

# Zeitschrift für angewandte Chemie

Seite 641—664

Aufsatzteil

31. Oktober 1913

## Über Chlorophyll.<sup>1)</sup>

VON R. WILLSTÄTTER.

(Eingeg. 27./9. 1913.)

In den grünen Pflanzen geschieht durch die Wirkung des Chlorophylls die unermessliche Produktion organischer Materie. Die Tiere sind die Parasiten der assimilierenden Pflanzen, und das Leben des Menschen zehrt gleichfalls von der pflanzlichen Synthese. Für den gesamten Prozeß der Assimilation sind besondere Organe des Plasmakörpers, worin das Pigment lokalisiert ist, als Laboratorium eingerichtet, die Chlorophyllkörper. In ihnen erfolgt im Lichte die Reduktion der Kohlensäure zu Kohlenhydraten, die nach Sachs in Form der Stärke sichtbar abgeschieden werden, um im Dunkeln wieder in Lösung zu gehen und auszuwandern. Diese Zuckersynthese ist ein energieverbrauchender Prozeß; die Assimilation der Kohlensäure erfordert die Assimilation des Sonnenlichtes. Den Übergang der Energie von der Sonne zur Erde nutzen die Pflanzen mit der ganzen Fläche ihrer grünen Blätter aus. Auf der chemischen Arbeit, die in den Assimilaten gespeichert worden, beruht jede Arbeit der lebenden Wesen und der mit Kohle gespeisten Maschinen, überhaupt das Leben auf der Erde.

Ohne genauere Kenntnis des Chlorophylls war es möglich, seine energetische Funktion zu untersuchen. Das Chlorophyll dient als Farbstoff zur Absorption des Sonnenlichtes und als Fluorescent zur Übertragung der aufgenommenen Energie. Lommel hat in den siebziger Jahren die Forderung aufgestellt, daß die Arbeit jedes Lichtstrahles im lebenden Blatt seinem Wärmeinhalt und dem Grade seiner Absorption durch das Chlorophyll, also der vom Blatt absorbierten Energiemenge proportional sei. Dieser Satz ist von Pflanzenphysiologen geprüft und wahrscheinlich gemacht worden. Timiriazeff und Engelmann haben die älteren Versuche von Daubeny, Draper und Sachs über den Zusammenhang von Lichtfarbe und Assimilationsintensität fortgesetzt und festgestellt, daß das Maximum der Assimilationsarbeit im Spektrum mit der Region des kräftigen Absorptionsbandes von Chlorophyll im Rot zusammenfällt. Ein weniger bedeutendes zweites Assimilationsmaximum hat Timiriazeff in der Gegend der Fraunhofer'schen Linie F aufgefunden, und Engelmann hat mit seiner berühmten Bakterienmethode die Beobachtung bestätigt.

Entsprechend dem wohlbekannten Spektrum des Chlorophylls ist die Absorption des Lichtes durch die Chloroplasten eine selektive. Die Pflanzen sind nicht für die maximale Assimilation des Sonnenlichtes organisiert, sondern ihre grüne Farbe bedeutet nach einer neuen Erklärung von Stahl einen Ausgleich zwischen dem Erfordernis, mit genügender Intensität das Licht photochemisch auszunützen, und der Gefahr, durch zu intensive Absorption den Chlorophyllapparat und das gesamte Plasma zu gefährden. So erklärt sich nach Stahl das grüne Pflanzenkleid der Erde als eine Anpassung an die am reichlichsten zur Verfügung stehenden Strahlengattungen, also an die Zusammensetzung des diffusen Tageslichtes.

Von der Übertragung der absorbierten Lichtenergie für die Photosynthese in den Chloroplasten sucht Timiriazeff eine Vorstellung zu geben mit der Annahme, das Chlorophyll sei ein optischer Sensibilisator, der die Wirkung des absorbierten Lichtes auf die Umformung der Kohlensäure übertrage, etwa so wie eine schnelle Einwirkung roter Lichtstrahlen auf Silberhalogenide, die sonst nur gegen

blaue und violette Strahlen empfindlich sind, durch Zusatz von Chlorophyll erreicht werde.

Tiefer geht auf die optische Beteiligung des Chlorophylls an der Photosynthese eine Hypothese ein, die der russische Botaniker Tswett vor zwei Jahren veröffentlicht hat. Sie knüpft an die Anschauung an, nach der Fluorescenten bei der Einwirkung von Licht unter Energieaufnahme umkehrbare molekulare Veränderungen erfahren, so daß sie bei der Rückbildung ihrer ursprünglichen Konstitution die aufgenommene Energie als Lumineszenzlicht ausstrahlen. Demgemäß nimmt Tswett an, daß eine umkehrbare molekulare Veränderung im Chlorophyll Lumineszenz oder vielmehr Phosphoreszenzstrahlung hervorrufe, die von der Kohlensäure oder ihren Ionen absorbiert werde und ihren Zerfall bewirke.

Die physikalische Betrachtung läßt die chemische Natur des Chlorophylls unberücksichtigt. Indessen lehrt uns schon das Beispiel des Hämoglobins, daß es nicht genügt, die physiologische Rolle eines natürlichen Farbstoffes durch sein Absorptionsvermögen zu erklären. Es bedarf daher der Untersuchung, ob die chemische Natur des Chlorophylls in seine Funktion für das Leben der Pflanze Einblick gewährt. Mit diesem Gedanken habe ich vor acht Jahren Versuche begonnen, Chlorophyll in Substanz kennen zu lernen und zu analysieren und es für die Aufgaben des Pflanzenphysiologen verfügbar zu machen.

