

CHROM. 4010

FLUOROMETRISCHE BESTIMMUNG VON PORPHYRINMETHYLESTERN  
IM DÜNNSCICHTCHROMATOGRAMM

MANFRED DOSS, BERTHOLD ULSHÖFER UND RUDOLF QUAST

*Hygiene-Institut der Universität Marburg a.d. Lahn (B.R.D.)\**

(Eingegangen am 11. Februar 1969)

## SUMMARY

*Fluorometric determination of porphyrin methyl esters by scanning of thin-layer plates*

A fluorometric determination of porphyrin methyl esters by scanning of pre-coated silica gel thin-layer plates is described. For the measurement a Vitatron UFD photometer with densitometer arrangement is used.

## EINLEITUNG

Über eine Methode zur quantitativen Trennung von Porphyrinmethylestern, dargestellt und isoliert aus biologischem Material, auf mit Kieselgel H beschichteten Platten wurde hier berichtet<sup>1</sup>. Die Analyse der vom Kieselgel des Chromatogramms eluierten Methylester erfolgte spektrophotometrisch in Chloroform<sup>1,2</sup>. Inzwischen wurden vorgefertigte Kieselgel-Platten und -Folien in das Verfahren einbezogen<sup>3-5</sup> und die analytische Empfindlichkeit durch spektrophotometrische Bestimmung der Porphyrinmethylester als Kupfer-Chelatkomplexe erhöht<sup>6</sup>.

Die Vorteile der mit einem Bindemittel vorbelegten, kommerziellen Platten (abriebfeste Adsorptionsschicht, weitgehend konstante Schichtdicke und Körnchengröße, einfache Lagerung) bieten günstige Voraussetzungen für eine direkte quantitative Auswertung der Porphyrine im Chromatogramm mit Hilfe einer fluorometrischen Messanordnung. Zur prinzipiellen Klärung der Möglichkeiten für die fluorometrische Registrierung und die Auswertung von Porphyrin-Dünnschichtchromatogrammen wurde ein Vitatron UFD Photometer mit Densitometer verwendet.

Die Analyse von Protoporphyrin-, Koproporphyrin- und Uroporphyrinmethylestern der Isomerenreihe III, gelöst in Chloroform, mit einem Beckman<sup>®</sup> Spektralfluorometer Modell SF 1078 ergab, dass die Fluoreszenz-Excitations-Maxima der Substanzen im Soret-Bereich bei 410, 408 und 424 nm und die Fluoreszenz-Emissions-Maxima bei 632, 623 und 627 nm liegen<sup>7</sup>. Die Emissionsmaxima stimmen mit einer Abweichung von  $\pm 1$  nm mit den Angaben von SCHWARTZ *et al.*<sup>8</sup> überein.

\* Pilgrimstein 2, D-355 Marburg (Lahn).

## MATERIAL UND METHODEN

*Substanzen*

Die Porphyrine wurden nach den beschriebenen Methoden isoliert<sup>1,3</sup> und identifiziert<sup>2,4</sup>. Zur Aufarbeitung und Isolierung der Porphyrine gelangten neben porphyrischem Urin auch Zellsuspensionen von *Achromobacter metalcaligenes*<sup>9</sup>, die aus zugesetzter  $\delta$ -Aminolävulinsäure ( $10^{-3}$  M) einen Überschuss an Porphyrinen mit zwei bis acht Carboxylgruppen produzieren. Die zur Fluorometrie eingesetzten Porphyrinmethylester wurden jeweils direkt vor Gebrauch durch mehrfache Rechromatographie als Reinsubstanzen dargestellt, dann in Chloroform gelöst und zwischen den Versuchen bei  $-30^{\circ}$  aufbewahrt. Ihre Konzentration wurde mit einem Spektralphotometer DB-G Beckman<sup>®</sup>, das mit einem 10-Zoll-Kompensationsschreiber kombiniert war, bestimmt\*.

*Dünnschichtplatten und Lösungsmittelsysteme*

Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf DC-Fertigplatten Kieselgel F<sub>254</sub> mit einer Schichtdicke von 0.25 mm und einem Format von 10 × 20 cm (5729 von E. Merck AG, Darmstadt).

