64.
4. Weber K., Valić F.: Rec. trav. chim. Pays-Bas, 74 (1955) 556.
5. Weber K., Ruždić I.: Experientia 7 (1951) 354.
6. Fink H., Hoerburger W.: Z. physiol. Chem. 220 (1933) 123.
7. Bandow F.: l. c.
8. Vergl. Förster Th.: Fluoreszenz organischer Verbindungen, Göttingen 1951, S. 120 f.

*Sadržaj*O FLUORESCENCIJI PORFIRINA U ADSORBIRANOM
STANJU

Porfirini se dobro adsorbiraju na površini krutih tvari, kao što su aktivni ugljen, oksidi i hidroksidi zemnoalkalijskih kovina, papir za filtriranje i staklena vuna. Ako se radi o bijelim ili bezbojnim adsorbencijama, pripada adsorbatima pri obasjavanju ultraljubičastim svjetlom karakteristična crvena fluorescencija porfirina. Kvantitativnim fluorometrijskim mjerenjima ustanovljeno je da se u određenim slučajevima povećava intenzitet fluorescencije uslijed adsorpcije. Opisane su fotoelektrične metode za izvedbu fluorometrijskih mjerenja na porfirinskim adsorbatima. Prikazano je značenje takvih mjerenja za kvantitativno određivanje porfirina u mokraći i u drugom biološkom materijalu. Na temelju izvedenih pokusa o intenzitetu fluorescencije porfirinskih adsorbata, mogu se stvarati zaključci o stanju porfirinskih molekula u adsorbatima.

*Institut za medicinska istraživanja
i medicinu rada
Zagreb*

Primljeno 10. III. 1961.