

## Untersuchungen über Chlorophyll;

von *Richard Willstätter*.

[Mitteilung aus dem chemischen Laboratorium des schweizerischen Polytechnikums in Zürich.]

### XV. Isolierung des Chlorophylls;

von *Richard Willstätter* und *Ernst Hug*.

(Eingelaufen am 1. Februar 1911.)

Das Ziel unserer Untersuchung ist die Isolierung des Chlorophylls, frei von Begleitstoffen in unversehrtem Zustand. Um die Aufgabe zu lösen, war es notwendig, zuerst die Merkmale des Chlorophylls kennen zu lernen. Dadurch sind die Anforderungen festgestellt worden, denen der Farbstoff in den einzelnen Phasen der Isolierung und im isolierten Zustand genügen muß.

Zunächst sind dem Chlorophyll gelbe Pigmente beigemischt, Carotin und Xanthophyll, die stets neben dem grünen Farbstoff in den Chloroplasten vorkommen; solange sie das Chlorophyll begleiten, erhält man durch Verseifen mit alkoholischem Kali und Ausäthern gelb gefärbte Lösungen. Farblose Begleiter, Fette, Wachse und fettsäurere Salze, folgen dem Chlorophyll und verteilen sich zwischen verschiedenen Lösungsmitteln in ungefähr demselben Verhältnis wie Chlorophyll; sie drücken den Magnesiumgehalt des Farbstoffs herab und geben der Asche eine Beimischung von Kalk. Die Löslichkeitsverhältnisse boten keine Handhabe für die Trennung des Chlorophylls von den Begleitern. Der Farbstoff schien in allen organischen Solvenzien spielend löslich zu sein; er kann allerdings aus den Blättern mit Benzol, Ligroin und Schwefelkohlenstoff nicht extrahiert werden, aber diese Erscheinung ist von A. Arnaud<sup>1)</sup> und von

<sup>1)</sup> Compt. rend. 100, 751 (1885).

M. Tswett<sup>1)</sup> auf Adsorption des Farbstoffes durch das Blattgewebe zurückgeführt worden.

Ein dem Chlorophyll noch sehr nahestehendes Derivat ist das „krystallisierte Chlorophyll“, welches J. Borodin<sup>2)</sup> beim Behandeln von Blattschnitten mit Alkohol unter dem Mikroskop entdeckt und das Willstätter und Benz<sup>3)</sup> darzustellen gelehrt haben. Schwerlöslichkeit in Äther und ausgezeichnete Krystallisationsfähigkeit haben die Isolierung des schönen Farbstoffs leicht gemacht. Unter dem Einfluß der Anschauungen von N. A. Monteverde<sup>4)</sup> galt uns eine Zeitlang das krystallisierte Chlorophyll als ein natürliches Pigment, bis wir erkannt haben, daß dem Chlorophyll aller Pflanzen<sup>5)</sup> der Gehalt an Phytol gemeinsam ist, während es dem krystallisierten Chlorophyll fehlt. Das Phytol ist hier durch Alkohololyse unter der Wirkung einer spezifischen Esterase, der Chlorophyllase<sup>6)</sup>, abgetrennt und durch Äthylalkohol ersetzt worden. Das *krystallisierte Chlorophyll* nach Borodin wird daher genauer als *Äthylchlorophyllid* bezeichnet. Nach diesen Erfahrungen ist von intaktem Chlorophyll zu fordern, daß Phytol zu fast einem Drittel des Gewichts darin enthalten ist.

Der Gang der Isolierung wird nun so geleitet, daß die Wirkung jeder Behandlung auf das Chlorophyll durch die colorimetrische Bestimmung seines Reinheitsgrades geprüft wird, wofür das krystallisierte Äthylchlorophyllid die Grundlage bietet. Aber das eine Prinzip hat nicht ausgereicht. Wir sind bei vielen Vorversuchen zu Chlorophyllpräparaten gelangt, die zwar nach der colorimetrischen Analyse fast 100 prozentig sind, also von Begleitstoffen frei, die annähernd ein Drittel Phytol ent-

<sup>1)</sup> Arbeit, d. Naturf. Ges. Kasan 35, 86 (1901).

<sup>2)</sup> Botanische Zeitung 40, 608 (1882).

<sup>3)</sup> Diese Annalen 358, 267 (1908).

<sup>4)</sup> Acta Horti Petropolitani 13 Nr. 9, 123 (1893).

<sup>5)</sup> Diese Annalen 378, 1 (1910).

<sup>6)</sup> R. Willstätter und A. Stoll, diese Annalen 378, 18 (1910).

halten und die dennoch nicht aus unverändertem Chlorophyll bestehen. Sie unterscheiden sich nämlich vom Chlorophyll guter Blätterauszüge in gewissen Merkmalen, die sich in den vorangehenden Untersuchungen ergeben haben, namentlich in zwei Eigenschaften, die dem Chlorophyll beim Stehen der Lösungen, beim Eindampfen, beim Aufnehmen mit Adsorptionsmitteln, überhaupt bei allen Operationen sehr leicht verloren gehen, ohne daß die Änderung durch einen auffälligen Unterschied im Spektrum verraten wird. Diese Änderungen sind daher auch von anderen Autoren, welche die Isolierung des Chlorophylls angestrebt haben, noch nicht beachtet worden.

Solange das Chlorophyll intakt ist, zeigt es beim Verseifen mit alkoholischem Kali einen auffälligen Farbumschlag in braun; es dauert einige Minuten bis die Verseifung vollständig wird, und in dieser Zeit kehrt die Chlorophyllfarbe zurück. Es scheint dabei eine chromophore Gruppe gespalten und dann an ihrer Stelle eine ähnliche neu gebildet zu werden. Die „braune Phase“ fehlt den Lösungen und Präparaten von verändertem Chlorophyll. Ferner erleidet das Chlorophyll sehr leicht Umwandlungen, durch welche die Beschaffenheit der Spaltungsprodukte des Phäophytins geändert wird. Nur solange der Farbstoff unversehrt ist, liefert sein magnesiumfreies Derivat bei der Hydrolyse mit Alkalien als Spaltungsprodukte Phytochlorin e und Phytorhodin g, und zwar nur diese. Ihr Mengenverhältnis ist in der voranstehenden Untersuchung von Willstätter und Isler ermittelt worden.

In guten alkoholischen Extrakten getrockneter Blätter ist das Chlorophyll durch ungefähr das Sechsfache an Begleitstoffen verdünnt. Die Konzentration des Farbstoffs steigt auf das Doppelte, wenn er aus dem Extrakt in Petroläther übergeführt wird. Durch Vorbehandeln der Blätter mit Lösungsmitteln, welche die Begleitstoffe, aber kein Chlorophyll extrahieren, am besten mit Benzol, gewinnt man Extrakte, die, ohne selbst einen höheren

Reinheitsgrad zu besitzen, doch ein viel günstigeres Resultat beim Entmischen mit Petroläther ergeben, nämlich Chlorophyll, das nur noch weniger als das  $1\frac{1}{2}$  fache Gewicht anderer Stoffe mitführt. Der Reinheitsgrad läßt sich durch Waschen der petrolätherischen Rohlösung mit Holzgeist auf 60 Proz. steigern und noch höher, wenn man mit demselben Lösungsmittel, das zum Auswaschen gedient hat, den Farbstoff aus dem Petroläther extrahiert und ihn von neuem in Petroläther überführt. So erhalten wir Lösungen von 70 prozentigem Chlorophyll, die durch weitere Behandlung mit Solvenzien nicht verbessert werden können.

Wenn das Chlorophyll diesen Reinheitsgrad erreicht hat, dann ist seine Löslichkeit von den Beimischungen nicht mehr so wie anfangs beeinflußt. Es zeigt sich jetzt überraschenderweise in Petroläther nur löslich, solange dieser Methyl- oder Äthylalkohol enthält. Wird der Alkohol quantitativ herausgewaschen, so trübt sich die Lösung, und das Chlorophyll fällt in fein verteiltem Zustand aus. Auf dieser Abscheidung aus der gereinigten Lösung beruht unser Verfahren der Isolierung. Einmal isoliert, läßt sich das Präparat durch Umfällen aus Alkohol mit Salzlösung und durch wiederholtes Umscheiden aus konzentrierter ätherischer Lösung mit Petroläther weiter verbessern.

Das isolierte Chlorophyll erweist sich bei rasch ausgeführten, gut gelungenen Versuchen als rein und gemäß der Prüfung mit allen bekannten Merkmalen als unverändert. Es bildet mikroskopische Krystallaggregate und ist pulverig, nicht von wachsartiger Beschaffenheit. In Alkohol und in Äther ist es leicht löslich, in Petroläther unlöslich, seine Lösungen zeigen leuchtend blaugrüne Farbe und das gleiche Spektrum wie die Extrakte aus frischen Blättern. Das Chlorophyll ist frei von Phosphor; beim Veraschen hinterläßt es gegen 5 Proz. Magnesia. Bei der Verseifung liefert es 30 Proz. Phytol, enthält zwei Carboxylgruppen mit Phytol und Methylalkohol ver-

estert und ein Carboxyl frei oder vielleicht richtiger latent. Sein Phäophytin liefert die normalen Spaltungsprodukte. Die Analyse eines Präparates hat folgende Zusammensetzung<sup>1)</sup> ergeben, neben welche wir eine vorläufige Formel stellen, die aus der Analyse von Äthylchlorophyllid abgeleitet ist:

	Analyse	Theorie für $C_{55}H_{72}O_6N_4Mg$
C	72,13	72,59
H	7,79	7,98
N	6,19	6,16
Mg	2,99	2,68

Das reine Chlorophyll hat uns fürs erste zur Lösung der Frage gedient, ob das Phytol als solches dem Molekül des Farbstoffs angehört, oder ob der ungesättigte Alkohol erst unter den Bedingungen der Verseifung von Phäophytin aus einem gesättigten Glykol hervorgeht. Wir haben nun das Phytol aus dem Chlorophyll unter den gelinden Bedingungen der Alkohololyse mittels der Chlorophyllase abgespalten und mit besonderer Vorsicht isoliert. Die Jodzahl stimmte, der abgespaltene Alkohol war reines Phytol. Bei diesem Versuche entstanden aus dem Chlorophyll der Brennesseln die schönen Krystalle des Äthylchlorophyllids von Borodin.