Die in Chloroform gelösten Porphyrinester wurden mit Mikroliter-Pipetten auf die Platte aufgetragen. Bei mehrmaligem Auftragen von Volumina zwischen 20 und 50  $\mu$ l auf dieselbe Startzone von maximal 15 mm Breite wurde das Lösungsmittel kontinuierlich mit einem Kaltluftföhn abgeblasen.

Die Porphyrinmethylester von biologisch vorkommenden Porphyrinen liessen sich nach Anzahl der Estergruppen im Lösungsmittelsystem Benzol-Essigsäureäthylester-Methanol (85:13.5:1.5) (BEM) auftrennen<sup>3</sup>. Zum Lauf der Substanzen in der Front für die Herstellung von Eichchromatogrammen (Fig. 2a) war das Lösungsmittelsystem Chloroform-Methanol (130:20) (CM) geeignet.

*Messapparatur\* und Messbedingungen*

Zur Messung der Fluoreszenz der Dünnschichtplatten diente ein Vitatron\*\* Photometer, Typ UFD, mit der Densitometereinheit UFD 500 und anderen bei der Funktionsbeschreibung der Messapparatur aufgeführten Zusatzteilen, die ebenfalls über Vitatron bezogen wurden.

Das Licht wird gefiltert, durch eine Quarzlinse fokussiert und über einen Metallspiegel rechtwinklig nach unten abgelenkt. Die Dünnschichtplatte bewegt sich auf einem endlosen Transportband mit konstanter Geschwindigkeit durch den Lichtstrahl. Durch eine Blende und ein zweites Filter gelangt das emittierte Licht zu dem direkt darunter liegenden Photomultiplier. Das Signal des Photomultipliers wird einem Verstärker zugeführt, der ein Wechselspannungssignal an einen lin/log-Schreiber (UR 100) abgibt. Papiertransport und Transportband des Densitometers werden gemeinsam eingeschaltet. Die Papiergeschwindigkeit ist in neun Stufen von 1 cm/h bis 900 cm/h umschaltbar, die Geschwindigkeit des Transportbandes von 1.72 cm/min bis 16.75 cm/min in fünf Stufen.

Der Aufbau des Gerätes bedingte eine Fluoreszenzmessung in geradem Strahlengang. Da Anregungs- und Fluoreszenzmaxima der Porphyrine relativ weit ausein-

\* Leihgaben der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

\*\* Vitatron N.V., 23 Spoorstraat, Dieren, Niederlande.

ander liegen, konnte durch Auswahl geeigneter Filter ein Durchscheinen des Primärlichtes verhindert werden. Als Lichtquelle wurde eine Hg-Niederdrucklampe von Osram, Typ Hg/3, eingesetzt. Aus den Angaben des Herstellers ist zu ersehen<sup>10</sup>, dass im Bereich zwischen 600 nm und 700 nm keine Emission erfolgt, während zahlreiche Emissionslinien im Bereich zwischen 334 nm und 436 nm liegen. Das Vitatron Absorptionsbandfilter B, das sonst nur in Verbindung mit einem Flüssigkeitsfilter verwandt werden soll und das einen weiten Spektralbereich im U.V. und kurzwelligen sichtbaren Licht durchlässt (Fig. 1), ergab die höchste Ausbeute an Primärlicht. Die Zunahme der Transmission dieses Filters oberhalb 650 nm störte nicht, da in diesem Spektralbereich die Hg/3-Lampe keine Emissionslinie besitzt<sup>10</sup>, und eine nur sehr geringe Überschneidung der Transmission mit der des Sekundärfilters IFL 630 besteht, wie in Fig. 1 zu ersehen ist. Ein Photomultiplier von RCA, Typ IP 22 (Vitatron UFD 120/124), der wegen seiner hohen Empfindlichkeit im Rot ausgewählt war, diente zur Lichtmessung. Er wurde mit höchstzulässiger Spannung betrieben, um eine maximale Quantenausbeute zu erzielen. Bei höchster Verstärkung (Stufe B) und optimaler Dämpfung des Recorders ergab sich ein Spitze-Spitze Geräuschpegel von maximal  $\pm 1.5\%$  T bei einer Grundlinie von 8% T. Der maximale Geräuschpegel und die Grundlinie waren bei der nächstniedrigen Verstärkungsstufe A geringer und betrugen  $\pm 0.5\%$  T und 4.5% T resp.

