DIE NATURWISSENSCHAFTEN

1. Jahrgang.

14. November 1913.

Heft 46.

Die Farbstoffe des Chlorophyllkorns.

Von Prof. Dr. Friedrich Czapek, Prag.

Das soeben erfolgte Erscheinen des umfassenden Werkes von *Rich. Willstätter* und *Arthur Stoll*:

Untersuchungen über Chlorophyll⁽¹⁾, welches die seit acht Jahren unter Aufwendung enormer Arbeitsleistung fortgesetzte Erforschung des Blattgrüns durch *Willstätter* und dessen Schüler in trefflicher Darstellung vor Augen führt, gibt uns die willkommene Gelegenheit, einen Rückblick auf diese so wichtigen biochemischen Errungenschaften zu werfen, die mit außerordentlichem Scharfsinn und Geschick und mit großem Aufwande materieller Mittel Resultate gezeitigt haben, welche sich würdig den berühmten Ergebnissen der Arbeitsserien *Emil Fischers* über die Zucker, Purinbasen und Polypeptide zur Seite stellen.

Vor zwölf Jahren lenkte die Entdeckung des genialen *Nencki*, daß Chlorophyll und Blutfarbstoff bei eingreifender Reduktion zu äußerst ähnlichen Pyrrolderivaten: „Hämopyrrol“, abgebaut werden, im Vereine mit den durch *Tschirch* festgestellten spektroskopischen Beziehungen zwischen Blatt- und Blutfarbstoff die allgemeine Aufmerksamkeit auf sich. Dies war in der Tat der erste Hinweis auf die dem Chlorophyll zugrunde liegende chemische Konstitution. Im übrigen war aber vor den Arbeiten *Willstätters* die Natur aller bisher gewonnenen Abbauprodukte des Blattgrüns durchaus ungewiß, da seit jeher bei der Charakterisierung der Blattpigmente und deren Derivate der spektroskopischen Methodik viel zu großes Vertrauen entgegengebracht worden war, und man die exakte Abtrennung chemisch genügend definierter Produkte sehr vernachlässigt hatte. Die durch diese Unsicherheit veranlaßte Skepsis mag die Schuld daran tragen, daß alte, richtige Angaben, wie jene von *Stokes* über die Dualität der grünen Blattfarbstoffe, trotz neuerlicher Bestätigungen durch gute Beobachter wie *Tswett*, nicht beachtet wurden und die bedeutungsvollen mikroskopischen Studien von *Borodin* und von *Monteverde* über „kristallisiertes Chlorophyll“ unausgewertet blieben.

Nicht einmal eine verlässliche Methode zur Abtrennung unzersetzten Chlorophylls aus Pflanzenblättern fand *Willstätter* am Beginne seiner Arbeiten vor, sondern nur traurige Erfahrungen über die leichte Zersetzbarkeit von chlorophyllhaltigen Blätterextrakten, die jeder Präparationstechnik spottete. Altbekannt waren aber zwei Tatsachen. Einmal, daß man durch Behandlung weingeistiger Blattauszüge mit Alkalilauge schön grüne Stoffe erhält, die, abweichend vom natürlichen Chlorophyll, in Wasser löslich sind; zum anderen die Erfahrung, daß bereits bei gelinder Säureeinwirkung die grüne Chlorophyllfarbe der Auszüge nach Oliv-

braun umschlägt. Daß *Willstätter* von diesen beiden Tatsachen ausgehend intuitiv eine Richtschnur für eine lange Kette erfolgreicher Arbeiten fand, ist ein neuer Beweis dafür, wie mitunter alltägliche Erfahrungen, an denen Hunderte von Forschern achtlos und machtlos vorbeigehen, in den Händen eines Einzelnen zum Keime der weitgehendsten Fortschritte werden. *Willstätter* sagte sich einfach und richtig, daß es sich bei der Alkalieinwirkung auf das Chlorophyll um eine Verseifung handeln muß, wobei das Alkalisalz einer sauren Gruppe erhalten wird, die offenbar durch die Säureeinwirkung sehr leicht zerstört wird. Hingegen greifen Säuren die salzbildende Gruppierung nicht an und verseifen nicht, sondern verändern gerade die saure Komponente. Damit war der Gedanke gefaßt, daß wir im Chlorophyll einen esterartigen Körper vor uns haben.

