

# Über die Hauptbande der Porphyrine in wässerigen Lösungsmitteln.

Von

**Fritz Bandow.**

Mit 2 Abbildungen.

(Mitteilung aus der Medizinischen Klinik der Universität Freiburg i. Br.)

Die stärkste Absorptionsbande der Porphyrine liegt an der Grenze zwischen sichtbarem und ultraviolettem Spektralgebiet bei 4000 Å. Ihre Lage und Form ist im einzelnen erheblichen Änderungen unterworfen; trotzdem bleibt sie in wässerigen, sauren und alkalischen und auch in organischen Lösungsmitteln stets die Hauptbande. Diese Kenntnis ist schon vor Jahren durch spektrographische Untersuchungen entwickelt worden, die hier nicht angeführt zu werden brauchen. Die Unterschiede der einzelnen Porphyrine sind für eine erste Betrachtung unbedeutend; es sei z. B. auf eine Arbeit von TREIBS (1) verwiesen, der eine größere Anzahl von Porphyrinen und Estern auf ihre Ultraviolettabsorption untersuchte. Auch die Reihen von STERN und WENDERLEIN (2), die sich mit dem sichtbaren Spektrum beschäftigen, gehören hierher, denn sie zeigen, in wie großem Umfange verschiedene Substituenten vertauscht werden können, ohne daß die Grundform des Spektrums dadurch verändert wird.

Eine feinere Kenntnis der Form der 4000 Å-Bande, besonders in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration des Lösungsmittels, ist erwünscht, um das Bild der verschiedenen Spektraltypen der Porphyrine ergänzen zu können, und weil es Licht aus diesem Spektralbereich ist, das bei allen neueren, fluorimetrischen Messungen zur Erregung der Fluoreszenz dient. Solche Messungen können zwei Ziele verfolgen: Die Fluoreszenzhelligkeit bildet in einem bestimmten Lösungsmittel ein Maß der Farbstoffkonzentration, und es wird dadurch eine außerordentlich empfindliche Bestimmung des Porphyrins (z. B. zu klinischen Zwecken) ermöglicht; oder es wird bei festgehaltener Farbstoffkonzentration die Wasserstoffionenkonzentration

des Lösungsmittels verändert und aus dem Zusammenhang zwischen  $p_H$  und Fluoreszenzstärke auf die Art des vorliegenden Porphyrins geschlossen. Dieses Verfahren ist eingehend von FINK und seinen Mitarbeitern (3) ausgebildet worden; am isoelektrischen Punkt zeigt die Fluoreszenzhelligkeit ein Minimum, dessen Lage bei den verschiedenen Porphyrinen zwischen  $p_H$  3 und  $p_H$  5 wechselt. Beobachtung des sichtbaren Absorptionsspektrums führt zur Unterscheidung von drei verschiedenen Spektralformen, zwei sauren und einer alkalischen, die in wechselndem Verhältnis nebeneinander auftreten (vgl. BADOW und KLAUS (4)). Auf die nicht mehr mit dem Auge erfaßbare Hauptbände der Absorption wurde hierbei nicht geachtet. Ich habe diese Lücke jetzt ausgefüllt im Rahmen der Untersuchungen über die optischen Eigenschaften der Porphyrine, die in der medizinischen Klinik auf Anregung von Herrn Professor BOHNENKAMP und zusammen mit verschiedenen Mitarbeitern, besonders mit Herrn Dr. KLAUS angestellt werden.

Die Messung der Absorption erfolgte nach dem bekannten spektrographischen Verfahren unter Anwendung eines rotierenden Sektors und eines Doppelbalyrohres (5). In Lösungen von abgestuftem, durch Indikatoren geprüftem  $p_H$ -Wert (MCILVAINES-Puffer) wurde käufliches Porphyrin untersucht (Nordmarkwerke, Hamburg und Schuchardt, Görlitz); für einige ergänzende Aufnahmen standen reine Farbstoffe zur Verfügung, die wir Herrn Geheimrat HANS FISCHER verdanken, sowie Lösungen, die wir uns selbst aus dem Harn von Kranken mit erhöhter Porphyrinausscheidung herstellten.