Unsere Präparate von Chlorophyll stimmen nicht überein mit den Angaben, die der russische Botaniker M. Tswett im Jahr 1900 über das von ihm in kleinem Maßstab isolierte Pigment veröffentlicht hat.<sup>2)</sup> Er beschreibt es (Chlorophyllin a) als leicht löslich in Ligroin, halbfest und krystallisierend, und zwar nur aus Alkohol.

<sup>1)</sup> Hoffentlich werden künftig die längst veralteten Angaben für die Zusammensetzung, namentlich über den Eisengehalt des Chlorophylls verbessert werden, die sich in den neuen Auflagen verbreiteter Lehrbücher der Chemie (z. B. Richter-Klinger 1910, Erdmann 1910) und in den agrikulturchemischen Büchern finden.

<sup>2)</sup> Physiko-chemische Struktur des Chlorophyllkornes, Arbeiten d. Naturf. Ges. Kasan 35, 94 (1901) (russisch).

Es ist nicht analysiert worden.<sup>1)</sup> Wahrscheinlich hat Tswett seine Ansicht über das Präparat geändert, da er in seinen späteren Veröffentlichungen nicht mehr darauf zurückgekommen ist, auch nicht in seinem neuen Buche<sup>2)</sup>, das wir soeben erhalten haben: „Die Chromophylle in der Pflanzen- und Tierwelt“ (russisch). Vielmehr ist Tswett in diesem Werke<sup>3)</sup> auch zu der wichtigen Beobachtung<sup>4)</sup> gelangt, daß das Chlorophyll nach der Reinigung der petrolätherischen Lösung aus dieser durch Entfernen des Alkohols ausgefällt wird und in Ligroin nicht mehr löslich ist.

In unserer Untersuchung haben wir einen Umstand vom Anfang bis zum Ende außer Betracht gelassen, nämlich die Frage, ob das Chlorophyll einheitlich oder ein Gemisch zweier Farbstoffe ist. Was wir zunächst erzielt haben, war die Isolierung des grünen Pigments in der Zusammensetzung, wie es in der Pflanze vorkommt. Ist es in der Pflanze ein Gemisch von zwei Komponenten, so ist das isolierte Chlorophyll dasselbe Gemisch oder ein Gemisch in ähnlichem Verhältnis, denn die beiden Spaltungsprodukte Phytochlorin e und Phytorhodin g entstehen bei seinem Abbau in ähnlichem Verhältnis wie bei der Verseifung des aus den Blätterextrakten gefällten Phäophytins.

Nachdem die Isolierung erreicht war, hat die Fortführung der Arbeit durch Willstätter und Isler ergeben, daß das Pigment wirklich ein Gemisch ist von einer blaugrünen (a) und einer gelbgrünen (b) Komponente, so wie Stokes, Sorby und von neueren Autoren namentlich Tswett längst behauptet haben.<sup>5)</sup> In einer

<sup>1)</sup> Tswett führt in seinem neuen Buche (1910, S. 210) an, der Stickstoffgehalt des Chlorophylls sei zweifelhaft; daß es ein Ester des Phytols sei, erklärt Tswett für eine unbegründete Annahme.

<sup>2)</sup> Warschau 1910, 379 Seiten.

<sup>3)</sup> Seite 206.

<sup>4)</sup> Diese Angabe ist von Willstätter und Hug bereits veröffentlicht worden in diesen Annalen 378, 21 (1910).

<sup>5)</sup> Die Literaturzitate siehe in der XIV. Abhandlung.

folgenden Arbeit sollen die zwei Komponenten beschrieben werden. Die Schwierigkeit bei ihrer Trennung lag in ihrer Veränderlichkeit. Nur dann können die Komponenten als intakt gelten, wenn die eine beim Abbau reines Phytochlorin e, die andere Phytorhodin g liefert; die Untersuchung der Spektren ist nicht ausreichend. In dieser Hinsicht sind die Angaben der Literatur über die Scheidung durch Entmischung in kleinerem Maßstab nicht brauchbar; denn niemals ist das Resultat eines Entmischungsversuches durch die Bestimmung der Spaltungsprodukte vervollständigt worden.

Wir sind daher auch zu einer Auffassung von der Zusammensetzung der Borodinschen Chlorophyllkrystalle gekommen, die der Ansicht von Tswett hierüber sehr ähnlich ist.

Tswett hat vor kurzem mitgeteilt<sup>1)</sup>, daß die Krystalle ein isomorphes Gemisch von zwei Komponenten seien, welche in einer Beziehung stehen zu den zwei Komponenten des natürlichen Farbstoffes. Das ist richtig. Aber wir haben auch so gut wie einheitliche krystallisierte Chlorophylle erhalten, nämlich Methylchlorophyllide. Dies ist in der Abhandlung von Willstätter und Stoll<sup>2)</sup> veröffentlicht worden.

Wie Tswett mitteilt, hat er die Auflösung des Gemisches der Borodinschen Krystalle mittelst der Adsorptionsanalyse ausgeführt und zwar in ätherhaltiger petrolätherischer Lösung. Da die Krystalle in Petroläther vollkommen unlöslich sind, muß die Lösung äußerst verdünnt gewesen sein. Es ist ungewiß, ob die von Tswett in kleinstem Maßstab getrennten Komponenten noch krystallisieren, ob sie intakt geblieben sind oder ob, was nach unseren Erfahrungen wahrscheinlich ist, eine Änderung des Phytochromins erfolgt ist. Hierüber kann nur der Abbau zum Phytochlorin und Phytorhodin Aufschluß geben.

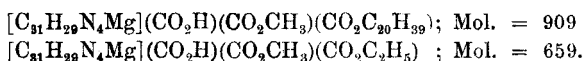
<sup>1)</sup> Ber. d. d. chem. Ges. **43**, 3139 (1910).

<sup>2)</sup> Diese Annalen **378**, 57 (1910).

**Experimenteller Teil.****I. Die Chlorophylllösungen.****A. Die Rohlösungen.***1. Reinheitsgrad.*

Das Verhältnis des Chlorophylls zur Gesamtmenge der gelösten Stoffe drücken wir in Prozenten aus und nennen die Zahl den Reinheitsgrad des Chlorophylls. Mittels dieses Wertes wird der Einfluß der Darstellungsweise und der Reinigungsoperationen auf die Trennung des Chlorophylls von den farblosen und gelben Begleitern geprüft.

Den Reinheitsgrad leiten wir aus dem Trockenrückstand und dem colorimetrisch ermittelten Chlorophyllgehalt<sup>1)</sup> ab. Der Vergleich, den wir im Colorimeter von Dubosq ausführen, mit einer Lösung von Borodinschen Krystallen ergibt das Äquivalent an Äthylchlorophyllid. Hieraus folgt der Betrag von phytolhaltigem Chlorophyll, unter Berücksichtigung, daß das Molekulargewicht des letzteren um etwa 38 Proz. größer ist als das des Äthylderivates, gemäß den vorläufig geltenden Formeln:



Diese colorimetrische Bestimmung ist sehr nützlich für die annähernde Gehaltsbestimmung von Rohchlorophyll; hingegen reicht ihre Genauigkeit nicht hin zur Untersuchung von hochprozentigen, schon annähernd reinen Chlorophyllpräparaten, weil hier die Fehlerquellen, wie die Ungleichheiten der Farbnuancen, erheblich ins Gewicht fallen.

Den Rückstand einer Lösung bestimmen wir durch Abdampfen im Wasserbad und Erwärmen im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz, die bei Mengen von 1—2 g

<sup>1)</sup> Nach R. Willstätter, F. Hocheder und E. Hug, diese Annalen 371, 11 (1909).



meist in  $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$  Stunden erreicht wird. Hochprozentige Lösungen geben einen glänzenden, blauschwarzen, spröden Rückstand, der sich nach dem Trocknen leicht mit schön grüner Farbe löst; Lösungen von geringer Konzentration liefern einen im Vakuum sich aufblähenden, harzigen, schwer löslichen, mißfarbigen Rückstand.

## 2. Die Extrakte.

Frische Blätter bieten keinen Vorteil in bezug auf die Beschaffenheit des Chlorophylls, was sich auch aus der voranstehenden Arbeit von Willstätter und Isler ergeben hat. Sie liefern stets weniger günstige Konzentrationen von Chlorophyll und sie lassen sich nicht in den für unsere Arbeit erforderlichen bedeutenden Quantitäten beschaffen. Wir haben daher in allen Fällen mit getrockneten, fein gemahlenden Blättern gearbeitet und zwar zumeist mit käuflichen Brennesseln, die sich wegen des hohen Gehalts an Chlorophyll und des geringen Gehalts an Chlorophyllase besonders gut eignen.

Die Ausbeuten an Chlorophyll wachsen mit der Zeitdauer der Extraktion; wir gewinnen z. B. aus 1 kg Brennesselmehl beim Ausziehen auf der Nutsche folgende Ausbeuten:

Extraktionszeit	Extrakt in cem	Chlorophyll in g
15 Min.	700	2,9
19 „	800	3,3
25 „	850	3,7
120 „	800	4,4
3 Tage	6000	7,1 (Quantitat. Extrakt.)