Zu der physiologischen Bedeutung gesellt sich das chemische Interesse an einer Substanz, die Darwin „perhaps the most interesting of organic substances“ genannt hat. Merkwürdigerweise ist sie unbekannt geblieben hinsichtlich ihrer chemischen Natur. Vom Chlorophyll stellt uns die Natur Mengen zur Verfügung, denen gegenüber die Produktion von Indigo einen verschwindend kleinen Betrag darstellt. Dennoch ist es nicht eine unmittelbare praktische Verwendung des Pigmentes, an die wir denken. Aber mittelbar beeinflußt die Aufklärung der natürlichen Produkte wesentlich die Entwicklung der chemischen Technik. Die menschliche Phantasie war zu arm, um Atomgruppierungen zu erfinden, wie sie in den Naturgebilden entdeckt worden sind. Die Analyse des Alizarins, des Indigofarbstoffes, der natürlichen gelben Beizenfarbstoffe, der ätherischen Öle, der Alkaloide hat die Entfaltung der synthetischen Chemie geleitet.

Die älteren Arbeiten über Chlorophyll verdienen geschichtliches Interesse.

Berzelius hat es in den dreißiger Jahren des vorigen Jahrhunderts zuerst unternommen, das Pigment aus den Blättern zu isolieren. In der Meinung, das Blattgrün vertrage den Einfluß von Säure und Lauge, ohne zersetzt zu werden, hat er für die Isolierung starke Säuren und Alkalien angewandt. Er konnte so nur zu Produkten tiefergreifender Zersetzung gelangen. Berzelius urteilte, daß das Chlorophyll weder ein Harz, noch Wachs oder Fett sei, sondern zu den Farbstoffen gehöre, und er verglich seine Farbkraft mit der von Indigo.

Diese Untersuchung hat auf die Ansichten und die Arbeitsweise der späteren Forscher viel Einfluß gehabt. Mit Säure oder mit Alkali ist in der Folge, namentlich um die Mitte des vorigen Jahrhunderts, die Isolierung des Farbstoffes oft angestrebt worden, von Mulder, von Morot, von Verdeil und von Frémy. Von Verdeil rührt die Hypothese von der Verwandtschaft des Blut- und des Blattfarbstoffes her; nach ihm sollen beide sehr ähnlich sein, und Chlorophyll eine bedeutende Menge Eisen enthalten wie der Blutfarbstoff. Der Eisengehalt ist dann lange Zeit, auch noch in den Arbeiten von Schunck, angenommen worden.

Frémys Untersuchungen haben das Verhältnis der grünen zu den gelben Pigmenten der Blätter berührt. Bei der Einwirkung von Salzsäure und Äther verteilte sich der Farbstoff

<sup>1)</sup> Vortrag, gehalten auf der Hauptversammlung zu Breslau am 16./9. 1913. Vgl. auch *Angew. Chem.* 26, I, 507 (1913).

zwischen einer gelben ätherischen Schicht, nach Fr é m y Phylloxanthin enthaltend, und einer blauen sauren Lösung, von Phyllocyanin nach Fr é m y. In den beiden Schichten nahm Fr é m y Komponenten des Blattfarbstoffes an. Sie sollten das Chlorophyll bilden, verbunden zu einer Art von farbigem Fett, worin Phylloxanthin das Glycerin verträte, Phyllocyanin die Fettsäure.

Erst nach einer langen Unterbrechung folgen die Untersuchungen von Hoppe-Seyler, die Verdeils Parallele zwischen Blut- und Blattfarbstoff vertieft und Fr é m y's Vergleich mit den Fetten zur Lecithinhypothese des Chlorophylls weiter entwickelt haben. Diese Arbeiten bilden mit den fast gleichzeitigen von Gautier und von Tschirch und mit den nachfolgenden von Schunck und Marchlewski und von Hartley eine neue Periode in der Untersuchung des Blattgrüns. Die Methoden der Behandlung des Farbstoffes werden schonender. Die Frage, ob Säure und Alkali zersetzend auf ihn wirke, wird geprüft, allerdings noch nicht richtig beantwortet. Die chemische Untersuchung tritt mehr und mehr in Abhängigkeit von der Spektralanalyse, aber der Nutzen dieser Methode wird weit überschätzt. Sie hat nicht vor schweren Irrtümern geschützt. Wir wissen heute, daß manche bedeutende Veränderungen des Chlorophylls und seiner Derivate ohne Einfluß auf das Absorptionsspektrum sind, daß andererseits manche konstitutionell geringfügige Änderungen unverhältnismäßig große Abweichungen im Spektrum hervorrufen.

Ein einziges Resultat aus den Arbeiten jener Zeit ist bleibend: die Erkenntnis einer gewissen Verwandtschaft zwischen Hämin und Chlorophyll, die freilich weniger nahe ist, als man immer angenommen hat.

Hoppe-Seyler hat im Jahre 1879 Chlorophyll zu isolieren versucht und dabei energische Mittel, überhaupt chemische Reagenzien vermieden; unabhängig von ihm hat Gautier das Nämliche angestrebt. Das ist, wie wir heute wissen, der richtige Weg, aber die Ausführung war nicht erfolgreich, die Behandlung zu wenig schonend, so daß ein durch Hitze und Pflanzensäure zersetztes Produkt, das Chlorophyllan, erhalten wurde. Sein Phosphorgehalt hat Hoppe-Seyler zu der Vermutung geführt, Chlorophyll zähle zu den Lecithinen. Die von ihm vorsichtig geäußerte Hypothese wird noch heute heftig verfochten von Stoklasa, der Phosphor in großer Menge und Kalium im Chlorophyll findet.

Die Analyse des Chlorophyllans war ohne Nutzen, aber von dauernder Bedeutung ist eine Reaktion, die Hoppe-Seyler mit der Substanz vornahm. Beim Erhitzen mit Alkali auf hohe Temperatur beobachtete er ihre Umwandlung in einen purpurroten Farbstoff, den er Dichromatinsäure und dessen Verbindung mit Salzsäure er Phylloporphrin nannte. Diese Nomenklatur brachte zum Ausdruck, daß das Chlorophyllderivat in seinen optischen Merkmalen auffallend an ein Derivat des Blutfarbstoffes erinnerte, an Hämatorphrin. Mit Unrecht wird diese Entdeckung meistens den späteren Autoren zugeschrieben.