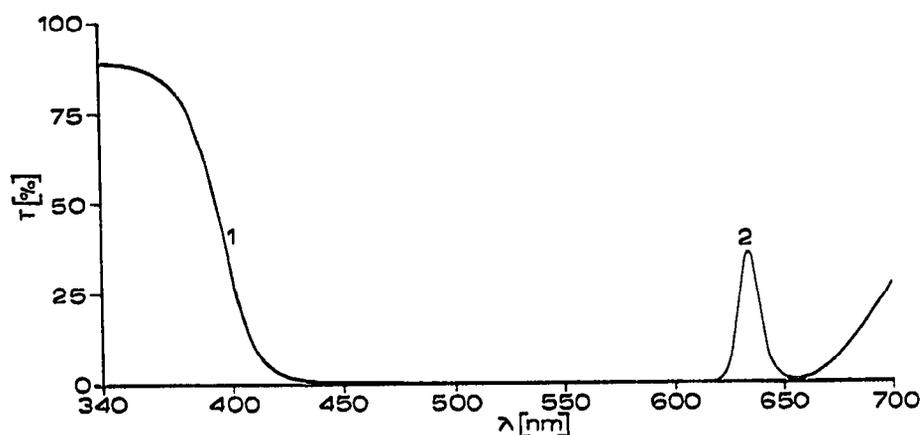


Fig. 1. Transmission der in der Messanordnung verwandten Filter, ausgemessen mit dem Zweistrahlenspektrophotometer Hitachi-Perkin Elmer EPS-3T gegen Luft (Schreiberblatt RANGE VISIBLE). I = Absorptionsbandfilter B (Primärfilter), II = Interferenzfilter IFL 630 (Sekundärfilter).

Der Papiertransport des Schreibers wurde entsprechend der Geschwindigkeit des Transportbandes des Densitometers so gewählt, dass eine gute Auswertung der Registrierkurve möglich war. Die Blende zwischen Probe und Multiplier, deren Breite die lineare Auflösung des Chromatogramms entlang der Laufrichtung bestimmte, musste im Gegensatz zur densitometrischen Messanordnung<sup>11</sup> so lang sein, dass sie mindestens die ganze Breite der Bande auf dem Dünnschichtchromatogramm umfasste. Nur dadurch war es möglich, die fluoreszierende Fläche vollständig zu messen. Beim Auflegen der Dünnschichtplatten auf die Transporteinrichtung wurde besonders darauf geachtet, dass die Lösungsmittelfront genau senkrecht zum Transportband ausgerichtet wurde.