Gegen die langsame Extraktion, die wir für präparative Zwecke früher in Flaschen<sup>1)</sup> (Einfache- und Doppel-extrakte) und in Perkolatoren<sup>2)</sup> ausgeführt haben, bestehen zwei Bedenken, wenn es sich um die Isolierung möglichst unveränderten Chlorophylls handelt:

<sup>1)</sup> R. Willstätter, diese Annalen 350, 65 (1906).

<sup>2)</sup> R. Willstätter in E. Abderhaldens Handbuch d. biochem. Arbeitsmethoden, Bd. II, S. 674 (Berlin 1910).

1. Die Alkohololyse unter der Wirkung der Chlorophyllase bedingt einen Verlust an Phytol, der auch bei Brennesseln, obwohl sie zu den an Enzym armen Pflanzen zählen, nicht unerheblich ist.

Die Phytolzahl für Brennesseln war bei langsamer Extraktion im Mittel der Bestimmung an 12 Präparaten 28,2, hingegen bei rascher Extraktion 32,2 ( $u = 13$ ).

2. Bei längerem Stehen der Lösungen verändert sich das Chlorophyll, besonders leicht in Brennesselextrakten, derart, daß die Spaltung des Phäophytins an Stelle des normalen Phytochlorins e das schwächer basische Phytochlorin f ergibt (siehe die XIV. Abhandlung).

Das Gelingen der Isolierung von unverändertem Chlorophyll hängt ab von der möglichst raschen Vornahme aller Operationen von den getrockneten Blättern bis zum festen Farbstoff.

Es ist daher geboten, ein abgekürztes Verfahren der Extraktion anzuwenden, immerhin mit einer nicht zu raschen Ausführung, damit der Ertrag an Chlorophyll nicht zu ungünstig wird. Wir erreichen dieses Ziel am besten nach dem Nutschenverfahren mit einer Extraktionszeit von 2—3 Stunden für die Charge von 2 kg. Die Menge des Lösungsmittels braucht dabei nicht größer zu sein als bei der Herstellung von Doppelextrakten, wir reichen aus mit 1,5 Liter pro kg Mehl. Diese Extraktionsmethode bietet abgesehen von ihrer Einfachheit den größten Vorteil bei der Kombination der Vorextraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln und der Extraktion mit Alkohol.

Das von Willstätter und Stoll<sup>1)</sup> beschriebene Nutschenverfahren vereinfachen wir für die Arbeit in größerem Maßstabe, indem wir das Blattpulver, ohne es zuvor mit Alkohol anzufeuchten, in die Nutsche einfüllen. Unter stetem Saugen mit dem Maschinenvakuum wird das Mehl gleichmäßig auf der Nutsche verteilt. Bei einiger Übung und sorgfältigem Arbeiten gelingt es auch

<sup>1)</sup> Diese *Annalen* 378, 26 (1910).

eine große Steinzeugnutsche mit 20 kg Pulver zu füllen, ohne daß bei der Extraktion Unregelmäßigkeiten vorkommen. Während des Einfüllens stellt man das Vakuum von Zeit zu Zeit ab und drückt das Pulver gleichmäßig fest. Damit das Ausziehen in kurzer Zeit möglich ist, darf aber die Füllung nicht zu stark zusammengepreßt werden. Nach dem Einfüllen wird sofort das Lösungsmittel aufgegossen und durchgesaugt.

Auf den Reinheitsgrad des Chlorophylls üben, wie die folgenden Beobachtungen zeigen, Extraktionsmethode und Extraktionsdauer nur wenig Einfluß<sup>1)</sup> aus, weniger als Verschiedenheiten der Ernten.

Extraktion von 1 kg Brennesseln	Extraktions- zeit	Extrakt in cem	Chlorophyll in g	Rückstand in g	Reinheits- grad
1. Perkolate					
a) lang	48 Stunden	1000	5,5	33,6	16
b) kurz, 1. Abfluß	1 Stunde	120	0,6	4,9	12
c) „ 2. Abfluß	2 Stunden	220	1,5	12,3	12
2. Flaschenextrakte					
a) Doppelextrakte	48 „	1060	5,5	34,8	16
b) einf. Extrakte	48 „	1600	6,2	46,6	13
c) rasch. „	10 Minuten	1300	2,8	22,0	13
d) rasch. „	30 „	1600	3,5	21,6	16
3. Nutschenextrakte					
a) rasch	15 „	500	2,1	12,5	17
b) mäßig rasch	2 Stunden	800	4,4	31,4	14

Andere Lösungsmittel, wie Alkohol-Petroläthergemisch, Aceton, Holzgeist verbessern das Resultat nicht; der letztere extrahiert Chlorophyll schlechter als Äthylalkohol.

### 3. Vorextraktion.

Petroläther, Benzol und Schwefelkohlenstoff entziehen dem Pflanzenmehl kein Chlorophyll, aber eine er-

<sup>1)</sup> Dessenungeachtet fanden Willstätter und Stoll den Fällungskoeffizienten bei der Phäophytingewinnung günstiger für Schnellextrakte.

hebliche Menge von farblosen und gelben Begleitstoffen; den Nutzen der Vorbehandlung mit solchen Lösungsmitteln darf man indessen nicht nach der Menge des Weggelösten bewerten, denn nach der Vorextraktion werden die Extrakte nicht günstiger in bezug auf den Reinheitsgrad des Chlorophylls. Vielmehr zeigt sich die Wirkung der Vorextraktion nur bei der Gewinnung der petrolätherischen Rohchlorophylllösung durch Entmischen des alkoholischen Extraktes mit Petroläther.

Wir haben die Vorextraktion erst mit Vorteil anwenden können, als wir es vermieden, nach derselben das Material wieder zu trocknen. Beim Arbeiten im Perkulator läßt sich indessen diese umständliche und für das Chlorophyll ungünstige Operation nicht entbehren, weil sonst beim Extrahieren der durch die Vorbehandlung kompakter gewordenen Füllung stets Verstopfung eintritt. Hier ergab sich eine wesentliche Verbesserung der Arbeitsweise durch das Nutschenverfahren.

Die Vorextraktion auf der Nutsche mit 5—6 Liter Solvens beansprucht für die 2 kg-Charge 2 bis 3 Stunden. Nach dem Abfließen wird sogleich der Alkohol für die Extraktion des Chlorophylls aufgegossen; zunächst verdrängt er das im Mehl zurückgebliebene erste Lösungsmittel. Dann wird einfach der Abfluß separat aufgefangen, sobald auf das fast farblose erste Solvens die dunkelgrüne alkoholische Lösung folgt.

Die mit Petroläther (spez. Gewicht 0,64—0,66) erhaltenen Auszüge sind braungelb bis braun, die benzolischen dunkelbraun oder olivbraun, die Schwefelkohlen-

Charge	Methode der Vorextraktion	Solvens	Trockenrückstand pro 1 kg Brennesseln
30 kg	Perkulator	100 Liter Petroläther	16,7 g
1	„	2 „ „	8,9
2	Nutsche	7 „ „	9,2
2	„	6 „ Benzol	17,0

stofflösungen dunkelrotbraun. Alle sind so gut wie frei von Chlorophyll.

Am günstigsten war die Wirkung von Benzol für den Reinheitsgrad des Chlorophylls (50 anstatt 37), ungünstig die von Petroläther. Nach der Vorbehandlung mit Petroläther begleiten nämlich noch fast ebenso viele petrolätherlösliche Stoffe das Chlorophyll wie ohne Vorextraktion. Besonders auffallend wird diese Erscheinung beim Vorextrahieren mit Petroläther und beim Ausziehen des Chlorophylls mit Petroläther-Alkoholmischung (20 Proz. Alkohol).

Die sukzessive Vorextraktion mit Benzol und mit Petroläther hat zwar keinen größeren Nutzen für die Chlorophyllkonzentrationen geboten, aber sie war notwendig, weil die petrolätherischen Lösungen des Chlorophylls für unser Verfahren der Isolierung frei von Benzol sein müssen. Die kombinierte Vorbehandlung erfordert pro Kilogramm Brennesseln 3 Liter Benzol und 1 bis 1  $\frac{1}{2}$  Liter Petroläther.

Nummer	Vor- extraktion	Extraktion	Extrakt			Rohlösung		
			Chloro- phyll in g	Rück- stand in g	Rein- heits- grad	Chloro- phyll in g	Rück- stand in g	Rein- heits- grad
1	keine	Alkohol	4,9	37,3	13	3,5	11,2	31
2	„	Holzgeist	3,7	33,8	10	2,4	8,8	27
3	Petroläther	Alkohol	5,3	35,0	15	3,6	9,8	37
4	„	Holzgeist	3,7	41,2	9	2,3	8,2	28
5	„	Petroläther- Alkohol	—	—	—	5,0	22,3	22
6	Benzol	Petroläther- Alkohol	—	—	—	3,5	11,2	31
7	„	Alkohol	6,1	43,7	14	3,9	8,0	49 <sup>1)</sup>
8	Benzol, dann Petroläther	„	4,2	24,0	17	2,4	5,7	42

In der Tabelle tritt der Gewinn für den Reinheitsgrad bei den petrolätherischen Rohlösungen zutage. Die

<sup>1)</sup> Die Zahlen für die Rohlösung von Nr. 7 sind Mittelwerte aus 4 Versuchen.

Angaben für die Versuche 1—5 beziehen sich auf die petrolätherische Rohlösung I, die Versuche 6—8 auf die (einmal gewaschene) Rohlösung II, deren Beschreibung im Abschnitt B folgt. Die Resultate sind mit Chargen von 2 kg Brennesseln erzielt und für die Tabelle auf 1 kg umgerechnet worden.