Nach Hoppe-Seyler hatten die chemischen Arbeiten nicht mehr die Isolierung des Chlorophylls in Substanz und seine Analyse zum Ziele. Die zahlreichen Untersuchungen von Schunck allein und von Marchlewski betrafen die bei der Einwirkung von Säuren und Alkalien auf Blätterauszüge entstehenden Spaltungsprodukte Phylloxanthin, Phyllocyanin und Phyllotaonin. Der genetische Zusammenhang dieser Verbindungen mit dem Chlorophyll ist nicht ermittelt, über ihre Zusammensetzung sind fast keine Angaben veröffentlicht worden. In allen jenen Untersuchungen ist für das Chlorophyll kein chemisches Merkmal festgestellt worden, mit welchem es möglich gewesen wäre, das Pigment verschiedener Pflanzen zu vergleichen. Die Ansichten über Identität oder Verschiedenheit des Farbstoffes in verschiedenen Pflanzen konnten daher außerordentlich differieren. Gautier findet das Chlorophyll verschieden in Mono- und in Dikotyledonen, aber er teilt die Unterschiede nicht mit. Und Etard hat noch im Jahre 1906 in Paris ein viel beachtetes Buch: „La biochimie et les chlorophylles“ veröffentlicht, worin eine endlose Zahl von Chlorophyllen beschrieben und sozusagen

analysiert wird; nicht allein solche verschiedener Herkunft, auch für eine einzige Pflanze (*Lolium perenne*) stellt Etard eine ganze Reihe verschiedener Chlorophylle auf, deren Formeln enorm differieren. Sie sind absurd; jede Fraktion von mehr oder weniger grün gefärbtem Wachs ist für ein individuelles Chlorophyll gehalten worden.

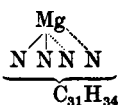
Diese Betrachtung war in der höchsten Blütezeit der organischen Chemie noch möglich, weil eben Chlorophyll in Substanz nicht zu fassen war, und weil es auch noch keine Methode gab, um auch nur eine für die chemische Untersuchung brauchbare Lösung des Pigmentes aus den Blättern zu bereiten. So harrten die ersten Fragen der Analyse noch der Erledigung, und es war sogar unentschieden, welche Elemente dem Molekül des Chlorophylls angehören. Nicht viel mehr war festgestellt als die Tatsache, daß Abbauprodukte des Chlorophylls zu den Pyrrolderivaten gehören.

Die Isolierung des Chlorophylls anzustreben, erschien fürs erste aussichtslos wegen seiner Veränderlichkeit, seiner chemischen Indifferenz und wegen der Leichtlöslichkeit des mit so vielen farblosen und gelben Begleitern verdünnten Farbstoffes. Aber ohne das Chlorophyll selbst zu untersuchen, haben wir zunächst die Eigentümlichkeiten seiner Konstitution aus der Betrachtung der Derivate abgeleitet, welche bei der Reaktion mit Säure und mit Alkali entstehen.

Wenn man Alkalihydroxyd auf Chlorophyll einwirken läßt, so wird es in Salze von chlorophyllgrüner Farbe verwandelt. Aus dem neutralen Chlorophyll ist eine Säure geworden, die wasserlösliche Salze bildet. Bei der Reaktion mit Alkalien ist also ohne eine bedeutende optische Änderung eine Komponente hydrolytisch abgespalten worden, welche mit einer sauren Gruppe verbunden war. Auf einen anderen Teil des Moleküls richtet sich die gelinde Einwirkung von Säure, wobei die Chlorophyllfarbe in Oliv umschlägt; eine salzbildende Gruppe entsteht nicht, die Verseifung wird also dabei vermieden. Daher erreicht man es, bei der Spaltung durch Säure diejenige Komponente des Chlorophylls zu schonen und im Spaltungsprodukt aufzufinden, welche durch Alkalien abgetrennt wird, und umgekehrt müssen die Alkaliderivate des Farbstoffes noch eine charakteristische Atomgruppe aufweisen, welche von Säuren auffallend leicht zerstört wird. Gemäß diesem leitenden Gedanken war es möglich, ehe das Chlorophyll selbst bekannt war, seine Merkmale aus der Analyse der von Säure und Alkali gebildeten Abbauprodukte zu kombinieren — und zwar so vollständig, daß die Analyse am Ende gar nichts Neues mehr ergab, als es schließlich gelang, den natürlichen Farbstoff rein darzustellen.

Die chlorophyllgrünen Carbonsäuren, die Chlorophylline, welche bei alkalischer Hydrolyse in den alkoholischen Blätterauszügen entstehen, sind zwar sehr zersetzlich, sie ließen sich aber aus dem Gemisch mit anderen Produkten der Verseifung einigermaßen rein abtrennen. Aus ihrer ätherischen Lösung wurden sie von Dinatriumphosphat aufgenommen und mit Mononatriumphosphat wieder daraus entbunden. Sie erwiesen sich bei der Analyse als Magnesiumverbindungen, in denen das Magnesium komplex gebunden ist, also nicht in einem elektrolytisch dissoziierbaren Zustand wie in Magnesiumsalzen, sondern in einer eigentümlichen Bindungsweise an Stickstoff und einem Beständigkeitsverhältnis, an dem die Ionenreaktionen des Metalles versagen. Die magnesiumhaltige Gruppe ist zwar sehr empfindlich gegen Säure, aber ungemein beständig gegen Alkalien, so daß sie bei tiefgreifenden Umwandlungen der Moleküle, durch die sogar Carboxylgruppen, eine nach der anderen, abgespalten werden, unversehrt bleibt. Daher trat beim Erhitzen des Chlorophylls mit konz. alkoholischen Alkalien eine Reihe gut kristallisierender farbenprächtiger und intensiv fluoreszierender Abbauprodukte mit drei, zwei und schließlich einer Carboxylgruppe auf, die sog. Phylline. Alle diese Verbindungen, von denen eine Anzahl nach ihrer schönen roten und blauen Farbe ihre Namen wie Glauko- und Rhodophyllin erhielten, und von denen wir ein Dutzend in einheitlichem, kristallisiertem Zustande dargestellt haben, sind magnesiumhaltig und dabei freie Säuren. Immerhin wird von den Chemikern noch die Frage erörtert, ob nicht das Magnesium in den Phyllinen doch an Sauerstoff gebunden sei; unsere Agrikulturchemiker