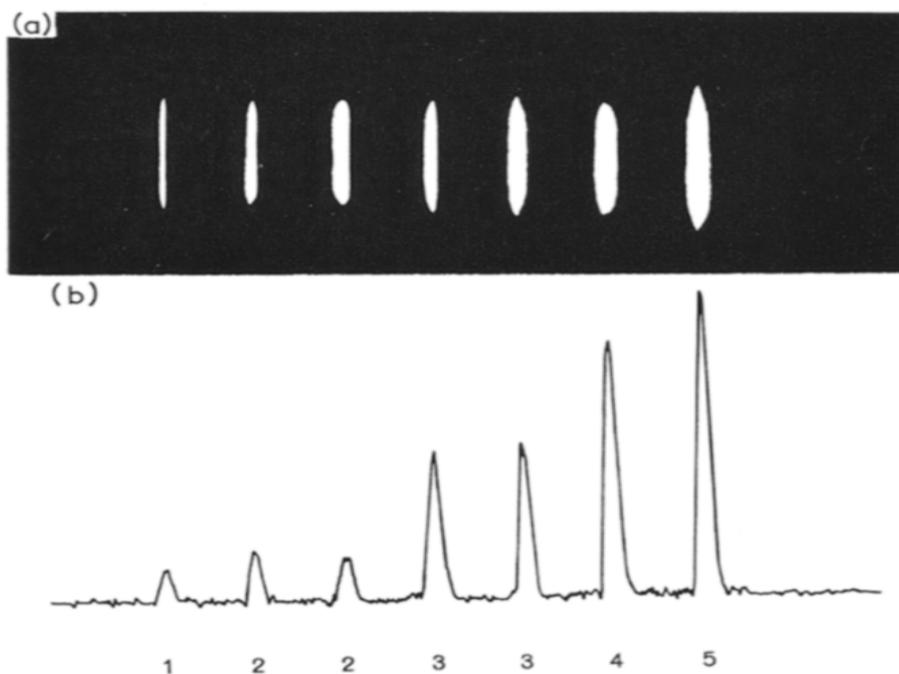


Fig. 2. Kieselgel-Dünnschichtchromatogramm (Merck 5729) mit Uroporphyrinmethylester im Lösungsmittelsystem Chloroform-Methanol (130:20) (a) und die bei fortlaufender fluorometrischer Registrierung aufgezeichneten Flächen (b). Uroporphyrinmethylester  $3.95 \mu M$  in Chloroform wurde vor jedem Lauf auf dieselbe Startzone in aufsteigenden Mengen appliziert: 5 (1), 10 (2), 50 (3), 100 (4) und 150 (5)  $\mu l$ .

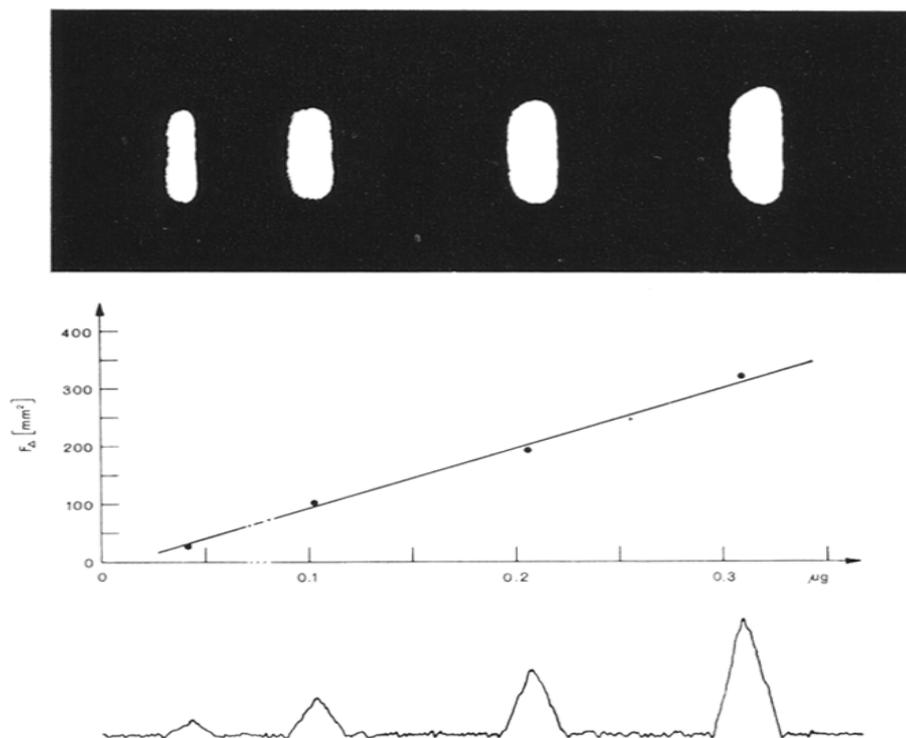


Fig. 3. Geometrische Auswertung der bei fluorometrischer Registrierung von Koproporphyrin mit dem Vitatron UFD Photometer erhaltenen Flächen im Vergleich zum Chromatogramm (Lösungsmittelsystem BEM). Auf eine DC-Kieselgel-Platte wurden 20, 50, 100 und 150  $\mu l$  einer Lösung von Koproporphyrin-III-tetramethylester  $2.92 \mu M$  in Chloroform aufgetragen.