Die Ergebnisse einer Aufnahmereihe sind in den Abb. 1 und 2 dargestellt. Als Ordinate ist der Absorptionskoeffizient ( $\text{cm}^{-1}$ ) eingetragen, berechnet auf der Grundlage der dekadischen Logarithmen. Zu der Pufferreihe sind als weitere Lösungsmittel noch  $2n\text{HCl}$  und  $2n\text{NaOH}$  hinzugefügt, ferner Eisessig. In Eisessig ist die Spektralform „sauer I“ im sichtbaren Gebiet deutlicher entwickelt als in den Pufferlösungen; diese Form des Spektrums steht in gewisser Hinsicht zwischen dem gewöhnlichen sauren Spektrum (saurer Typ II genannt) und dem alkalischen, ohne daß aber eine Mischung vorliegt (dasselbe gilt auch für die Fluoreszenzspektren (4)).

Die Betrachtung der Absorptionskurven zeigt keine Besonderheiten, die erheblich über die stufenweise Umbildung der Spektren hinausgehen; diese kann bei der  $4000 \text{ \AA}$ -Bande naturgemäß weniger klar verfolgt werden als bei der über einen viel weiteren Spektralbereich mit viel reicherer Struktur verteilten Absorption im Sicht-

baren. Eine besondere Form der Hauptbande, die dem Typ „sauer I“ zuzuordnen wäre, läßt sich nicht erkennen. Kleinere Verschiebungen in der Lage sind hier nicht von Bedeutung, denn sie kommen z. B. auch bei Änderung der Salzsäurekonzentration vor, ohne daß sich die Form des Spektrums dabei ändert. — Am meisten fällt die — schon lange bekannte — Schärfe und Höhe der Absorptionsbande

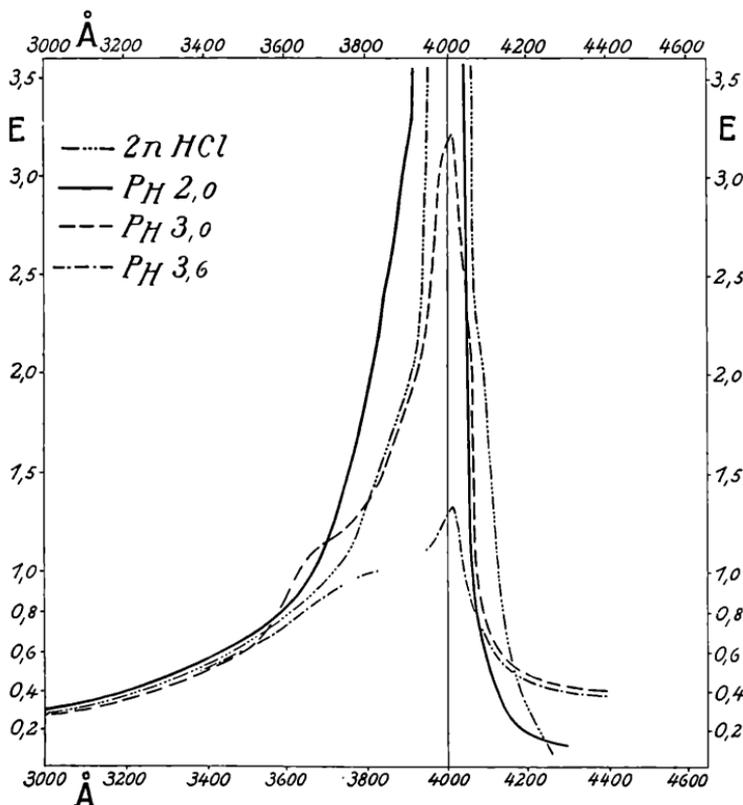


Abb. 1. Absorptionsspektren von Hämatoporphyrin (2 mg<sup>0</sup>%) in Lösungen mit kleinem pH.