aber bezweifeln heute noch das Vorkommen des Magnesiums im Chlorophyll. Wir vollenden nun den Abbau durch Alkali, indem wir beim Erhitzen der Phylline mit Natronkalk das letzte Carboxyl abspalten und zu der sauerstofffreien Stammsubstanz, wir nennen sie Ätiophyllin, gelangen, deren Zusammensetzung durch die Formel  $C_{31}H_{34}N_4Mg$  ausgedrückt wird. Der Aschegehalt ist hier infolge der Verkleinerung des Moleküls auf 8% Magnesiumoxyd gestiegen. Hier sind nur noch stickstoffhaltige Gruppen zur Verfügung, nämlich vier Stickstoffatome, um das Magnesium mit zwei Valenzen zu binden und mit Nebervalenzen komplex zu befestigen:



Der Magnesiumgehalt des Chlorophylls ist konstant. Er ist mit ausnahmsloser Übereinstimmung bei Land- und Wasserpflanzen der verschiedensten Klassen ermittelt worden. Die Magnesia ist seit langem den unentbehrlichen Mineralbestandteilen der Pflanzen zugezählt worden. Die nun erst bekannt gewordene wichtige Funktion des Metalles sollte mehr Aufmerksamkeit der Agrikulturchemiker auf die Frage lenken, ob die natürliche Versorgung der Nutzpflanzen mit Magnesium ausreicht. In ganz neuen Arbeiten hat E. M a m e l i im botanischen Institut von Pavia den günstigen Einfluß eines Zusatzes von Magnesiumsalz bei verschiedenartigen Kulturen auf Chlorophyllbildung und Wachstum untersucht.

Die sämtlichen Phylline verlieren unter der Einwirkung von Säure das Magnesium. So entstehen mehrbasische und einbasische Aminosäuren, die Porphyrine, die mit dem schon bekannten, wenn auch früher nicht einheitlich erhaltenen Phylloporphyrin eine natürliche Gruppe bilden, und schließlich entsteht das einfachste sauerstofffreie Porphyrin, das Ätioporphyrin  $C_{31}H_{34}N_4$ .

Dieses Verhalten der Phylline gegen Säure belehrt uns über die Einwirkung der Säuren auf die Lösungen von Chlorophyll selbst, bei der ein so augenfälliger Umschlag der Farbe und Abschwächung der Fluorescenz erfolgt. Diese Reaktion ließ sich auf Grund der Entdeckung verfolgen, daß bei der gelinden Zersetzung mit Oxalsäure ein in Alkohol schwer lösliches Chlorophyllderivat, Phäophytin, in geradezu reinem Zustande und fast quantitativ aus weingeistigen Blätterextrakten ausfällt. An die Stelle des umständlichen und wenig ergiebigen Verfahrens, nach welchem H o p p e - S e y l e r s Chlorophyllan als Produkt unbeabsichtigter Spaltung des Farbstoffes unter Mitwirkung pflanzlicher Säure erhalten worden, tritt eine Methode, welche das Chlorophyll irgendwelcher Herkunft in zum Vergleich wohlgeeignetem Zustande abzuscheiden erlaubt. Das Phäophytin enthält kein Magnesium mehr, die Abspaltung des Metalles ist aber auch die einzige Veränderung, die eingetreten ist, wenn die Vorbereitung des Pflanzenmaterials, die Extraktion und die Behandlung mit Säure mit all den Vorsichtsmaßregeln erfolgt, die sich aus den Erfahrungen einiger Jahre ergeben haben.

Das Phäophytin ist eine chemisch indifferente, wachsartige Substanz von olivgrüner Farbe in Lösung. Mit einem Schlage wird dieses Spaltungsprodukt dem Chlorophyll wieder ähnlich, sobald man in sein Molekül ein Metall einführt, das komplexe Bindung eingeht. Manche Metalle treten sehr leicht ein, z. B. Kupfer und Zink, bei der Einwirkung ihrer essigsauren Salze auf die alkoholische Lösung von Phäophytin. Viel schwieriger war es bei der Säureempfindlichkeit des Komplexes das Magnesium wieder einzuführen und dadurch Phäophytin wieder in Chlorophyll zu verwandeln. Dies ist schließlich erreicht worden bei der Einwirkung von Grignardscher Lösung, z. B. von Methylmagnesiumjodid, auf Phäophytin oder auf Porphyrine. Ein zweites Verfahren, die Einwirkung von Magnesiumoxyd auf Alkali in der Hitze, ist zwar für die Zurückbildung des Chlorophylls wegen dessen Alkalibeständigkeit nicht anwendbar, aber sehr geeignet für die Bildung der Phylline aus Porphyrinen.