TABELLE I  
 STATISTISCHE WERTE DER FLUOROMETRISCHEN KOPRO- UND UROPORPHYRINBESTIMMUNG AUS DEM DÜNNSCHEICHCHROMATOGRAMM BEIM LAUF DER  
 SUBSTANZEN IN VERSCHIEDENEN LÖSUNGSMITTELSYSTEMEN  
 Konzentration der Lösungen: Koproporphyrin-III-tetra-ME<sup>a</sup> 2.92  $\mu$ M; Uroporphyrin-III-okta-ME 3.95  $\mu$ M.

Lösungsmittelsystem	Porphyrin- ME-Lösungen in $CHCl_3$ ( $\mu$ l)	Mittelwert ( $\bar{x}$ ) ( $mm^2$ )	Standard- abweichung (s) ( $\pm mm^2$ )	Standard- abweichung von $\bar{x}$ ( $s\bar{x}$ ) ( $\pm mm^2$ )	Variations- koeffizient (VK) (%)	Anzahl der Messungen (n)
Benzol-Äthylacetat-Methanol (85:13.5:1.5)	Kopro 100	195.75	10.55	4.36	5.39	8
	50	100.15	5.30	2.65	5.29	4
	20	41.66	3.62	1.21	8.79	4
Chloroform-Methanol (130:20)	Uro 150	216.00	6.93	3.10	3.21	5
	100	181.50	13.70	6.12	7.55	5
	50	95.00	9.49	2.74	9.99	12
	5	19.40	2.27	1.02	11.71	5

<sup>a</sup> ME = Methyltester.

### Auswertung

Die Auswertung der registrierten Fluoreszenzintensitäten (Fig. 2b) erfolgte aufgrund der nahezu symmetrischen Peaks (Fig. 2 und 3) geometrisch<sup>12</sup>. Die Flächenwerte wurden durch Multiplikation der Höhe der Peaks und ihrer Breite auf halber Höhe erhalten. Die Fig. 2 zeigt ein im Lösungsmittelsystem CM und unter dem U.V.-Licht bei 355 nm (Desaga-Intensivstrahler 13 1000) fotografiertes Chromatogramm mit Uroporphyrinmethylester im Vergleich zu den gemessenen Fluoreszenzintensitäten.

### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Dünnschichtchromatogramme von Porphyrinmethylestern können direkt, unter Berücksichtigung der speziellen Gerätebedingungen (Empfindlichkeit, Messbereich, Spaltbreite), quantitativ fluorometrisch ausgewertet werden. Dieser Befund ergibt sich aus den Messungen, die mit einem Vitatron UFD Photometer, das mit einem Densitometer ausgerüstet ist, durchgeführt wurden.

Die Korrelation zwischen dem fluoreszenzoptischen Bild und der anhand einer Flächenregistrierung gemessenen Fluoreszenz-Intensität der Porphyrinzone zeigt Fig. 2. Das Verhältnis zwischen dem geometrisch ermittelten Flächeninhalt und der Konzentration der Koproporphyrin-III-tetramethylester ist in Fig. 3 dargestellt. Nach jeder Applikation der in Fig. 3 aufgeführten Menge an Koproporphyrin auf dieselbe Startzone wurde die Platte im Lösungsmittelsystem BEM unter Beobachtung im U.V.-Licht (355 nm) jeweils so hoch entwickelt, dass die nächst kleinere Menge in einem bestimmten Abstand unter die bereits vorhandene Porphyrinbande wanderte. Da der Spalt des Gerätes  $15 \times 2$  mm betrug, wurde eine Auftragsbreite von 15 mm nicht überschritten, so dass die Gesamtmenge jeder Bande fluorometrisch in einer einzigen Messung erfasst werden konnte. Aus Fig. 3 geht hervor, dass in dem durch die Gerätebedingungen gegebenen Messbereich ein konstantes Verhältnis zwischen dem Porphyringehalt im Chromatogramm und der registrierten Fläche als Fluoreszenz-Parameter besteht. Mit diesen Eichkurven oder daraus erhaltenen Faktoren für die Bestimmung eines individuellen Porphyrins wird der Porphyringehalt dünnschichtchromatographisch aufgetrennter biologischer Extrakte ermittelt. Die in der Tabelle aufgeführte statistische Prüfung der Messergebnisse von Kopro- und Uroporphyrinchromatogrammen gibt die Reproduzierbarkeit des Verfahrens wieder.