4. *Überführung des Chlorophylls in Petroläther, Rohlösung I (40—45 prozentig).*

Aus dem alkoholischen Extrakt führen wir das Chlorophyll nach dem Prinzip der Krausschen Entmischung in Petroläther über. Wir fügen zuerst Petroläther und dann Wasser hinzu, und zwar zweckmäßig  $\frac{2}{3}$  vom Volumen des Extraktes an Petroläther und  $\frac{1}{3}$  Volumen Wasser und trennen die intensiv grüne Benzinschicht von der gelbgrünen und gelb tingierenden wäßrig-alkoholischen Mutterlauge, welche mit dem kleineren Teil des Chlorophylls die wasserlöslichen Beimischungen beseitigt. Die petrolätherische Flüssigkeit soll als Rohlösung I bezeichnet werden. Die Extrakte von den Reinheitsgraden 14—17 liefern Rohlösungen I von den Reinheitsgraden 30—44.

		1 Vol. Extrakt mit		Rohlösung I		
		Petrol- äther Vol.	Wasser Vol.	Chloro- phyll in g	Rück- stand in g	Rein- heits- grad
1.	I. Fraktion	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{4}$	2,2	7,6	29
	II. „	$\frac{1}{6}$	$\frac{1}{3}$	0,5	1,8	28
2.	I. „	$\frac{3}{4}$	$\frac{1}{10}$	1,6	6,0	27
	II. „	$\frac{3}{4}$	$\frac{1}{5}$	1,4	4,9	28
3.	I. „	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{4}$	2,3	8,5	27
	II. „	$\frac{2}{3}$	$\frac{1}{7}$	0,6	3,6	17
4.	ohne Fraktionierung	$\frac{1}{3}$	$\frac{2}{5}$	3,1	11,9	26
5.	„ „	$\frac{3}{4}$	$\frac{1}{4}$	2,6	8,6	30
6.	„ „	$\frac{2}{3}$	$\frac{1}{3}$	2,7	8,7	31 <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Die Angaben für Nr. 6 sind Mittelwerte von 5 Versuchen.

Fraktionierte Überführung des Chlorophylls in Petroläther hat keinen Vorteil geboten, wie die vorstehende Tabelle zeigt. Die Versuche sind mit Extrakten aus 1 kg Brennesseln mit 4,4 g Chlorophyll vom Reinheitsgrad 14 ausgeführt worden.

### B. Fraktionierung der Rohchlorophylllösungen.

#### 1. Waschen mit Holzgeist. Rohlösung II (60 prozentig).

Durch Waschen mit wasserhaltigen Alkoholen läßt sich die Chlorophyllkonzentration in der petrolätherischen Schicht steigern, und zwar von den Reinheitsgraden 30—40 auf 50—60, aber dann nicht weiter. Der Alkohol darf nicht zu konzentriert sein, da er sonst zwar um so mehr von den Begleitstoffen, aber auch zuviel Chlorophyll entfernt. Holzgeist ist dem Äthylalkohol vorzuziehen.<sup>1)</sup> Chlorophyll ist schwerer in ihm löslich. Ferner ist, wie nachstehender Versuch zeigt, in wasserhaltigem Holzgeist viel weniger Petroläther löslich als in Weingeist, und man kann daher mit Holzgeist leichter und schärfer fraktionieren als mit Äthylalkohol.

Je 50 ccm absoluter Alkohol und käuflicher Methylalkohol werden mit 50 ccm Petroläther vom Siedep. 30—50° vermischt. Auf Zusatz von Wasser wird Petroläther in folgendem Maße abgeschieden:

Wasserzusatz	Petroläther aus der Mischung mit Methylalkohol	Petroläther aus der Mischung mit Äthylalkohol
0,7 ccm	10 ccm	0 ccm
1	20	0
3	40	0
5	45	22
10	50	43

Vor der Anwendung ist der wasserhaltige Holzgeist mit Petroläther vom Siedep. 30—50° gesättigt worden.

*Beispiel.* 800 ccm Rohlösung vom Reinheitsgrade 36 und 3,7 g Chlorophyllgehalt schüttelten wir mit

<sup>1)</sup> R. Willstätter, diese Annalen 350, 67 (1908).

200 ccm 95 prozentigem Methylalkohol aus. Im Petroläther hinterblieben 2,7 g Chlorophyll vom Reinheitsgrad 44. Die holzgeistige Lauge wurde mit Wasser und Petroläther versetzt und die Chlorophyllkonzentration in der petrolätherischen Schicht bestimmt. Sie gab 2,6 g Rückstand und enthielt 0,8 g, also 31 prozentiges Chlorophyll.

Ein folgender Versuch verglich die Wirkung von 90 und 95 prozentigem Methylalkohol und entschied zugunsten des 90 prozentigen, der im folgenden zum Auswaschen stets Anwendung findet.

Je 570 ccm einer Rohlösung mit 4,4 g 44 prozentigem Chlorophyll werden a) mit 140 ccm 95 prozentigem, b) mit 280 ccm 90 prozentigem Holzgeist ausgeschüttelt.

	Chlorophyll in g	Rückstand in g	Reinheits- grad
a) { Im 95proz. Holzgeist	0,6	—	—
{ Im Petroläther	3,8	8,0	47
b) { Im 90proz. Holzgeist	0,6	—	—
{ Im Petroläther	3,8	7,8	49

Brennesseln, die mit Benzol vorextrahiert waren, ergaben schon bei dieser einmaligen Behandlung einen Reinheitsgrad von etwa 50 Proz. Die Lösungen ließen sich aber durch ein zweites Waschen mit dem 90 prozentigen Holzgeist noch erheblich verbessern.

Z. B. gab eine gewaschene Petrolätherlösung, welche 4,8 g 52 prozentigen Chlorophylls in  $\frac{1}{2}$  Liter enthielt, beim zweiten Waschen mit dem halben Volumen von 90 prozentigem Holzgeist an diesen 10 Proz. ihres Chlorophylls mit dem Reinheitsgrade 19 ab. Dadurch stieg im Petroläther die Konzentration des Chlorophylls auf 60.

So gut war das Resultat allerdings nur bei chlorophyllreichem Material. Eine farbstoffärmere Frühjahrs-ernte von Brennesseln gab niedrigere Konzentrationen; durch eine dreimalige Behandlung mit Holzgeist ließ sich aber auch hier der Reinheitsgrad der petrolätherischen Lösung auf 55 bringen.



Wir gewinnen also unsere Rohlösung II durch (zumeist) zweimaliges Waschen der petrolätherischen Rohlösung I mit je  $\frac{1}{2}$  Volum 90 prozentigem Holzgeist. Das folgende Kapitel zeigt, daß eine weitere Steigerung des Reinheitsgrades mit derselben Operation nicht ausführbar ist.

Die Chlorophylllösungen aus Brennesseln zeigen gegenüber den Präparaten aus anderen Pflanzen den Nachteil, daß sie besonders leicht verderben; namentlich bei einigen Lieferungen von Brennesselkraut war die Zersetzlichkeit auffällig. Wir beobachten die Änderung am Auftreten von Phytochlorin f bei der Spaltung des Phäophytins und auch oft daran, daß nach einigem Stehen die Chlorophylllösung, wenngleich sie in der Farbe unverändert erscheint, beim Versetzen mit alkoholischem Kali nicht mehr den charakteristischen Farbumschlag in gelbbraun zeigt.

Aber mit anderen leicht zugänglichen Pflanzen gelang es uns noch nicht, unter gleichen Bedingungen so hohe Chlorophyllkonzentrationen zu erreichen wie mit Brennesseln.

Pflanzenmaterial	Extrakt			Rohlösung II (2 mal gewaschen)		
	Chlorophyll in g	Rückstand in g	Reinheitsgrad	Chlorophyll in g	Rückstand in g	Reinheitsgrad
Brennesseln, Sommer 1909 .	6,1	—	—	3,8	6,5	58
„ Frühjahr 1910 .	5,2	38	14	2,6	7,6	34
Gras . . . . .	4,8	35	14	2,8	9,5	29
Melissa . . . . .	5,0	—	—	3,8	8,1	47
Heracleum . . . . .	—	—	—	2,4	4,8	50

## 2. Überführen in Holzgeist, petrolätherische Rohlösung III (70 prozentig).

Die petrolätherischen Chlorophylllösungen vom Reinheitsgrade 55–60 ließen sich bei häufigen Versuchen nicht verbessern durch fortgesetztes Ausschütteln mit Holzgeist. Vielmehr kommt man bei dieser Behandlung zu einem

Punkt, wo höher prozentiges Chlorophyll als das zurückbleibende in den Methylalkohol, namentlich in 95 prozentigen, überzugehen beginnt.

Wir haben z. B. eine Rohlösung II mit 8 g 55 prozentigem Chlorophyll in 2 Liter angewandt und die Verteilung des Chlorophylls beim Durchschütteln mit dem gleichen Volumen petroläthergesättigten 95 prozentigen Holzgeistes untersucht.

	Chloro- phyll in g	Rück- stand in g	Rein- heits- grad
1. Versuch: Angew. Rohlösung II	etwa 8	—	55
Fraktion in 95 proz. Holzgeist	3,7	5,8	64
Petrolätherischer Rest	4,5	9,2	49
2. Versuch: Angew. Rohlösung II	8,5	15,3	55
Fraktion in 95 proz. Holzgeist	4,5	6,5	69
Petrolätherischer Rest	4,0	8,7	46

Von diesem Resultat machen wir Anwendung, indem wir durch Überführen in 95 prozentigen Methylalkohol und Wiederausziehen aus demselben mit Petroläther unter starkem Zusatz von Wasser unsere petrolätherische Rohlösung III gewinnen. Waschen der 95 prozentigen methylalkoholischen Lösung mit Petroläther vor der Extraktion war ohne Vorteil, hingegen ließ sich die Lösung III von neuem durch einmaliges Auswaschen mit  $\frac{1}{2}$  Volumen 90 prozentigen Holzgeistes verbessern.