Zur Gewinnung von Phäophytin, und zwar kilogramm-

weise, dient uns das Mehl getrockneter Blätter, namentlich von Brennesseln. Außerdem ist das Phäophytin zu analytischen Zwecken aus mehr als 200 Pflanzen bereitet worden, die aus den verschiedensten Klassen ausgewählt worden sind, aus Meeresalgen, aus Laubmoos, Farnkraut, Schachtelhalm, Lycopodium, Coniferen, aus verschiedenen Monocotyledonen und Dicotyledonen. Dabei hat sich übereinstimmend ergeben, daß das Phäophytin ein Ester ist, der als ein Drittel des Moleküls einen neuen hochmolekularen Alkohol enthält, das Phytol. Es wird durch Verseifung mit alkoholischem Kali in reinem Zustande erhalten. Seine Zusammensetzung ist  $C_{20}H_{40}O$ , es gehört in die Reihe der ungesättigten aliphatischen primären Alkohole. Untersuchungen über seinen Abbau haben es wahrscheinlich gemacht, daß in ihm ein stark verzweigtes Kohlenstoffgerüst enthalten ist. Eine dafür vorgeschlagene, allerdings im einzelnen noch hypothetische Strukturformel hat den Gedanken zur Anschauung gebracht, daß zwischen dem Phytol und dem Isopren, dem Baustein der Terpene und des Kautschuks, nahe Beziehungen bestehen.

Das durch die Säure gebildete Chlorophyllderivat hat also den gesuchten Aufschluß gegeben über die erste Änderung, welche die Alkalien an dem Molekül des Chlorophylls bewirken; sie verseifen die Phytol estergruppe.

Die Erkenntnis, daß das Phytol konstant als ein Bestandteil des Chlorophylls auftritt, hat sich nicht so geraden Weges aus der vergleichenden Untersuchung vieler verschiedener Pflanzen ergeben. Anfangs zeigten die Phäophytinpräparate verschiedener Herkunft Schwankungen; der Phytolgehalt überschritt nie 33%, blieb aber nicht selten darunter und sank in manchen Fällen bis auf Null. Gerade die Pflanzen mit scheinbar niedrigem Phytolgehalt erwiesen sich als ausgezeichnetes Material zur Isolierung des Chlorophylls in einer wunderbar schönen Form, nämlich als sog. „krystallisiertes Chlorophyll“, das von dem russischen Botaniker B o r o d i n im Jahre 1881 in Blattsnitten unter dem Mikroskop entdeckt worden war. M o n t e v e r d e in St. Petersburg hatte zu Anfang der neunziger Jahre das krystallisierte Chlorophyll spektroskopisch untersucht. Er unterschied zwei Arten von Chlorophyll, krystallisiertes und amorphes, und hielt ersteres für das natürliche Pigment, das letztere für ein Zersetzungsprodukt. Diese Ansicht erkennen wir jetzt als irrtümlich. Krystallisiertes Chlorophyll ist phytolfrei, es ist ein Abkömmling des natürlichen phytolhaltigen Pigmentes, das seinem Gehalt an dem hochmolekularen Alkohol die Leichtlöslichkeit und mehr wachsähnliche Beschaffenheit verdankt.

Die Analyse des krystallisierten Chlorophylls und seine Gewinnung in präparativem, und zwar in bedeutendem Maßstab war von großem Wert, ehe es gelang, den natürlichen Farbstoff selbst in reinem Zustande abzuscheiden.

Das Rätsel der Bildung von krystallisiertem Chlorophyll und des damit Hand in Hand gehenden Fehlens von Phytol hat in den letzten Jahren vollständige Erklärung gefunden auf Grund der Beobachtung, daß bei raschem Extrahieren mancher Blätter der Phytolgehalt normal, aber zu niedrig bei langsamem Extrahieren wird, also bei längerer Berührung des Extraktes mit dem Mehle der getrockneten Blätter. In den grünen Pflanzenteilen wird das Chlorophyll von einem zu den Esterasen gehörenden Enzym, der Chlorophyllase, begleitet, die nicht, wie man von den Enzymen im allgemeinen angenommen hatte, in alkoholischen Medien unwirksam ist, die vielmehr die Verdrängung des Phytols durch den Alkohol des Extraktes, also eine Alkoholyse des Chlorophylls, veranlaßt. Das Enzym ist sehr verbreitet, aber seine Menge scheint in weiten Grenzen zu schwanken. Nachdem einmal die Dynamik dieser Enzymreaktion genügend studiert war, ist von den Wirkungen der Chlorophyllase in ausgedehntem Maße zu präparativen Zwecken Anwendung gemacht worden. Die Bildung des „krystallisierten Chlorophylls“ hat nichts Zufälliges mehr. Aus frischen wie aus getrockneten Blättern läßt sich fast das gesamte Chlorophyll in Form der Äthyl- oder Methylverbindung (Äthyl- und Methylchlorophyllid) abscheiden oder durch Hydrolyse in Form der entsprechenden freien Carbonsäure, Chlorophyllid.

Umgekehrt ist uns auch die Synthese des Chlorophylls aus den zwei Komponenten gelungen, nämlich aus der Säure

Chlorophyllid und dem Alkohol Phytol durch Esterifizierung unter der katalytischen Wirkung der Chlorophyllase.

Für den Vergleich der verschiedenen Pflanzen kommt nun zu den beiden ersten Merkmalen, dem Magnesium und dem Phytol, die genauere Untersuchung des Phytochrominkernes, der bei der Verseifung des Phäophytins in Form hochmolekularer stickstoffhaltiger Carbonsäuren auftritt. Anfangs hat die Untersuchung zu einer großen Zahl verschiedener Spaltungsprodukte geführt, die zwei Gruppen angehören: die einen, Phytochlorine, sind in indifferenten Lösung olivgrün, die anderen, Phytorhodine, rot. Die basische Natur dieser Verbindungen zeigt außerordentliche Differenzierung; darauf konnte eine wichtige Methode zu ihrer Untersuchung und Trennung gegründet werden. In dem Maße aber, als die Vorbehandlung des Pflanzenmaterials und namentlich die Extraktion und die Behandlung der Extrakte mit Säure verbessert und gleichmäßiger gestaltet wurden, sind alle Unterschiede zwischen den Chlorophyllderivaten verschiedener Herkunft spärlicher und seltener geworden, und es ist schließlich gelungen, die Methoden für den Abbau so zu vervollkommen, daß aus jeglichem grünen Blatt zwei, und zwar ausschließlich zwei Spaltungsprodukte hervorgehen, ein

Phytochlorin e von der Zusammensetzung  $C_{34}H_{34}O_5N_4$  und ein

Phytorhodin g von der Zusammensetzung  $C_{34}H_{34}O_7N_4$ .