Die Eichkurven müssen aufgrund nicht nur der unterschiedlichen molaren Fluoreszenz von Proto-, Kopro- und Uroporphyrin, sondern vor allem der durch Primär- und Sekundärfilter determinierten Ausbeute für jedes einzelne Porphyrin angelegt werden. Unterschiede ergeben sich ausserdem bei Verwendung verschiedener Kieselgel-Dünnschichtplatten<sup>1,3</sup> sowohl in Bezug auf die Qualität des Materials und die Dicke der Sorptionsschicht als auch hinsichtlich ihrer Herstellung und Zusätze. Weiterhin ist nach unseren Versuchen die von der Wahl des Lösungsmittelsystems abhängige und in verschiedenen Systemen unterschiedliche Topographie der Porphyrinbande zu berücksichtigen. Chromatogramme können nur dann miteinander quantitativ verglichen werden, wenn sie in Lösungsmittelsystemen von gleicher oder mit denselben Lösungsmitteln gering modifizierter Zusammensetzung entwickelt wurden. Fig. 4 gibt die Eichkurve von Uroporphyrinmethylester im Lösungsmittelsystem CM wieder, die von  $0.01 \mu\text{g}$  bis zu  $0.4 \mu\text{g}$  linear verläuft. Da bei Mengen über  $0.5 \mu\text{g}$  (Auf-

tragsvolumen 200  $\mu\text{l}$ ) die Breite der Porphyrinzone nicht am Start, sondern beim Lauf nahe der Lösungsmittelfront infolge einer beidseitigen und mit der Höhe des  $R_F$ -Wertes zunehmenden Divergenz 15 mm überschreitet, wird diese Bande bei der Messung nicht vollständig erfasst, wodurch bedingt ist, dass ihr Flächeninhalt nicht in Fortsetzung der Geraden liegt. Dagegen findet im Lösungsmittelsystem BEM ein paralleler Transport der Porphyrinzone auch bei grösseren Konzentrationen statt.

Werden die kritischen Seiten des Verfahrens beachtet, kann der Porphyringehalt von Dünnschichtchromatogrammen, mit denen ein Porphyringemisch aus biologischem Material wie Bakterien<sup>9</sup> (Fig. 5), Leber<sup>4</sup> und Urin<sup>5</sup> aufgetrennt wurde, direkt-fluorometrisch bestimmt werden.

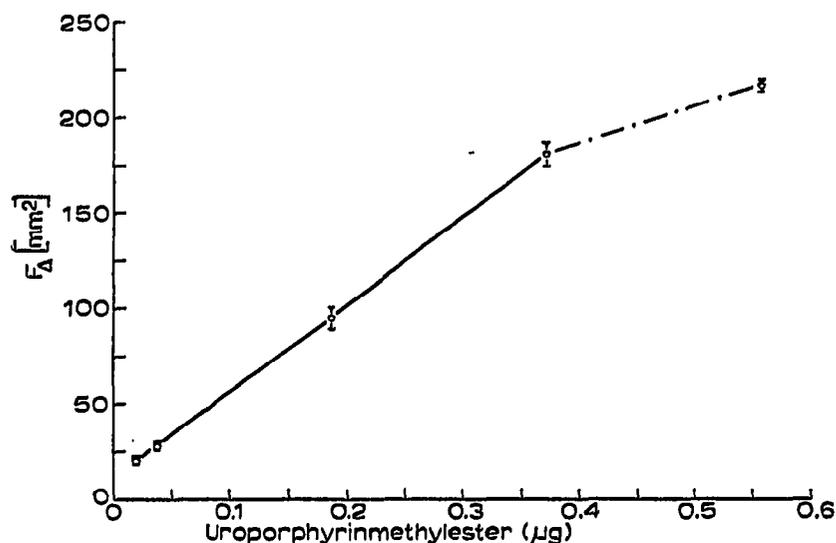


Fig. 4. Eichkurve von Uroporphyrin-oktamethylester mit der Standardabweichung des Mittelwertes aus sechs Messungen eines im Lösungsmittelsystem Chloroform-Methanol (130:20) entwickelten Chromatogramms.