Die petrolätherische Lösung von 69 prozentigem Chlorophyll (Beispiel der Tabelle) gab an  $\frac{1}{2}$  Volumen 90 prozentigen Holzgeist 13 Proz. ihres Chlorophylls ab, und zwar nur mit dem Reinheitsgrade 54. Dadurch stieg also in der Lösung der Reinheitsgrad auf über 70.

Die aus dem 95 prozentigen Methylalkohol extrahierte Lösung III, noch einmal mit ihrem halben Volumen 90 prozentigen Holzgeistes ausgeschüttelt, erhalten wir aus der Charge von 2 kg Brennesseln mit der Ausbeute von 4 g Chlorophyll und dem Reinheitsgrad 70; diese Lösung

enthält sehr wenig gelbe Begleiter und zeigt im Spektrum nicht das Auftreten des IV. Bandes.

### *3. Vorversuche der Abscheidung des Chlorophylls.*

Eine Verbesserung der petrolätherischen Lösung von 70 prozentigem Chlorophyll ist nicht gelungen. Um es aus der Lösung zu isolieren, haben wir das Chlorophyll

a) zunächst in methylalkoholische Lösung übergeführt und daraus nach verschiedenen Verfahren, die in diesem Abschnitt beschrieben werden, abgeschieden und umgeschieden;

b) direkt zur Abscheidung gebracht durch quantitatives Herauswaschen des im Petroläther enthaltenen Methylalkohols. Dies ist das endgültig gewählte, bessere Verfahren, welches in Kapitel II behandelt wird. Die Reinigung des Präparates fußt dann auf den Umscheidungsverfahren von a).

Um die petrolätherische Rohlösung in eine methylalkoholische umzuwandeln, dampfen wir den Petroläther möglichst rasch bei gelinder Wärme im gut ziehenden Vakuum ab; dabei haben sich gekühlte Vorlagen mit flüssigem Paraffin bewährt. Zuerst konzentrieren wir die Lösung III aus 2 kg Brennesseln auf 100—200 ccm, dann vermischen wir sie mit demselben Volumen Methylalkohol und engen wieder auf die Hälfte oder noch weiter ein, bis eine Probe beim Verdünnen mit Wasser keine öligen Tropfen mehr abscheidet. Beim Eindampfen leidet das Chlorophyll; oft ändert sich die Nuance der Lösung und ihr Spektrum (das IV. Band wird stärker), und zugleich verändert sich die Zusammensetzung der aus dem Phäophytin entstehenden Spaltungsprodukte. Nur Lösungen, die beim Verjagen des Petroläthers nicht erheblich gelitten haben, sind weiter verarbeitet worden.

Durch das Abdampfen über Holzgeist ist das Chlorophyll darin schwerer löslich geworden, so daß es bei einzelnen Versuchen schon beim Konzentrieren teilweise

ausfällt. Bei anderen Darstellungen findet die Abscheidung erst statt nach dem Abkühlen der konz. Holzgeistlösung auf  $-20^{\circ}$ . Häufig ist es indessen nötig, den Methylalkohol mit Wasser zu versetzen, bis er nur noch 90—95 prozentig ist. In allen Fällen scheidet sich mit dem Chlorophyll ein phäophytinartiges Zersetzungsprodukt ab, das sich in Äther braun löst. Es gelingt übrigens, diese Beimischung vom grünen Farbstoff zu trennen, da sie viel rascher ausfällt als das Chlorophyll.

Beim Überführen des Chlorophylls aus dem Methylalkohol unter Wasserzusatz in Petroläther oder nachher beim Waschen der Benzinschicht mit Wasser fällt der Farbstoff aus, teils in Häuten, zum Teil in feinsten Partikeln. Für eine derartige Abscheidung ist das Verdampfen der Rohlösung III über Holzgeist ein nutzloser Umweg.

Am besten isoliert man das Chlorophyll aus der methylalkoholischen Lösung:

1. durch Ausfällen mit Wasser unter Zusatz von Salzen. Wird der Holzgeist mit mindestens dem gleichen Volumen verdünnter Salzlösungen ( $\text{NaCl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  usw.) vermischt, so fällt das Chlorophyll in Flocken aus, die sich bisweilen zusammenballen und dann sehr leicht filtriert werden können, oder aber in feinst verteiletem Zustand, so daß für die Filtration Calciumcarbonat oder besser Klärerde zugesetzt werden muß. Der Niederschlag wird durch eine Schicht des Klärmittels abgesaugt, mit Wasser gut ausgewaschen und im Exsiccator getrocknet.

2. durch Überführen in Äther und Fällen mit Petroläther. Aus der ätherischen Lösung wird der Methylalkohol vollständig herausgewaschen, dann dampft man im Vakuum so weit als möglich ein. Wenn die konz. Lösung weder Benzin noch Alkohol enthält, so schlägt sich der Farbstoff auf Zusatz von Petroläther in festen, glänzenden, blauschwarzen Krusten nieder oder auch öfters in feiner Verteilung, schwierig filtrierbar.

Das ausgefällte Chlorophyll enthält fast immer eine olivbraune Beimischung. Um sie zu entfernen, nehmen wir mit möglichst wenig 95 oder 90prozentigem Holzgeist auf; in Lösung geht nur grüner Farbstoff, das Phäophytinartige bleibt zurück. Das Chlorophyll wird von neuem durch Überführen in Äther und Umscheiden mit Petroläther isoliert. Die Ausbeute an dem gereinigten Präparat beträgt 1—1,5 g aus 2 kg.

Die folgenden Angaben beziehen sich teils auf die mit Salzlösung abgeschiedenen und aus Äther mit Petroläther umgefällten oder auf die zur Beseitigung des Phäophytins wiederholt umgeschiedenen Präparate.

Die Darstellungen bilden exsiccator trocken dunkelgrüne oder grünlichschwarze Pulver, die unter dem Mikroskop einheitlich und oft krystallisiert erscheinen. Sie sind in Äther sehr leicht löslich mit grüner oder etwas gelbstichig grüner Farbe und roter Fluorescenz, auch in absolutem Alkohol leicht, ziemlich schwer in 90prozentigem Holzgeist, Petroläther färben sie kaum an; von gelben Pigmenten ist nur noch sehr wenig beigemischt.

In der Farbnuance lassen sich die Präparate mit dem Äthylchlorophyllid vergleichen und sie sind nach ihrem colorimetrischen Wert meistens zwischen 90- und 100prozentig. Ganz unversehrtes Chlorophyll liegt in den beschriebenen Präparaten nicht vor. Die Veränderung ist oft an der etwas matten Farbe der Lösung wahrzunehmen. Der spektroskopische Vergleich in Alkohol mit einem Chlorophyllextrakt zeigt stets Abweichungen, nämlich das III. Band sehr unscharf und nur ebenso stark oder sogar schwächer als das IV. Band.

Präparat aus Melissa: 0,094 g in 1 Liter Alkohol, 8 mm Schicht.

Band I: 693—629..612; Band II: 612—598; Band III: 598..573; Band IV: 543...532; Band V, VI, Endabsorption von 508.

Die Spaltung des Phäophytins ergibt Abweichungen vom normalen Gemisch des Phytochlorins e und Phyto-

rhodins g, z. B. schwächer basische Verbindungen und unlösliche Flocken.

Besonders kennzeichnend für die Schädigung des Chlorophylls ist häufig das Fehlen der braunen Phase beim Versetzen mit alkoholischem Kali; aus Melisse erhielten wir mehrere Präparate, welche den Farbumschlag bei der Verseifung noch geben, aber nie aus Brennesseln.

Mehrere Präparate sind auf einen Gehalt an Wachs oder Fett geprüft worden durch Verseifen des Chlorophylls mit methylalkoholischem Kali, Ausäthern des Phytols, Ansäuern und Extrahieren der Fettsäure mit Äther. Wenn man dabei vorsichtig mit Phosphorsäure ansäuert, so erhält man die Lösung der Fettsäure am leichtesten frei von Chlorophyllderivaten. Dann geht nämlich Chlorophyllin in den Äther, das beim Schütteln mit wenig konz. Salzsäure in der Hauptsache entfernt werden kann. Der Äther wird schließlich mit Tierkohle entfärbt. Vier Präparate lieferten einen sauren Ätherrückstand von 5—8 Proz. Der Gehalt an Fett oder Wachs trägt wohl Schuld an dem zu niedrigen Magnesium- und Phytolgehalt.

Für die Analyse sind die Chlorophyllpräparate dieser Vorversuche zuerst im Exsiccator, dann im Hochvakuum bei 105° zur Gewichtskonstanz getrocknet worden.

Die Aschen enthielten weder Calcium noch Alkali und sie waren frei von Phosphor.

1 mal umgeschiedene Präparate aus Brennesseln.

Präparat A.

- I. 0,3581 g gaben 0,0117 Asche, diese enthält nur eine Spur Calcium und liefert 0,0312  $Mg_2P_2O_7$  oder 0,0113 MgO.  
 II. 0,3406 g gaben 0,1015 Phytol, dieses verbraucht Jod entsprechend 6,46 ccm  $\frac{1}{10}$ - $Na_2S_2O_3$  (nach v. Hübl).

Präparat B.

- III. 0,2816 g gaben 0,0090 Asche, frei von Calcium.  
 IV. 0,2383 g „ 0,0701 Phytol.  
 V. 0,2389 g „ 0,0763 AgJ bei der Methoxylbestimmung nach Zeisel.

2 mal umgeschiedene Präparate aus Brennesseln.

Präparat C.

VI. 0,2712 g gaben 0,0106 MgO, frei von Calcium.

VII. 0,1873 g „ 0,0479 Phytol.

Präparat D.

VIII. 0,2292 g „ 0,0086 MgO und dann 0,0235 Mg<sub>3</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (entsprechend 0,0086 MgO).

IX. 0,2028 g gaben 0,0500 Phytol; diese verbrauchten Jod entsprechend 3,54 ccm <sup>2</sup>/<sub>10</sub>-Thiosulfat (nach v. Hübl).