Frische Blätter, die sofort nach dem Pflücken extrahiert werden, und sorgfältig getrocknete Blätter ergeben ganz übereinstimmende Resultate. Das Chlorophyll ist allerdings in den alkoholischen Lösungen sehr veränderlich; labile Atomgruppen in seinem Molekül bedingen leicht Isomerisationen. Es war daher ein Haupterfordernis für die Untersuchung des Chlorophylls, die Ursachen der in den Lösungen eintretenden Veränderungen aufzusuchen und zu finden, wie diese Veränderungen hintangehalten werden. Auf dieser Grundlage ist endlich der Beweis geführt worden, daß das Chlorophyll aus allen untersuchten Pflanzen identisch ist.

Das gemeinsame Auftreten eines grünen und eines roten Spaltungsproduktes bei der aufeinanderfolgenden Hydrolyse des Chlorophylls durch Säure und Alkali stellte eine wichtige Frage. Ist es bedingt durch den Zerfall eines größeren Moleküles in zwei Bruchstücke? Dem steht entgegen, daß wir für Phäophytin das Molekulargewicht von ähnlicher Größe finden wie für Phytochlorin und Phytorhodin. Dann wäre es denkbar, daß eines der Spaltungsprodukte einen früheren, das andere einen folgenden Zustand des Abbaues darstellt. Allein Phytochlorin und Phytorhodin lassen sich nicht in einander überführen, auch entstehen sie nebeneinander in ganz bestimmten Gewichtsverhältnissen. Es ist vielmehr aus der Bildung des Phytochlorins e und des Phytorhodins g hervorgegangen, daß das Phäophytin, mithin auch das Chlorophyll ein Gemisch aus zwei Komponenten ist, von welchen die eine das Phytochlorin e beim Abbau liefert, die andere das Phytorhodin g.

Die eine Komponente, sie soll als Chlorophyll a bezeichnet werden, ist blaugrün, die zweite, Chlorophyll b, gelbgrün.

Mit dieser Feststellung wird nur eine Ansicht bestätigt, die schon im Jahre 1864 der englische Physiker Stokes geäußert hat, leider nur mit ein paar kurzen Worten. Stokes hat spektroskopisch das Chlorophyll als ein Gemisch erkannt, und er hat es durch Verteilung zwischen Alkohol und Schwefelkohlenstoff zu scheiden gesucht, also mit einem Verfahren der Entmischung, das nachher Sorby und Kraus wieder entdeckt und ausgebildet haben, und das seitdem viel angewandt wird, namentlich um zu zeigen, daß den grünen Farbstoff gelbe Pigmente begleiten. Die Ansicht von Stokes hat in neuerer Zeit Tswett in Warschau auf originellem Wege bestätigt, nämlich durch eine Trennung des natürlichen Pigmentes in analytischem Maßstabe mittels fraktionierter Adsorption aus seinen Lösungen.

Es war aber bisher schlechterdings unmöglich, zu prüfen, ob nicht bei der Extraktion und bei den Trennungsoperationen erst eine Änderung des Farbstoffes erfolgt ist. Auf eine solche Änderung (wahrscheinlich durch einen enzyma-

tischen Vorgang) sind in der Tat die Angaben von Stokes und von Tswett über das Chlorophyll der Braunalgen zurückzuführen, worin eine dritte Chlorophyllkomponente existieren soll. Wir haben in diesem Jahre eine Untersuchung der Phäophyceenfarbstoffe ausgeführt mit dem Ergebnis, daß das Chlorophyll dieser Algen identisch ist mit dem der Grünalgen und der Landpflanzen. Nur tritt die Komponente b bei den Braunalgen viel mehr zurück, sie verschwindet beinahe.

Von dieser Ausnahme abgesehen, zeigt sich das Gewichtsverhältnis der beiden Komponenten, das wir mit einer quantitativen Methode bestimmen, annähernd konstant, unabhängig von der Pflanzenart und den Lebensbedingungen der Pflanze. Chlorophyll a überwiegt, auf annähernd 3 Mole Chlorophyll a trifft ein Mol Chlorophyll b.

Auch zwischen den grünen Pigmenten und ihren gelben Begleitern in den Chloroplasten, den Carotinoiden, finden wir ein annähernd konstantes molekulares Verhältnis, nämlich etwa 3 : 1.

So haben wir beispielsweise in 1 kg getrockneter Holunderblätter bestimmt:

8,48 g Chlorophyll, nämlich 6,22 g Komponente a und 2,26 g Komponente b,  
1,48 g Carotinoide, nämlich 0,55 g Carotin und 0,93 g Xanthophyll.

Die chemische Kennzeichnung der einzelnen Bestandteile des Blattgrüns hat zwischen der lange Zeit fast vergessenen Hypothese von Stokes und vielen entgegenstehenden Anschauungen, wie den Angaben von Etard über die unendliche Variabilität des Chlorophylls zu entscheiden ermöglicht, und sie ist uns auch die Voraussetzung gewesen, um endlich in den letzten Jahren das Chlorophyll in unverändertem und reinem Zustande als Gemisch seiner Komponenten und in Form der getrennten Komponenten zu isolieren und durch seine Analyse die Folgerungen zu bestätigen, die zuerst aus der Untersuchung der Derivate gezogen worden waren.