Das Maximum liegt für 2n HCl etwa bei  $E=12\text{ cm}^{-1}$ , für pH 2 bei  $E=10\text{ cm}^{-1}$ . Das Maximum der stärksten sichtbaren Bande (5500 Å) liegt für 2n HCl bei  $E=0,5\text{ cm}^{-1}$ .

in saurer Lösung auf, die daher auch zu empfindlichem und charakteristischem Nachweis der Porphyrine geeignet ist. In alkalischer Lösung ist die Hauptbande nach der kurzwelligen Seite des Spektrums verlagert, niedriger und breiter geworden<sup>1)</sup>; dies läßt sich

<sup>1)</sup> In 90%igem Alkohol, der salzsauer oder alkalisch gemacht ist, ergibt sich der gleiche Befund.

durch Ablesung der Halbwertsbreite der Banden zur Darstellung bringen; sie beträgt für die Zitronensäurelösung 100 Å, für die Phosphatlösung 500 Å<sup>1)</sup>. — Die Flächen der Absorptionskurven sind für die saure und alkalische Lösung nicht nennenswert verschieden; die Anzahl der Absorptionsvorgänge, die bei Einstrahlung eines Lichtes mit gleichmäßiger spektraler Energieverteilung erfolgen

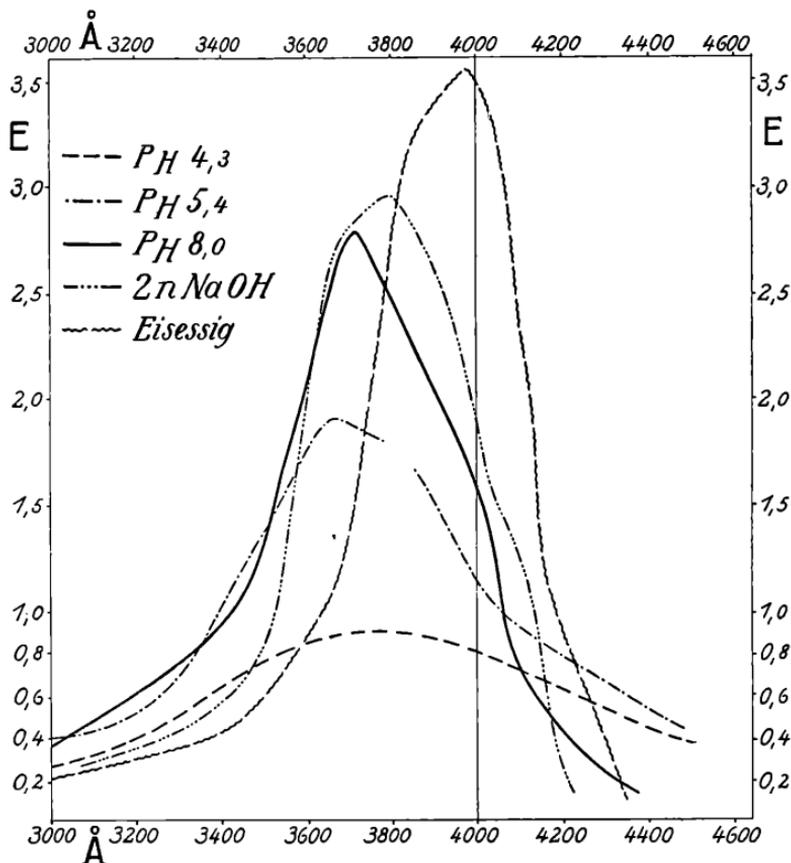


Abb. 2. Absorptionsspektren von Hämatoporphyrin (2 mg%) in Lösungen mit großem  $p_H$  und in Eisessig.

Das Maximum der stärksten sichtbaren Bande liegt für  $p_H$  8 bei  $E=0,2 \text{ cm}^{-1}$  (5050 Å) und in Eisessig bei  $E=0,3 \text{ cm}^{-1}$  (5500 Å).

würden, ist also in dem jetzt betrachteten Bereich ungefähr die gleiche; zur Aufdeckung feinerer Unterschiede müssen genauere Verfahren zur Messung der Absorption herangezogen werden. — In dem mittleren Bereich der angewandten Wasserstoffionenkonzentrationen ist der Farbstoff nur noch teilweise echt gelöst; das ist die

<sup>1)</sup> Die Lösung in Eisessig hat nahezu die Halbwertsbreite der alkalischen Pufferlösung.

hauptsächliche Ursache für die Senkung der Absorption. Übrigens ist hier der Verlauf der Spektralkurve durch die feine Trübung ein wenig gestört, am meisten bei den Lösungen, deren  $p_H$  dem isoelektrischen Punkt des Porphyrins am nächsten liegt ( $p_H$  3,6 und 4,3 in unserer Reihe). — Aufnahmen bei sechsfach geringerer Konzentration ergaben das gleiche Bild.