X. 0,1981 g gaben 0,0698 AgJ bei der Methoxylbestimmung nach Zeisel.

2 mal umgeschiedene Präparate aus Melissa.

Präparat E.

XI. 0,1301 g gaben 0,0049 MgO und dann 0,0131 Mg<sub>3</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (entsprechend 0,0047 MgO).

XII. 0,1516 g gaben 0,0437 Phytol.

XIII. 0,1908 g „ 0,0647 AgJ bei der Methoxylbestimmung nach Zeisel.

Präparat F.

XIV. 0,1629 g gaben 0,0060 MgO, frei von Calcium.

XV. 0,1390 g „ 0,0400 Phytol.

Ber. für		die vorläufige Formel							
		A.		B.			C.		
C <sub>55</sub> H <sub>72</sub> O <sub>8</sub> N <sub>4</sub> Mg		I	II	III	IV	V	VI	VII	
Asche	4,40	2,16	—	1,93	—	—	2,36	—	
Phytol	32,6	—	29,8	—	29,4	—	—	25,6	
OCH <sub>3</sub>	3,41	—	—	—	—	4,22	—	—	
		D.			E.			F.	
		VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
Asche	4,40	2,32	—	—	2,27	—	—	2,22	—
Phytol	32,6	—	24,7	—	—	28,8	—	—	28,8
OCH <sub>3</sub>	3,41	—	—	4,65	—	—	4,48	—	—
Ber. für		C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O			II	VII	XI		
Jodzahl		85,7			80,8	94,2	90,0		

## II. Reines Chlorophyll.

### A. Darstellung.

Die Isolierung beruht 1) auf der Steigerung des Reinheitsgrades von Chlorophyll bis zu etwa 70 mit Hilfe der

Vorextraktion der Brennesseln und mittels der Reinigung der petrolätherischen Rohlösungen durch Holzgeist, und

2) auf der Abscheidung des Chlorophylls beim vollständigen Herauswaschen des Methylalkohols aus der petrolätherischen Lösung. Wenn das Chlorophyll einen gewissen Reinheitsgrad erlangt hat wie in der Rohlösung III, so verliert beim Waschen die Lösung ihre Fluorescenz, sie erscheint dann in der Aufsicht schwarz, in der Durchsicht trübe. Bei weiterem Waschen wird der Petroläther opalisierend, die Flüssigkeit enthält dann das Chlorophyll in feinstem Zustand ausgefällt. Man könnte glauben, eine verdorbene Chlorophylllösung vor sich zu haben, aber auf Zusatz von Alkohol oder Äther entsteht eine prächtige grüne Lösung.

2 kg gut grünes und chlorophyllreiches Brennesselmehl (Chlorophyllgehalt 7—8 g im kg) werden unter Saugen, aber ohne Anfeuchten gleichmäßig auf eine Nutsche ausgebreitet und mit 7 Liter Benzol extrahiert, was mit dem Maschinenvakuum in 2—3 Stunden ausgeführt ist; dann verdrängen wir in etwa 1 Stunde das vom Pulver noch zurückgehaltene Benzol durch Petroläther, wozu 2—2,5 Liter genügen. Nach scharfem Absaugen wird weiter auf der Nutsche im Laufe von etwa 2 Stunden das Chlorophyll mit 3 Liter 96 prozentigem Alkohol ausgezogen. Der Extrakt, der viel Petroläther enthält, beträgt gegen 3 Liter. Wir verarbeiten ihn sofort, indem wir ihn mit  $\frac{1}{2}$ — $\frac{2}{3}$  seines Volumens Petroläther (spez. Gew. 0,64—0,66) und dann mit  $\frac{1}{3}$  seines Volumens Wasser versetzen. Bei dieser Entmischung geht der größere Teil des Chlorophylls in die obere Schicht mit schön blaustichig grüner Farbe. Die wäßrig alkoholische Fraktion ist mißfarbig, hell gelbgrün und stark gelb tingierend; sie wird verworfen.

Die petrolätherische Rohlösung (I) reinigen wir durch dreimaliges Ausschütteln mit je dem halben Volumen 90 prozentigem, petroläthergesättigtem Methylalkohol. Der erste Auszug ist noch gelbstichig und tingiert gelb,



der dritte ist reiner in der Farbe. Bei dieser Reinigungsoperation ist der Verlust an Chlorophyll oft nicht unerheblich.

Aus der dreimal gewaschenen Lösung (II) wird der Farbstoff in Holzgeist übergeführt durch zweimaliges Ausziehen mit je dem gleichen Volumen (1—1,5 Liter) 95 prozentigem Methylalkohol, der auch zuvor mit Petroläther gesättigt ist. Im Petroläther bleibt mit blaugrüner leuchtender Farbe etwas weniger als die Hälfte des Chlorophylls der Lösung II zurück; diese Restlösung ist wertvoll für die Gewinnung von Chlorophyllderivaten, aber zur Isolierung des Chlorophylls selbst verwenden wir in dieser Untersuchung nur die reinere, methylalkoholische Fraktion.

95prozentiger Holzgeist löst pro Liter ungefähr 200 ccm Petroläther; zum methylalkoholischen Auszug wird nun noch so viel Petroläther zugefügt, daß seine Menge mindestens 1 Liter beträgt. Nach diesem Zusatz bringen wir das Chlorophyll mit verdünnter Kochsalzlösung quantitativ wieder in Petroläther und gewinnen so die Rohlösung III, welche nach einmaligem Waschen mit 500 ccm 90prozentigem Holzgeist einen Reinheitsgrad von etwa 70 und 2—3 g Chlorophyllgehalt aufweist. Die prächtig bläulich grüne Lösung wird mit sehr viel Wasser gewaschen, bis die grüne Farbe und die rote Fluorescenz verschwunden, und die Opalescenz und Trübung eingetreten ist.

Das grüne Pigment ist jetzt in feinsten Verteilung ausgefällt, der Petroläther nur noch sehr schwach gefärbt. Es gelingt aber nicht, den Niederschlag ohne weiteres zu filtrieren, er wird vom Filter nicht zurückgehalten. Aber durch Zusatz von geglühtem Natriumsulfat wird das Chlorophyll gut niedergeschlagen und filtrierbar gemacht. Mindestens bis zu diesem Punkt ist die Arbeit an einem Tage zu führen.

Zum Filtrierbarmachen ist eine sehr große Menge Natriumsulfat erforderlich; um mit weniger (100—200 g) auszukommen, kann man die letzten Anteile des Chloro-

phylls mit Calciumcarbonat niederschlagen. Man setzt dieses in kleinen Proben hinzu, bis die petrolätherische Mutterlauge nur noch etwas gelöstes Chlorophyll enthält und gut filtrierbar geworden ist. Dann wird der Petroläther auf einer Nutsche abgesaugt, worauf eine dünne Schicht Natriumsulfat ausgebreitet ist. Geht die Filtration rasch vonstatten, so wäscht man mit leichtflüchtigem Petroläther nach und saugt bis zum völligen Verdunsten desselben.

Für die Reinheit des Chlorophylls ist Umfällen aus Alkohol mit Salzlösung vorteilhaft; nach dieser Operation zeigt sich die Asche frei von Calcium, was bei dem Rohprodukte nicht immer der Fall ist. Wir lösen daher das Chlorophyll aus dem Natriumsulfat heraus durch Schütteln mit möglichst wenig 96prozentigem Alkohol, filtrieren und waschen nach. Das Volumen der alkoholischen Lösung beträgt 400—500 ccm; beim Vermischen mit mindestens dem gleichen Volumen verdünnter Kochsalzlösung fällt daraus alles Chlorophyll als fein verteilter Niederschlag aus, der sich nach kurzem Stehen zu großen, schwarzen, klebrigen und zäh-wachsartigen Flocken oder Klumpen zusammenballt. Um dieselben von der Mutterlauge zu trennen, bringt man in die Nutsche auf ein befeuchtetes Filter unter stetem Saugen gleichmäßig eine dünne Schicht Klärerde und filtriert durch dieselbe. Auf diese Weise geht das Filtrat wasserklar und rasch durch, auch läßt sich schnell mit Wasser nachwaschen. Wir setzen dies so lange fort, bis das Filtrat keine Chlorreaktion mehr gibt. Ein gründliches Waschen ist auch erforderlich, um sicher allen Alkohol zu entfernen; schon eine kleine Menge Alkohol würde die nachfolgende Umscheidung durch Petroläther vereiteln. Nach möglichst scharfem Absaugen gibt man zu dem auf der Nutsche Gebliebenen trocknes Natriumsulfat, füllt das Gemisch in eine Stöpselflasche und zieht das Chlorophyll unter kurzem Schütteln an der Maschine mit 200—300 ccm neutralem und rückstandsfreiem Äther aus.

Die getrocknete und filtrierte ätherische Chlorophylllösung, die sich durch sehr schöne, leuchtend blautichig-grüne Farbe auszeichnet, wird im Vakuum im Bad von 20—30° rasch unter Kondensation der Dämpfe so weit als möglich eingengt. Den dickflüssigen Rückstand versetzen wir sofort und in einem Gusse mit 300—400 ccm Petroläther vom Siedep. 30—50°.

Das Chlorophyll setzt sich zum Teil in Klumpen auf den Boden, zum Teil schwimmt es in feinen Flocken, die oft schwer filtrierbar sind, in dem nahezu ungefärbten Petroläther.

Die isolierte Substanz wird nochmals in Äther gelöst und nach dem erneuten Konzentrieren im Vakuum wieder mit Petroläther ausgefällt. Bei gut gelungenen Versuchen ist diese zweite Fällung derart, daß sie sich als locker zusammengefügte Kruste an den Boden setzt und nach dem Abgießen der Mutterlauge sehr leicht als körnig-krySTALLINISCHES Pulver isolieren läßt.