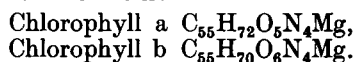
Die Isolierung des Chlorophylls beruht auf der colorimetrischen Bestimmung des Reinheitsgrades seiner Lösungen und auf ihrer systematischen Steigerung durch Entmischungsmethoden. Die Verteilung der in den Extrakten enthaltenen Stoffe zwischen mehreren Lösungsmitteln wird in besonderer Weise hier angewandt, um die gelben und noch mehr um die farblosen Begleiter des Chlorophylls abzutrennen. Aus Extrakten, die infolge der großen Menge von farblosen Begleitstoffen nur 8–16%iges Chlorophyll enthalten, gehen Lösungen von etwa 70%igem Chlorophyll durch die Entmischungsoperationen hervor. Dann endlich verhilft eine unerwartete Beobachtung zur Lösung der Aufgabe. Wenn das Chlorophyll einen gewissen Reinheitsgrad erreicht hat, so ist es zwar noch in alkoholhaltigem Petroläther leicht löslich, aber überraschenderweise nicht mehr in reinem Petroläther. Entfernt man durch Waschen den Äthyl- oder Methylalkohol, so scheidet sich das Chlorophyll aus, und es kann durch Umfällen aus Äther mit Petroläther gereinigt werden.

Anfangs war dieses Verfahren mühsam, und die Ausbeute gering. In neuen Versuchen ist aber durch Abänderungen in den Methoden der Extraktion und Entmischung das Verfahren so vervollkommen worden, daß wir nun ohne viel Mühe aus einigen Kilogrammen trockener Blätter das vollkommen reine Chlorophyll in wenigen Stunden isolieren können und mit Ausbeuten von etwa 80% der gesamten Menge, nämlich 6,5 g aus 1 kg.

Das Verfahren läßt sich auf frische Blätter übertragen und wie im ganzen Verlauf der Untersuchung ergibt sich auch bei der Darstellung der Chlorophyllpräparate und in ihren Eigenschaften kein Unterschied zwischen den frisch gepflückten und den getrockneten Blättern. In 40 Minuten lassen sich aus 0,25 kg frischer Brennesselblätter 0,25 g vollkommen reines Chlorophyll isolieren; man kann mit mehr Zeitaufwand 2,5 kg frischer Blätter auf einmal verarbeiten und daraus 4 g Chlorophyll gewinnen, d. i. etwa vier Fünftel vom Chlorophyllgehalt der Blätter.

Der Blattfarbstoff kann also heute mindestens so leicht rein isoliert werden wie irgend ein anderer Pflanzenbestandteil, wie ein Alkaloid oder ein Zucker.

Bei den Entmischungsprozessen, die zur Isolierung des Chlorophylls dienen, verteilen sich die beiden Komponenten in ungleicher Weise zwischen Methylalkohol und Petroläther. Durch systematische Fraktionierung ließ sich die Verschiebung des Komponentenverhältnisses so steigern und so ausnützen, daß schließlich aus dem Gemisch die zwei ganz einheitlichen Komponenten hervorgingen. Ihre Zusammensetzung ist trotz ihrer optischen Verschiedenheit sehr ähnlich. Der Unterschied besteht in einer verschiedenen Oxydationsstufe. Am Chlorophyll selbst bestätigt sich, was die Formeln von Phytochlorin e und Phytorhodin g vorausgesagt haben: die Verbindungen der Reihe b leiten sich von a wahrscheinlich dadurch ab, daß zwei Atome Wasserstoff durch ein Atom Sauerstoff ersetzt werden entsprechend den Formeln:

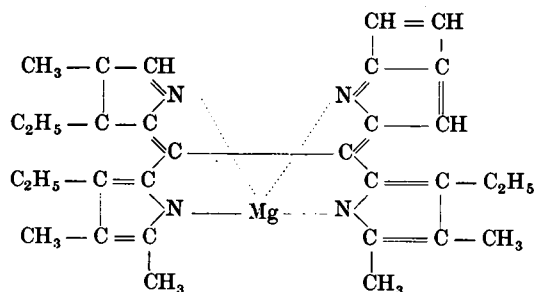
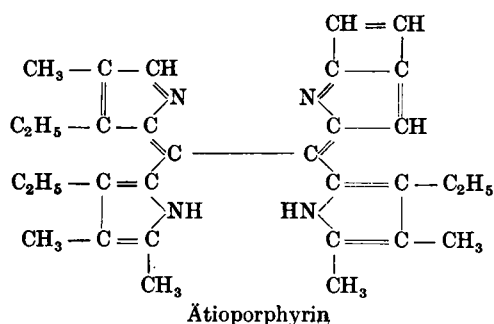


Diese Substitution bedingt einen Unterschied um ein Molekül Sauerstoff. Bei der Größe des Chlorophyllmoleküls erscheint freilich ein solches Resultat unsicher; die Differenz könnte nach den Analysen statt O<sub>2</sub> auch CO<sub>2</sub> sein, und das würde für die Erklärung der chemischen Rolle des Chlorophylls sehr viel ausmachen.

Die angenommene Beziehung zwischen den beiden Komponenten gewinnt an Wahrscheinlichkeit durch das Verhalten der Derivate des Chlorophylls b gegen Grignardsche Verbindungen und durch den Verlauf des Abbaues, der in der b-Reihe gleichfalls zum Ätiophyllin und Ätioporphyrin geführt hat.