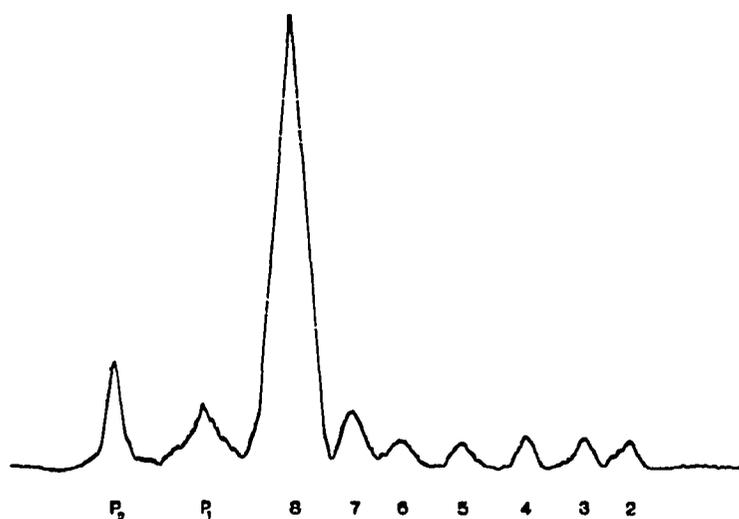


Fig. 5. Fluorometrische Analyse einer bakteriellen Suspension von *Achromobacter metalcaligenes*, die in einem definierten Medium unter Zusatz von  $\delta$ -Aminolävulinsäure inkubiert wurde. Dünnschichtchromatographie im System BEM. 2 bis 8, Porphyrine nach Anzahl der Methylestergruppen im Molekül (von Proto bis Uro).  $P_1$  und  $P_2$  sind Porphyrinbanden unbekannter Natur. Richtung der Registrierung: 2  $\rightarrow$   $P_2$ .

## DANK

Die Untersuchungen wurden von Seiten der Autoren M.D. und R.Q. mit dankenswerter Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, durchgeführt. Herrn Professor Dr. R. SIEGERT, Direktor des Hygiene-Instituts, danken wir für die weitere Förderung der Arbeit.

## ZUSAMMENFASSUNG

Ein fluorometrisches Verfahren zur quantitativen Messung von Porphyrinmethylestern auf vorbelegten Kieselgel-Platten wird beschrieben. Zur fluorometrischen Registrierung wurde ein Vitatron UFD Photometer mit Densitometereinheit verwendet.

## LITERATUR

- 1 M. DOSS, *J. Chromatog.*, 30 (1967) 265.
- 2 J. E. FALK, *Porphyryns and Metalloporphyrins*, Elsevier, Amsterdam, 1964.
- 3 M. DOSS, *Klin. Wochschr.*, 46 (1968) 731.
- 4 M. DOSS, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 7 (1969) 133.
- 5 M. DOSS UND W.-K. PHILIPP, *Z. klin. Chem. Klin. Biochem.*, 7 (1969) 148.
- 6 M. DOSS, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 6 (1968) 498.
- 7 M. DOSS, unveröffentlichte Ergebnisse.
- 8 S. SCHWARTZ, M. H. BERG, I. BOSSENMAIER UND H. DINSMORE, in D. GLICK (Herausgeber), *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. VIII, Interscience, New York, 1960, S. 221.
- 9 M. DOSS, *Biochim. Biophys. Acta*, 170 (1968) 461.
- 10 OSRAM GMBH, *Spektrallampen Liste SP*, Berlin, April 1967, S. 9.
- 11 R. J. WIEME, *Agar Gel Electrophoresis*, Elsevier, Amsterdam, 1965, S. 83.
- 12 D. JÄNCHEN UND G. PATAKI, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 391.

*J. Chromatog.*, 41 (1969) 386-393