Die Absorptionsspektren im Sichtbaren zeigen bis  $p_H$  3 rein bzw. überwiegend den Typ „sauer II“, bei 3,6 und 4,3 Mischformen mit Überwiegen des alkalischen Spektrums, das bei 5,4 rein entwickelt ist. In Eisessig sind die beiden Formen des sauren Absorptionsspektrums ausgebildet, II ein wenig stärker als I. Die Fluoreszenzspektrogramme entsprechen diesen Absorptionsbefunden. In Eisessig haben wir wieder dasselbe Ergebnis erhalten, das wir schon bei einer früheren Gelegenheit beschrieben (das Spektrum ist ähnlich wie die Form „sauer II“ gebaut, jedoch beträchtlich nach Langwellig verlagert (4)).

Wir betrachten jetzt in unseren Absorptionskurven diejenigen Spektralstellen, die bei Verwendung einer Quarzquecksilberlampe die Fluoreszenz erregen. Da es bei manchen sehr schwachen biologischen Präparaten notwendig ist, die Helligkeit möglichst weitgehend zu steigern, verwenden wir als Filter in vielen Fällen eine Kupferoxydammoniaklösung ohne Schwarzglas. Es stehen dann hauptsächlich die ultravioletten Quecksilberlinien bei 3650 Å, die violetten bei 4050 und die blauen bei 4350 Å zur Verfügung. Tab. 1

Tabelle 1. Absorptionskoeffizienten an der Stelle der Hg-Linien in Abhängigkeit vom  $p_H$ .

Å \ $p_H$	2,0	3,0	3,6	4,3	5,4	8,0
3650	0,9	1,0	0,8	0,9	1,9	2,5
4050	2,2	2,2	0,9	0,8	1,0	1,1
4350	0,1	0,35	0,35	0,5	0,6	0,2

Der Absorptionskoeffizient steigt für 3650 Å im alkalischen Gebiet, für 4050 Å im sauren Gebiet stark an.

gibt die aus den abgebildeten Kurven abgelesenen Absorptionskoeffizienten für diese Wellenlängen wieder. Trotz der größeren Energie, mit der die blauen Linien im Spektrum vertreten sind, haben sie wegen der schwächeren Absorption für die Fluoreszenzerregung geringere Bedeutung. Das gegenseitige Verhältnis der Absorption der beiden maßgebenden Liniengruppen 3650 und 4050 Å ist in sauren und alkalischen Lösungen ganz verschieden. Die Hinzu-

nahme der violetten Linien zur Fluoreszenzerregung ergibt bei den sauren Farbstofflösungen eine besonders starke Erhöhung der Helligkeit; das ist praktisch insofern wichtig, als die Bestimmung biologischer Porphyrine im allgemeinen in salzsaurer Lösung erfolgt. Es ist dabei noch zu bemerken, daß man praktisch immer mit so geringen Konzentrationen und Schichtdicken arbeitet, daß nur ein mäßiger Teil des eingestrahnten Lichtes im Meßtrog absorbiert wird (z. B. 10 ‰; die Farbstoffkonzentration liegt im allgemeinen unter 0,1 mg-%; die angewandten Schichtdicken sind 5 oder 10 mm, selten auch 20 mm). Bei fluorimetrischen Konzentrationsbestimmungen verschiedener Porphyrine können sich die — spektral geringfügigen! — Verschiebungen der Hauptbände und Unterschiede in ihrer Höhe bemerkbar machen und erfordern für genaue Bestimmungen besondere Eichungen. — Bei Verwendung einer Bogenlampe als erregender Lichtquelle gilt dasselbe wie für die Quecksilberlampe, wenn auch die Zahlenverhältnisse durch die andere Energieverteilung (fast kontinuierliches Spektrum) etwas verschoben sind.

Für die Aufnahme einer  $p_H$ -Fluoreszenzkurve nach FINK ist nach diesen Ergebnissen die Filterung des erregenden Lichtes von großer Bedeutung. Tab. 2 gibt ein Meßbeispiel wieder (erhalten

Tabelle 2. Fluoreszenzhelligkeit und  $p_H$ .