Die grünen Verseifungsprodukte der Alkalihydrolyse bezeichnet *Willstätter* allgemein als *Chlorophylline*. Man konnte dieselben trotz ihrer großen Zersetzlichkeit hinreichend rein abtrennen und stellte durch die Analyse fest, daß man in ihnen Magnesiumverbindungen vor sich hat. Die Reaktionen der Chlorophylline beweisen, daß keine Magnesiumionen aus ihnen abspaltbar sind, sondern das Magnesium in komplexer Bindung vorliegt. In der Folge zeigte es sich, daß diese Magnesiumbindung sogar eingreifender Alkalibehandlung bei hohen Temperaturen widersteht, während unter Kohlensäureabspaltung nach und nach drei Carboxylgruppen verloren gehen. Die hierbei entstehenden Körper sind prächtig kristallisierende rotgefärbte Derivate, die unter dem Namen der „*Phylline*“ zusammengefaßt werden. Schließlich aber enthielt man ein carboxylfreies, nicht weniger als 8 % Magnesium enthaltendes Phyllin, welches, wie alle Phylline, 4 Atome Stickstoff auf 1 Mg enthält, das *Ätiophyllin* $C_{31}H_{34}N_4Mg$. Diese Substanz ist sehr bedeutsam, weil sie auch aus dem Hämatin gewonnen werden konnte. Die Ätiophyllingruppierung muß demnach dem Blatt- und Blutfarbstoff gemeinsam sein. Für das Chlorophyllin und den Chlorophyllfarbstoff selbst folgte aus diesem Abbau, daß sie als Tricarbonsäuren aufzufassen sind. Werden die Phylline mit Säure behandelt, so verlieren sie leicht ihr Magnesium und gehen in die gleichfalls rotgefärbten kristallisierenden *Porphyryne* über. Diese Reaktion gab nun *Willstätter* einen Fingerzeig, worin die am Chlorophyll selbst bei der Säureeinwirkung unter Verfärbung eintretende Reaktion besteht. Auch hier entsteht ein magnesiumfreies Produkt, welches besonders gut durch Behandlung mit alkoholischer Oxalsäure erhalten wird, das *Phäophytin*, ein wichtiges Ausgangsmaterial für viele Chlorophyllderivate. Das einst von *Hoppe-Seyler* beschriebene Chlorophyllan war nur unreines Phäophytin gewesen. Phäophytin, eine aschefreie wachsartige

¹⁾ Berlin, Julius Springer, 1913. VIII, 424 S., 16 Fig. u. 11 Taf. Preis geb. M. 18,—, geb. M. 20,50.

Substanz von olivbrauner Farbe, gibt mit Kupfer oder Zink ohne weiteres unter Komplexbindung grüne Derivate, ja *Willstätter* vermochte selbst durch die Einwirkung Grignardscher Lösung, z. B. Methylmagnesiumjodid, daraus das grüne magnesiumhaltige Chlorophyll wiederherzustellen. Verseift man das Phäophytin mit Alkali, so spaltet es einen fettartigen, ungesättigten primären Alkohol mit offener verzweigter Kohlenstoffkette ab, das *Phytol*, $C_{20}H_{39}OH$. Chlorophyll ist somit ein Phytol ester. Die mit dem Phytol verbundene Gruppierung wurde als Chlorophyllid bezeichnet. Das natürliche Chlorophyll ist somit Phytolchlorophyllid. Unzersetztes Blattgrün aus den verschiedensten Pflanzen lieferte stets 33 % Phytol. Doch knüpft sich an diese Feststellung eine Kette mühsam erworbener weiterer Erfahrungen über die Blattpigmente. Im Anfange zeigte es sich, daß der Phytolgehalt des Chlorophylls aus verschiedenen Pflanzenarten sehr ungleich war, ja manchmal ganz vermißt wurde. Die Aufklärung dieses Umstandes kam erst von der Untersuchung des nach *Monteverde* dargestellten „kristallisierten Chlorophylls“, welches alsbald als phytolfrei erkannt wurde. Es stellte sich aber auch heraus, daß gerade jene Pflanzen, die reichlich kristallisiertes Chlorophyll lieferten, ein Enzym enthielten, welches das gewöhnliche amorphe Chlorophyll in Phytol und Alkylchlorophyll spaltet. Daraus erklärte sich nun leicht, warum früher die Art und Weise der Chlorophyllextraktion einen so großen Einfluß auf den Phytolgehalt des Chlorophylls gehabt hatte. Dieses Ferment, die *Chlorophyllase*, ließ sich bisher allerdings noch nicht von dem bei der Chlorophyllextraktion zurückbleibenden Blattpulver trennen, und man war gezwungen, dieses Blattmehl als Enzympräparat zu verwenden. Es gelang schließlich auch, die Synthese des gewöhnlichen Chlorophylls aus Phytol und Äthylchlorophyllid durch das Enzym zu bewerkstelligen.