Die Konstitutionsbestimmung für beide Chlorophyllkomponenten bietet noch manche schwierige Frage; die Aufgabe richtet sich zunächst auf die einfachere Struktur des Ätioporphyrins, das durch eine neue Untersuchung über den Abbau des Blutfarbstoffes an Bedeutung gewinnt. Die Porphyrine aus Hämin und Chlorophyll waren verwandt, aber nicht identisch. Die Abspaltung des Eisens aus dem Hämin vollzieht sich in einer komplizierteren Reaktion als der Austritt des Magnesiums aus dem Chlorophyll; das entstehende Hämatoporphyrin ist eine Dioxydicarbonsäure. Die Abspaltung seiner Hydroxyle und Carboxyle hat nun auch das Ätioporphyrin ergeben.

Für dieses und für Ätiophyllin lassen sich aus den Resultaten der Oxydation und der Reduktion mit einiger Wahrscheinlichkeit folgende Konstitutionsformeln ableiten:



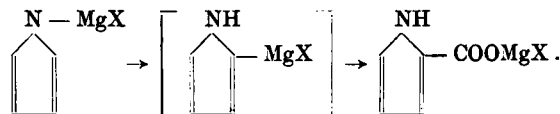
Obwohl hierdurch auf dasselbe aus vier Pyrrolkernen zusammengesetzte Gebilde, das man als eine Stammsubstanz bezeichnen kann, Chlorophyll und Hämin zurückgeführt sind, ziehen wir aus den Untersuchungen über den Abbau nicht den Schluß einer nahen konstitutionellen Verwandtschaft zwischen Chlorophyll und Hämin. Hier Mag-

nesium, dort Eisen, hier Esterbildung mit Phytol, dort Paarung mit Globin; zu solchen der ungleichartigen Funktion entsprechenden Unterschieden kommen noch in dem eigentlichen Farbstoffkern recht bedeutende Unterschiede, die erst bei ganz tiefgreifendem Abbau verschwunden sind.

Die geschilderten präparativen und analytischen Arbeiten haben bezweckt, die Lösung der Strukturfragen vorzubereiten und den Versuchen den Weg zu bahnen, die von der chemischen Funktion des Chlorophylls eine Vorstellung schaffen sollen.

Wir denken uns die Rolle des Magnesiums ähnlich wie in den von Barbier und Grignard entdeckten Organomagnesiumverbindungen, die in der organischen Synthese durch ihre Reaktionsfähigkeit eine so große Wichtigkeit erlangt haben. Unsere Parallele zwischen diesen und dem Blattfarbstoff schien aber ungenau zu sein, da sie den Unterschied zwischen der Bindung des Metalles an Kohlenstoff in den gewöhnlichen magnesiumorganischen Verbindungen und der Substitution am Stickstoff im Chlorophyll unbeachtet läßt. Indessen halten wir diesen Unterschied weder für scharf, noch für charakteristisch.

In den letzten Jahren hat B. Oddo wichtige Untersuchungen über Pyrrolmagnesiumjodid ausgeführt, das mit Kohlensäure und mit Säurechloriden unter Bildung von  $\alpha$ -substituierten Pyrrolen reagiert, von  $\alpha$ -Carbopyrrolsäure und Alkylpyrrolketonen. Wahrscheinlich entsteht zuerst das N-Magnesiumderivat, das sich weiterhin entweder in die  $\alpha$ -Magnesiumverbindung verwandelt oder als solche reagiert, z. B.



Die Pyrrolmagnesiumderivate haben sich also — vergleichbar mit Natracetessigester — verhalten, wie irgendwelche Grignardschen Körper mit Bindung des Metalles an Kohlenstoff.

Das Chlorophyll kann zu der nämlichen Klasse magnesiumorganischer Verbindungen gerechnet werden, und es erscheint nicht berechtigt, zwischen dem Magnesiumphenyljodid, dem Pyrrolmagnesiumjodid und dem Chlorophyll eine scharfe Grenze zu ziehen; nur zeichnet sich das Chlorophyll infolge der hinzukommenden komplexen Bindung des Metalles durch eine größere Beständigkeit des Magnesiums gegen Wasser vor den gewöhnlichen Organomagnesiumverbindungen aus.

Dieser Vergleich fordert nicht, daß der Farbstoff im Assimilationsprozeß die Kohlensäure seinem Moleküle einverleibt; dies kann durch die Substitution in den magnesiumtragenden Pyrrolkernen verhindert sein. Vielmehr läßt sich die Funktion des Chlorophylls so denken, daß die Kohlensäure durch die Affinität der Magnesiumverbindungen angezogen, und daß ihre Reduktion durch die Chlorophyllkomponente a in dem Prozesse bewirkt wird, der die absorbierte Lichtenergie verbraucht. Das Chlorophyll a oxydiert sich dabei zum Chlorophyll b, und dieses wird unter Abspaltung von Sauerstoff wieder in die erste Komponente zurückverwandelt; zwischen beiden Komponenten stellt sich ein Gleichgewichtszustand ein.

Es ist entweder möglich, daß diese Abgabe von Sauerstoff aus der Komponente b unmittelbar erfolgt, oder daß sich die gelben Pigmente Carotin und Xanthophyll an der Rückverwandlung in das Chlorophyll a beteiligen. Da die Carotinoide konstant in den Chloroplasten die grünen Farbstoffe begleiten, so ist es wahrscheinlich, daß sie mit ihnen durch die Funktion verbunden sind. Vielleicht ist es ihre Aufgabe, das Verhältnis der Chlorophyllkomponenten zu regulieren, etwa in der Weise, daß Carotin dem Chlorophyll b Sauerstoff entzieht, und daß dieser aus dem gebildeten Xanthophyll unter der Wirkung eines Enzyms entbunden wird.

Es ist ein Ziel künftiger Untersuchungen, das bei der Assimilation der Kohlensäure wirksame System vollständiger zu erforschen und schließlich mit Hilfe der isolierten Komponenten des Systems die Assimilation außerhalb der Pflanze zu erzielen.