2,0	3,0	3,6	4,3	5,4	8,0	$p_H$ / Filter
105	70	25	10	22	40	Kupferoxydammoniaklösung desgl. + $UG_2$ (SCHOTT)
100	45	16	10	35	65	

Die Zusammenstellung der beiden Filter (untere Zeile) läßt nur 3650 Å zur Fluoreszenzerregung wirksam werden; dies ergibt einen stärkeren Helligkeitsanstieg im alkalischen Ast. Die blaue Filterlösung allein (obere Zeile) läßt auch 4050 (und 4350) Å hindurchtreten; der jetzt im sauren Ast stärkere Helligkeitsanstieg tritt bei  $p_H$  2,0 in dieser Tabelle wegen der verhältnismäßig hohen Porphyrinkonzentration nicht deutlich hervor.

mit Stufenphotometer mit Filter LI; Porphyrinkonzentration 0,3 mg-%; Schichtdicke 10 mm). Die schwächste Fluoreszenzhelligkeit ist in jeder Zeile gleich 10 gesetzt. Das verhältnismäßig stärkere Leuchten der sauren Lösungen bei Weglassen des Ultraviolettfilters tritt bei geringeren Schichtdicken und bei schwächeren Konzentrationen noch deutlicher hervor als in unserem Beispiel. — Es ist an sich übersichtlicher, wenn nur ein enger Spektralbereich zur Erregung verwandt wird. Aber auch wenn man sich auf 3650 Å beschränkt, ist es nicht möglich, allein aus dem Gang der Fluoreszenzhelligkeit

mit der Wasserstoffionenkonzentration auf die Ausbeute und die echte Auslöschung des Porphyrins in den verschiedenen Lösungsmitteln zu schließen; es muß vielmehr die Menge des absorbierten und zur Erregung verfügbaren Lichtes berücksichtigt werden. Zu dieser Frage haben wir noch weitere Messungen vorgesehen. Es ist bisher nicht möglich, eine gut begründete Erwartung über das Ergebnis auszusprechen, denn es besteht eine zweifache Unsicherheit: Die echte Absorption ist in dem mittleren Untersuchungsbereich nicht gut bekannt, wie schon erörtert wurde (die Kenntnis der Konzentration des echt gelösten Farbstoffs ist nicht notwendig, wenn man die Quantenausbeute der Fluoreszenz aus Emission und Absorption berechnen will); als zweite, wesentlichste Unsicherheit ist hervorzuheben, daß aus okularen Intensitätsmessungen nicht auf die Anzahl der von der Lösung ausgesandten Lichtquanten geschlossen werden kann; denn der Schwerpunkt des alkalischen Fluoreszenzspektrums ist gegenüber dem sauren erheblich nach der langwelligen Seite verschoben und rückt damit in ein Gebiet, in dem die Empfindlichkeit des Auges bereits abnimmt.

**Zusammenfassung:** Es werden Messungen an der Hauptabsorptionsbande der Porphyrine bei 4000 Å in wässrigen Lösungen von verschiedenen  $p_H$  mitgeteilt. Es wird gezeigt, daß die Änderung dieser Bande berücksichtigt werden muß, wenn man die Abhängigkeit der Fluoreszenzhelligkeit von der Zusammensetzung des Lösungsmittels verstehen und auf die physikalischen Grundvorgänge zurückführen will.

Der Quarzspektrograph und das Stufenphotometer wurden Herrn Prof. BOHNENKAMP von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt. Verschiedene Anschaffungen wurden mir durch eine Unterstützung der Freiburger wissenschaftlichen Gesellschaft ermöglicht, wofür ich auch an dieser Stelle bestens danke.

Freiburg i. Br., Medizinische Klinik der Universität.

### Schrifttum.

1. A. TREIBS, Z. physiol. Chem., 212, 33, 1932.
2. A. STERN und H. WENDERLEIN, Z. physik. Chem. (A), 176, 98, 1936.
3. H. FINK und W. HOERBURGER, Z. physiol. Chem., 218, 181, 1933; 220, 123, 1933; 225, 49, 1934; 232, 28, 1935.
4. F. BANDOW und E. J. KLAUS, Z. physiol. Chem., 238, 1, 1936.
5. F. BANDOW, Z. Instrumentenkde, 55, 464, 1935.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Berichte der naturforschenden Gesellschaft zu Freiburg im Breisgau](#)

Jahr/Year: 1936

Band/Volume: [35](#)

Autor(en)/Author(s): Bandow Fritz

Artikel/Article: [Über die Hauptbande der Porphyrine in wässrigen Lösungsmitteln. 120-126](#)