Eine der bemerkenswertesten Partien der ausgedehnten Arbeit *Willstätters* ist die Erforschung der Phäophytinspaltungsprodukte, welche bei der Alkaliverseifung neben Phytol auftreten. Es war ungemein weittragend, als erkannt wurde, daß hier verschieden stark basische und verschieden gefärbte Produkte in Mischung vorliegen. Durch Ausschütteln der ätherischen Lösungen mit steigend konzentrierter Salzsäure gelang es, eine Fraktionierung dieser Mischung zu erreichen und eine Anzahl von Stoffen zu isolieren, die in indifferenten Lösung olivgrün sind, neben einer Reihe von anderen, die schön rote Lösungen bilden: die *Phytochlorine* und die *Phytorhodine*. Als im Verlaufe der Arbeit die Präparation rascher und gleichmäßiger gestaltet wurde, sah man, daß sich von diesen Stoffen je ein Phytochlorin und ein Phytorhodin immer mehr in den Vordergrund stellten, so daß man bald zu der Ansicht kommen mußte, daß die übrigen Stoffe beider Reihen nur Mängeln in der Präparation und Umlagerungen ihren Ursprung verdanken. Das Phytochlorin e, $C_{34}H_{34}N_4O_5$, ist eine Tricarbonsäure, das Phytorhodin g, $C_{34}H_{34}N_4O_7$ eine Tetracarbonsäure. Wie ist nun das gemeinsame Auftreten die-

ser Verbindungen zu erklären? Beide lassen sich nicht ineinander überführen, und man konnte es auch ausschließen, daß sie Spaltungsprodukte eines größeren Molekels sind. Alles wies vielmehr darauf hin, daß schon im Phäophytin zwei Farbstoffe vorkommen, deren einer nur Phytochlorin, der andere nur Phytorhodin liefert. Dies erwies sich in der Tat als richtig. Aus der Lösung des Phäophytins in Petroläther konnte durch oftmaliges Ausschütteln mit wasserhaltigem Methylalkohol eine Fraktion erhalten werden, die nur Phytorhodin liefert, während der im Petroläther verbleibende grüne Farbstoff ausschließlich Phytochlorin ergab. Dasselbe Verfahren führte auch beim magnesiumhaltigen Chlorophyll zum Ziele, so daß kein Zweifel mehr daran bestand, daß das natürliche Chlorophyll aus zwei Komponenten gebildet wird, die *Willstätter* als Chlorophyll a und b beschreibt. So besteht die von *Tswett* nachdrücklich verteidigte ältere Auffassung von *Stokes* und von *Sorby* über die Doppelnatur des Chlorophyllfarbstoffes tatsächlich zu Recht. *Tswett* hatte die beiden Chlorophylle durch Adsorptionsanalyse abzutrennen vermocht.

Beide Chlorophylle stimmen bezüglich Magnesiumgehalt und Phytolgehalt genau überein. Die Elementaranalyse der schließlich rein dargestellten Farbstoffe ergibt nur einen Unterschied von 2 Wasserstoffatomen gegen ein Sauerstoffatom. Chlorophyll a entspricht wahrscheinlich der Formel $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$, und das Chlorophyll b der Formel $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$. Die Lösungen von a sind rein grün, jene von b blaugrün. Spektroskopisch sind deutliche Unterschiede vorhanden. Chlorophyll b zeigt eine Spaltung der Absorptionsbänder in Rot und Orange. Mit Alkali versetzt färbt sich die Lösung der Chlorophyllkomponente a gelb, jene der Komponente b rot. Die Mischung beider färbt sich mit Alkali, wie *Molisch* bereits vor längerer Zeit feststellte, vorübergehend braun. *Willstätter* hält es für wahrscheinlich, daß bei dieser Reaktion eine Änderung laktamartiger Bindungen im Chlorophyllmolekül unterläuft. Die Reindarstellung beider Chlorophylle ist durch *Willstätters* neueste Arbeiten vermöge der Einführung der Extraktion mit wasserhaltigem Aceton so weit vereinfacht, daß der Blattfarbstoff, nach den Worten unseres Forschers, heute mindestens ebenso leicht isoliert werden kann wie ein Alkaloid oder ein Zucker.