Die Ausbeute beträgt  $\frac{3}{4}$  g bis höchstens 1 g, aber zwei Chargen lassen sich von Anfang an nebeneinander bewältigen und bei den letzten Operationen vereinigen.

Nicht alle Darstellungen liefern tadellose Präparate. Es ist unerlässlich, jede einzelne zu prüfen. Ein Präparat kann nur dann als unversehrtes und reines Chlorophyll angesehen werden, wenn es allen folgenden Bedingungen genügt:

1. Der Aschengehalt muß der Theorie entsprechen und die Asche aus reinem Magnesiumoxyd bestehen.
2. Der Phytolgehalt muß gegen ein Drittel betragen und das Phytol frei von festen Beimischungen sein.
3. Bei der Verseifung mit Alkalien muß die braune Phase auftreten.
4. Die Phäophytinspaltung muß das normale Gemisch von Phytochlorin e und Phytorhodin g liefern.
5. Das Chlorophyll darf keine gelben Pigmente enthalten.
6. Das Spektrum muß übereinstimmen mit demjenigen des Chlorophylls im Blattauszug.

*B. Beschreibung.*

Das Chlorophyll, wie wir es bei den besten Versuchen erhalten haben, bildet ein blautichig-schwarzes glänzendes Pulver mit starkem, fast metallischem Reflex. Es läßt sich im trocknen Zustand sehr leicht und fein zerkleinern zu matt grünstichig- oder blautichig-schwarzem Pulver. Unter dem Mikroskop erweist sich das Chlorophyll als krystallinisch, mitunter sogar deutlich als Krystallaggregat, so daß man am Rande von Drusen scharfe Begrenzungen sieht. Einzeln ausgebildet kamen aber die Krystalle nicht vor.

Die Substanz besitzt keinen scharfen Schmelzpunkt, die Temperatur des Schmelzens ist von der Art des Erhitzens abhängig. Bei langsamem Erhitzen auf 100°, z. B. beim Trocknen, sintert die Substanz, sie gibt dann beim Erkalten eine spröde, schwarze Masse mit nicht merklich veränderten Eigenschaften. Beim Erwärmen im Schmelzpunktsröhrchen zerfließt das Chlorophyll zu zähen Tropfen, bald etwas unter 100°, bald etwas darüber; bei mehreren Bestimmungen fanden wir die Schmelzpunkte 93 bis 96° und 103—106°.

Das Chlorophyll ist in absolutem Alkohol leicht löslich mit blautichig-grüner Farbe, etwas schwerer in 95 prozentigem Alkohol sowie in Methylalkohol, schwer in 90 prozentigem Holzgeist. In Äther löst es sich im Gegensatz zum krystallisierten Chlorophyll nach Borodin (Äthylchlorophyllid) spielend leicht und gibt eine prächtige blaugrüne Lösung, die stark fluoresciert; sie ist blautichiger als die alkoholische. Überraschend ist das Verhalten gegen Petroläther; das Chlorophyll ist darin in der Kälte außerordentlich schwer löslich, warm ist es ein wenig löslich. Hingegen ist es auf Zusatz von ein wenig Äthyl- oder Methylalkohol darin leicht löslich. Hexan aus Petroleum (Kahlbaum) löst das Chlorophyll ziemlich leicht, Petroläther fällt es aus dieser Lösung aus; in Hexan aus Propyljodid zeigt es sich dagegen ebenso unlöslich wie im Petroläther.

Benzol löst sehr leicht, Cyclohexan leicht, auch Chloroform und Schwefelkohlenstoff, letzterer mit grüner Farbe, weniger blau als die anderen Solvenzien. In Pyridin ist die Substanz spielend löslich.

*Entmischung nach Kraus.* Die alkoholische Lösung des reinen Chlorophylls zeigt die Kraussche Reaktion in normaler Weise trotz der Unlöslichkeit der Substanz im Petroläther; das normale Verhalten bei dem Versuche ist eine Folge der Löslichkeit in alkoholhaltigem Petroläther. Beim Entmischen mit wenig Wasser erfolgt eine ungefähr gleichmäßige Verteilung des Farbstoffs zwischen den beiden Schichten. Auf Zusatz von viel Wasser oder bei nochmaligem Ausschütteln mit reinem Petroläther ist die wäßrig-alkoholische Schicht nur noch ganz schwach gelblichgrün gefärbt.

Für 0,1 prozentige äthyl- und methylalkoholische Lösungen haben wir durch colorimetrische Bestimmung die Entmischungsverhältnisse ermittelt.

a) 25 ccm alkoholische Lösung werden mit 25 ccm Petroläther versetzt und mit 5 ccm Wasser entmischt; die beiden Schichten erscheinen annähernd gleich. Nach der colorimetrischen Bestimmung enthält der Petroläther 44 Proz. vom Farbstoff.

b) Bei dem gleichen Versuch unter Anwendung von Methylalkohol enthält die petrolätherische Lösung 56 Proz. des Chlorophylls. Die holzgeistige Schicht wird nochmals mit 25 ccm Petroläther versetzt; derselbe entzieht der unteren Schicht den Farbstoff fast quantitativ.

Aus dem Petroläther scheiden sich beim Stehen über der verdünnt alkoholischen Schicht keine Krystalle aus, im Gegensatz zum Versuch mit Äthylchlorophyllid.

*Reaktion.* Wie Äthylchlorophyllid, so ist auch Chlorophyll, das Phytylechlorophyllid, indifferent, es zeigt weder saure noch basische Eigenschaften und ist empfindlich gegen Säuren und Alkalien.

Durch methylalkoholisches Kali wird Chlorophyll zum Chlorophyllinkalium verseift. Diese Umwandlung ist keine

einfache Reaktion; denn zuerst schlägt die grüne Farbe um in gelbbraun bis rotbraun, wie dies beim rohen Extrakt<sup>1)</sup> und beim krystallisierten Chlorophyll<sup>2)</sup> beobachtet worden ist, und erst in mehreren Minuten stellt sich die ursprüngliche blaugrüne Farbe wieder her.

Wird die Verseifung in ätherischer Lösung vorgenommen und beim Auftreten der braunen Phase sofort viel Wasser zugefügt, so geht die Hauptmenge wieder als grüner Farbstoff in den Äther und kann daraus durch Waschen mit Wasser nicht entfernt werden. Setzt man hingegen erst nach der Rückbildung der grünen Farbe Wasser hinzu, so färbt sich der Äther gar nicht grün an; er ist völlig farblos. Hierin zeigt es sich, daß das Chlorophyll vollkommen frei von gelben Begleitern vorliegt.

Gegen Säuren verhält sich das Chlorophyll gleich den Extrakten und dem Äthylchlorophyllid, es erleidet den Farbumschlag in olivbraun, indem es das Magnesium verliert. Auf Zusatz von Oxalsäure zur alkoholischen Lösung wird die Farbe kurze Zeit olivgrün, und es fällt eine Verbindung in olivgrünen Flocken aus, die sich erst beim Stehen in Phäophytin umwandeln.

Mit Pikrinsäure entsteht kein Pikrat, sondern das Chlorophyll wird zersetzt und gibt eine braune Lösung.

Beim Erhitzen des Chlorophylls mit reiner konzentrierter Salpetersäure färbt sich diese rotbraun und sie enthält die Öltropfen des früher erwähnten Phytol-derivates.<sup>3)</sup>

*Phäophytin.* Das magnesiumfreie Derivat haben wir in dieser Arbeit nur soweit untersucht, als es für die Beurteilung der Chlorophyllpräparate von Interesse war. Phäophytin aus dem isolierten Chlorophyll war ziemlich spröde und ließ sich gut pulverisieren. Es enthielt

---

<sup>1)</sup> R. Willstätter und A. Pfannenstiel, diese Annalen 358, 217 (1907).

<sup>2)</sup> R. Willstätter und M. Benz, diese Annalen 358, 282 (1907).

<sup>3)</sup> Diese Annalen 378, 84 (1910).

keine Spur gelber Farbstoffe, so daß nach dem Verseifen die ätherische Lösung des Phytols nicht entfärbt zu werden brauchte. Das Phytol war stets frei von festen Ausscheidungen, während es bei der Verseifung von Phäophytin aus Rohextrakten bisweilen kleine Mengen fester Beimischungen aufwies.

Von den folgenden Phytolbestimmungen sind I und II mit Phäophytinpräparaten aus den im Kapitel I B 3 beschriebenen Vorversuchen der Darstellung, III und IV mit Phäophytin aus zwei reinen Chlorophyllpräparaten ausgeführt.

I.	0,1042 g	Phäophytin	gaben	0,0353	Phytol.
II.	0,0900 g	"	"	0,0285	"
III.	0,2035 g	"	"	0,0646	"
IV.	0,1148 g	"	"	0,0381	"
		Ber. für			Gef.
		$C_{65}H_{74}O_6N_4$		I	II III IV
Phytol		33,4		33,9	31,7 31,7 33,2

Die basischen Spaltungsprodukte des Phäophytins waren nicht immer tadellos; aber zwei gut gelungene Präparate des reinen Chlorophylls haben das reine Gemisch von Phytochlorin e und Phytorhodin g geliefert.

Das Verhältnis der beiden war zufolge der quantitativen Bestimmung nach der in der voranstehenden Abhandlung beschriebenen Methode ähnlich dem für das Gesamtchlorophyll mehrerer Pflanzen von Willstätter und Isler gefundenen, nämlich:

Auf 1 Mol. Phytorhodin g kamen 3,2 Mol. Phytochlorin e.

#### *Absorptionsspektrum.*

Das Spektrum haben wir mit einem Apparat von geringer Dispersion, dem Gitterspektroskop nach Löwe von Carl Zeiss untersucht; die photographische Aufnahme mit einem Gitterspektrographen werden wir in einer folgenden Arbeit reproduzieren.