Wichtig war beim Studium des Chlorophylls die Erforschung der stets gemeinsam vorkommenden gelben Begleitfarbstoffe, deren Kenntnis früher von *Tschirch*, *Tswett* und anderen Biochemikern so weit gefördert worden war, daß man von zwei verschiedenen gelben Blattpigmenten sprechen durfte. *Willstätters* Nachprüfung ergab für das Carotin die Zusammensetzung $C_{40}H_{56}$, für das Xanthophyll die Formel $C_{40}H_{56}O_2$. Der letztere Farbstoff war vordem, obwohl er an Masse überwiegt, noch nicht in Substanz dargestellt worden. Beide Pigmente nehmen stark Sauerstoff auf. Braunalgen enthalten, wie schon *Sorby* und *Tswett* angaben, noch einen dritten carotinartigen Stoff, das *Fucoxanthin* oder *Phycoxanthin*, welches *Willstätter* gleichfalls zum ersten Male

darstellte. Es hat die Formel $C_{40}H_{56}O_6$ und geht mit Salzsäure viel leichter als die beiden anderen Pigmente in blaue Chlorhydrate über.

Diese methodische Durcharbeitung ermöglichte es nun, die Pigmente der Blätter auch quantitativ zu verfolgen, wobei man eine Lösung von Reinchlorophyll, respektive von Carotin und Xanthophyll, zum kolorimetrischen Vergleiche heranziehen muß. Statt Carotinlösung ließ sich auch hinreichend genau Kaliumbichromat bei diesem Vergleiche verwenden. 1 kg trockene Hollunderblätter, entsprechend 4 kg frischer Blattsubstanz, enthält nach *Willstätter* 8,48 g Chlorophyll, und zwar 6,22 g Chlorophyll a und 2,26 g Chlorophyll b; ferner 1,48 g Carotinoide, nämlich 0,55 g Carotin und 0,93 g Xanthophyll. Es kommt somit auf 1 Molekül Chlorophyll a und b 0,35 Molekül Carotinoide, auf 1 Molekül Chlorophyll a 0,36 Moleküle Chlorophyll b, und auf 1 Molekül Carotin 1,61 Molekül Xanthophyll. Jahreszeit, Tageszeit, Belichtung ergaben keine erheblichen Unterschiede bei den verschiedenen Pflanzenarten. Die Zahl der untersuchten Pflanzenarten ist noch nicht sehr groß. Die Abweichungen vom Durchschnitt des Farbstoffgehaltes betrugen bis 30 %. Bezüglich der Funktion der Blattfarbstoffe im Assimilationsprozeß stellt *Willstätter* eine interessante Hypothese auf, die sich jedenfalls experimentell weiter prüfen lassen wird. Er nimmt an, daß die Kohlensäure durch die Affinität der Magnesiumverbindungen angezogen werde, und das Magnesium, ähnlich wie in der Grignardschen Synthese, eine Bedeutung bei der Kondensation habe. Die Reduktion der Kohlensäure werde durch die Komponente a unter Verbrauch der absorbierten Lichtenergie bewerkstelligt. Hierbei oxydiert sich das Chlorophyll a zum Chlorophyll b, und diese wird unter Sauerstoffabspaltung wieder in die Komponente a zurückverwandelt. Ausgeschlossen ist es nach *Willstätter* nicht, daß sich die Carotinoide an dem Rückverwandlungsprozeß in Chlorophyll a beteiligen. Gegen eine Verknüpfung der Carotinoide mit der Chlorophyllfunktion wird man allerdings immer einwenden können, daß Carotinoide sehr oft ohne Chlorophyllbegleitung vorkommen. Ihre Bedeutung dürfte eher in der Sauerstofffixierung im Dienste der Atmung liegen, und vielleicht spielen sie auch in den Chloroplasten mit ihrer intensiven Lebenstätigkeit eine derartige Rolle. So bieten die Forschungen *Willstätters* dank ihrer erheblich verbesserten quantitativen Methodik viele neue Anregungen, und es steht zu hoffen, daß nun eine Ära neuer Erfolge in der Ernährungsphysiologie der Blätter anbrechen wird. Manche früher verbreiteten Ansichten bezüglich der Chemie des Chlorophylls dürften infolge der Arbeiten *Willstätters* nun endgültig verschwinden. Dies gilt in erster Linie von der durch *Hoppe-Seydler* zuerst vertretenen Lecithintheorie des Chlorophylls, die bis in die jüngste Zeit in *Stoklasa* einen eifrigen Verteidiger fand. Allein das reine Chlorophyll ist sicher phosphorfrei, und es ist daran nicht mehr zu zweifeln, daß man früher ein Quantum von Phospholipoiden mit dem Chloro-

phyllfarbstoff zusammen ausgefällt hatte, und diese Beimengungen als solche unerkannt geblieben waren.

Sehr dankenswert ist die kurze Zusammenstellung grundlegender Versuche aus dem Gebiete der Chlorophyllechemie, die wohl bald in die botanischen Vorlesungen und Laboratoriumsübungen allgemeinen Eingang finden werden. Der Schlußabschnitt des Buches befaßt sich mit dem Abbau des Hämins, Untersuchungen, die mittlerweile in erweiterter Form in der „Zeitschrift für physiologische Chemie“ veröffentlicht worden sind.

Neuere Darstellungen künstlicher Edelsteine.

Von Prof. Dr. C. Doelter, Wien.

Seit den Arbeiten von *Frémy*, welchem die Darstellung des Rubins in tadelloser Weise zuerst gelang, sind große Fortschritte in der Synthese der Kunststeine erzielt worden. Sie betreffen allerdings nur Varietäten des Korunds, des Aluminiumsesquioxids oder der Tonerde. Über die älteren Arbeiten soll hier nichts weiter mitgeteilt werden, da, was Rubin anbelangt, in den letzten Jahren wenig Bemerkenswertes geleistet wurde, nachdem es dem Schüler *Frémys*, Herrn *Verneuil*, in Paris gelungen war, vermittels eines Knallgasofens die Tonerde zu schmelzen und homogene Kristalle roten Rubins in so vollendeter Weise darzustellen, daß eine Unterscheidung schwer durchführbar ist.

Auf diese Unterscheidung wird noch später zurückzukommen sein. Die neueren Arbeiten betreffen insbesondere den Saphir und einige andere Korundvarietäten, den weißen und gelben Saphir sowie einen grünlichen Saphir.

Vor allem möchte ich betonen, daß ein Edelstein nicht als vollkommen dargestellt betrachtet werden kann, solange die Unterscheidung leicht ohne Anwendung genauer und komplizierter Untersuchungsmethoden geschehen kann. Dies war also bisher nur bei dem blutroten Rubin der Fall. Saphir war zwar schon früher hergestellt worden, aber dieser synthetische Saphir war unschwer von dem natürlichen zu unterscheiden, sowohl in ungeschliffener als in geschliffener Form, da er wohl die Farbe, aber nicht das Kristallsystem des Saphirs, die Doppelbrechung, und nicht einmal die chemische Zusammensetzung des natürlichen Saphirs besaß. Diese Kunstsaphire waren daher eigentlich gar keine, sondern es waren nur Imitationen, die zwar den Laien täuschen, aber einer näheren Untersuchung nicht standhalten konnten, da es leicht ist, diese Kunststeine als nicht doppeltbrechende Körper von dem doppeltbrechenden natürlichen Saphir zu unterscheiden. Auch fand *R. Brauns*, daß seine Dichte um volle 0,5 von der des Saphirs abwich.

Verneuil gelang es jedoch bald darauf Saphire herzustellen, welche die physikalischen Eigenschaften des wirklichen Saphirs besaßen; indessen war noch das Färbemittel zu finden,