Für die Bestimmung haben wir mit einer Lösung gearbeitet, die in der Konzentration 0,094 g Chlorophyll in 1 Liter Alkohol genau der in der XIV. Abhandlung

untersuchten Rohchlorophylllösung aus frischen Brennnesselblättern entspricht. Im Vergleich mit dieser und mit dem Äthylchlorophyllid<sup>1)</sup> zeigt das Spektrum des reinen Chlorophylls aus Brennnesseln nur sehr geringe Unterschiede, welche durch die kleine Verschiebung im Verhältnis der zwei Chlorophyllkomponenten erklärt werden.

Schicht in mm	1	2	4	16	64
Band I	671—658	670—656	675—650	682—636 .. 620	} 689—559
Band II	—	—	619 .. 605	620 ... 605 .. 588	
Band III	—	—	585 .. 575	588 .. 566	
Band IV	—	—	—	—	
Band V	471 .. 457	477 .. 457 .. 438	479 — — 457 .. 443	543 .. 532	540 ... 523
Band VI	} End- absorption	} 440—	} 443—	} 492—	} 502—
End- absorption					

Die Absorptionsbänder im sichtbaren Spektrum zeigen die Reihenfolge der Intensität I, VI, V, II, III, IV.

### C. Analyse.

Das reine Chlorophyll erwies sich als 96—98 prozentig bei der colorimetrischen Bestimmung, die allerdings für so hochprozentige Präparate nicht genügend scharf ist.

Durch Verseifen und Ausäthern nach dem Ansäuern ließ sich eine geringe Beimischung von Fettsäure nachweisen.

Für die Analysen sind die Präparate nach dem Aufbewahren im Exsiccator im Vakuum der v. Redenschen Pumpe bei 100° getrocknet worden; sie wurden mit Verlusten von 2—4 Proz. in 2 Stunden gewichtskonstant.

Die Substanz gab stets eine weiße Asche, die sich ohne Kohlensäureentwicklung in Salzsäure löste; sie war also frei von Alkalien, ferner enthielt sie keine Spur von Calcium und von Phosphor.

<sup>1)</sup> R. Willstätter und M. Benz, diese Annalen 358, 285 (1907).



Das Fehlen des Phosphors haben wir bestätigt, indem wir 0,6 g Chlorophyll nach A. Neumann<sup>1)</sup> mit Salpeterschwefelsäure zerstörten und die klare Lösung genau nach der Vorschrift mit Ammonmolybdat versetzten. Die Flüssigkeit bleibt bei 24stündigem Stehen völlig klar.

Nach derselben Methode haben wir im Rückstand einer petrolätherischen Rohlösung II (Reinheitsgrad 60) 0,12 Proz. Phosphor gefunden. 0,975 g gaben 0,0032 g  $Mg_2P_2O_7$ . Eine andere Darstellung der Rohlösung wies im Trockenrückstand 0,05 Proz. Phosphor auf. 0,5293 g gaben 0,0010 g  $Mg_2P_2O_7$ .

Unser alter Befund<sup>2)</sup>, daß Chlorophyll frei von Phosphor ist, hat hiermit eine Bestätigung erfahren, die wir nur erwähnen, weil unsere Angabe von J. Stoklasa<sup>3)</sup> und seinen Schülern aufs heftigste angegriffen worden ist. Nach Stoklasa soll Chlorophyll Phosphor und Kalium enthalten.

#### Präparat A.

- I. 0,1733 g gaben 0,0079 MgO und daraus 0,0207  $Mg_2P_2O_7$ .  
 II. 0,1400 g „ 0,0427 Phytol.

#### Präparat B.

- III. 0,2027 g gaben 0,0094 MgO.  
 IV. 0,2256 g „ 0,0669 Phytol.  
 V. 0,3583 g „ 14,66 ccm  $\frac{1}{10}$ - $NH_3$  (nach Kjeldahl).  
 VI. 0,1986 g „ 0,5199  $CO_2$  u. 0,1364  $H_2O$  u. 0,0094 Asche.  
 VII. 0,1066 g „ 0,0257 AgJ bei der Methoxylbestimmung nach Zeisel.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**, 115 (1902) und **43**, 32 (1904).

<sup>2)</sup> R. Willstätter, diese Annalen **350**, 48 (1906).

<sup>3)</sup> J. Stoklasa, V. Brdlik und J. Just, Ist der Phosphor an dem Aufbau des Chlorophylls beteiligt? Ber. d. d. bot. Ges. **26**, 69 (1907). — J. Stoklasa, V. Brdlik und A. Ernest, Zur Frage des Phosphorgehaltes des Chlorophylls. Ber. d. d. bot. Ges. **27**, 10 (1909). — V. Brdlik, Zur Phosphorfrage im Chlorophyll, Sitzungsber. d. Akad. d. Wiss. in Wien **117**, Abt. I, Mai 1908. — J. Stoklasa, Beiträge zur Kenntnis der physiologischen Funktion des Kalis im Pflanzenorganismus. Die Ernährung der Pflanze, Mitteil. d. Kalisyndikates IV, 73 und 85 (1908). — M. Tswett, Ist der Phosphor an dem Aufbau der Chlorophylline beteiligt? Ber. d. d. bot. Ges. **26**, 214 (1908).

## Präparat C.

VIII. 0,2320 g gaben 0,0680 Phytol.

IX. 0,2823 g „ 12,48 ccm  $\frac{n}{10}$ -NH<sub>3</sub> (nach Kjeldahl).X. 0,2075 g „ 0,5488 CO<sub>2</sub> u. 0,1445 H<sub>2</sub>O u. 0,0103 Asche.

	Ber. für C <sub>55</sub> H <sub>72</sub> O <sub>6</sub> N <sub>4</sub> Mg	Gefunden									
		A		B					C		
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
C	72,59	—	—	—	—	—	71,40	—	—	—	72,13
H	7,98	—	—	—	—	—	7,69	—	—	—	7,79
N	6,16	—	—	—	—	5,73	—	—	—	6,19	—
Mg	2,68	2,81	—	2,80	—	—	2,92	—	—	—	2,99
OCH <sub>3</sub>	3,41	—	—	—	—	—	—	3,18	—	—	—
Phytol	32,60	—	30,5	—	29,7	—	—	—	29,3	—	—

Das bei der quantitativen Bestimmung isolierte Phytol hat sich gemäß der Jodzahl als rein erwiesen.

0,0427 g Phytol erforderten Jod entsprechend 2,93 ccm  $\frac{n}{10}$ -Thio-sulfat (nach von Hübl); Jodzahl gef. 87,1, ber. 85,7.

D. *Alkoholyse des Chlorophylls mit Hilfe der Chlorophyllase.*

Das reine Chlorophyll spaltet bei der Einwirkung von Alkohol in Gegenwart extrahierter Blattsubstanz Phytol ab und verwandelt sich in das krystallisierte Chlorophyll nach Borodin (Äthylchlorophyllid).

Die Lösung von 1 g Chlorophyll in 200 ccm absolutem Alkohol verdünnten wir mit Wasser auf 90 Proz. und schüttelten sie mit 15 g Chlorophyllase 66 Stunden lang bei Zimmertemperatur an der Maschine. Das Enzym hatten wir aus 100 g getrockneten Galeopsisblättern gewonnen; das Mehl war mit Alkohol erschöpfend ausgezogen, dann noch 24 Stunden mit  $\frac{1}{2}$  Liter Alkohol stehen gelassen und schließlich durch Schlämmen das feinste Pulver isoliert worden.

Nach der Einwirkung entmischten wir die abfiltrierte alkoholische Chlorophylllösung mit dem gleichen Volumen gut fraktionierten, sehr leicht flüchtigen Petroläthers und mit 40 ccm Wasser. Die Veränderung des Chlorophylls zeigte sich daran, daß die zunächst beträchtlich gefärbte petrolätherische Lösung rasch blaue Häute des

Chlorophyllids abschied; die petrolätherische Schicht wurde daher durch Ausschütteln mit 90 prozentigem Holzgeist von der Hauptmenge des in ihr enthaltenen Farbstoffes befreit.

Der Petroläther mußte das abgespaltene Phytol enthalten, allerdings nicht quantitativ, da ein Teil in die alkoholischen Schichten übergegangen war. Wir entfärbten die petrolätherische Lösung durch abwechselnde Behandlung mit Tierkohle und Calciumcarbonat und dampften sie nur bei Zimmertemperatur im Vakuum ein. Das hinterbliebene farblose Öl wurde bei gewöhnlicher Temperatur im Vakuum einer guten Quecksilberpumpe zur Konstanz getrocknet. Wir erhielten 0,08 g Phytol, das wir durch die Jodzahl identifiziert haben.

0,0800 g erforderten entspr. 5,10 ccm  $\frac{1}{10}$ -Thiosulfat 0,0646 g Jod (nach v. Hübl) d. i. 0,94 Mol. — Jodzahl gef. 80,6, ber. 85,7.

Die alkoholischen Lösungen haben wir nach zwei Richtungen verarbeitet. Zwei Drittel der Lösungen dienten zur Darstellung von krystallisiertem Chlorophyll. Der Farbstoff wurde in Äther übergeführt; aus der Lösung krystallisierte in den typischen dreiseitigen Täfelchen von prächtigem Glanz das Äthylchlorophyllid, welches in seinen Eigenschaften mit dem beschriebenen Präparat aus Galeopsis übereinstimmte und bei der Spaltung die normalen Derivate Phytochlorin e und Phytorhodin g lieferte.

Das Chlorophyll aus dem übrigen Drittel wurde zur Bestimmung der Umwandlungszahl in Phäophytin verwandelt; 0,0706 g desselben gaben 0,0096 g d. i. 13,6 Proz. Phytol. Hieraus ergibt sich, daß etwa 70 Proz. des Chlorophylls alkoholysiert worden sind.