

Über Chlorophyll.

Von

RICHARD WILLSTÄTTER.

Vortrag, gehalten in der Hauptversammlung der Naturforschenden Gesellschaft
Zürich am 3. Juni 1912.

Die unermessliche Produktion organischer Materie geschieht in den grünen Pflanzen durch die Wirkung des Chlorophylls. Die Laboratorien des gesamten Assimilationsprozesses sind besondere Organe des Plasmakörpers, in welchen das Pigment lokalisiert ist, die Chlorophyllkörper. In ihnen erfolgt nach Sachs im Lichte die Bildung der Stärke, aus ihnen verschwindet sie im Dunkeln. Die Synthese der Kohlehydrate aus der Kohlensäure ist eine energieverbrauchende Reduktion: die Assimilation der Kohlensäure erfordert die Assimilation des Sonnenlichtes. Diese wunderbare Beziehung in der Rolle der grünen Gewächse hat schon der Erfinder der Lokomotive erkannt, Robert Mayer hat sie in seiner Mechanik der Wärme klar ausgesprochen und Boltzmann hat ihr vor 25 Jahren folgenden klassischen Ausdruck gegeben:

„Der allgemeine Daseinskampf der Lebewesen ist daher nicht ein Kampf um die Grundstoffe — die Grundstoffe aller Organismen sind in Luft, Wasser und Erdboden im Überflusse vorhanden, auch nicht um Energie, welche in Form von Wärme, leider unverwandelbar, in jedem Körper reichlich enthalten ist, sondern ein Kampf um die Entropie, welche durch den Übergang der Energie von der heissen Sonne zur kalten Erde disponibel wird. Diesen Übergang möglichst auszunutzen, breiten die Pflanzen die unermessliche Fläche ihrer Blätter aus und zwingen die Sonnenenergie, in noch unerforschter Weise, ehe sie auf das Temperaturniveau der Erdoberfläche herabsinken, chemische Synthesen auszuführen, von denen man in unseren Laboratorien noch keine Ahnung hat. Die Produkte dieser chemischen Küche bilden das Kampfobjekt für die Tierwelt.“

Ohne genauere Kenntnis von Chlorophyll 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 Lichtstrahls im lebenden Blatt seinem Wärmehalt und dem Grad seiner Absorption durch das Chlorophyll, also der vom Blatt absorbierten Energiemenge proportional sei. Diese Vorhersage ist von Pflanzenphysiologen geprüft und wahrscheinlich gemacht worden. Timiriazeff hat die älteren Versuche von Daubeny, Draper und Sachs über den Zusammenhang von Lichtfarbe und Assimilationsintensität fortgesetzt und er hat 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 Fraunhoferschen Linie F aufgefunden und Engelmann hat mit seiner berühmten Bakterienmethode die Beobachtung bestätigt. Der weit kräftigere Einfluss der roten Strahlen auf die Assimilation im Vergleich mit den blauviolettten ist eine Folge ihrer grösseren Wärmewirkung.

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 Kompromiss zwischen dem Erfordernis, mit genügender Intensität das Licht photochemisch auszunützen und der Gefahr, durch zu intensive Absorption den Chlorophyllapparat selbst und das gesamte Plasma zu gefährden. So erklärt sich nach Stahl das grüne Pflanzenkleid der Erde als eine Anpassung an die Zusammensetzung des diffusen Tageslichtes; die Blätter sind dafür eingerichtet, die Strahlengattungen zu absorbieren, die ihnen am reichlichsten zur Verfügung stehen und sie erscheinen daher in Farbtönen, die komplementär sind zu den am Himmel herrschenden Farben.

Um von der Übertragung der absorbierten Lichtenergie für die Photosynthese in den Chloroplasten eine Vorstellung zu geben, hat Timiriazeff das Chlorophyll als optischen Sensibilisator erklärt: der Farbstoff übertrage die Wirkung des absorbierten Lichtes auf die Umformung der Kohlensäure. Eine schnelle Einwirkung roter Lichtstrahlen auf Silberhalogenide, die sonst nur gegen blaue und violette Strahlen empfindlich sind, wird durch Zusatz von Chlorophyll erreicht. Analog sucht Timiriazeff die Rolle des Chlorophylls in einer Sensibilisierung der Kohlensäure, wodurch diese für die vom Chlorophyll vorzugsweise absorbierten Strahlen empfindlich gemacht werde.

Tiefer geht auf die optische Beteiligung des Chlorophylls an der Photosynthese eine Hypothese ein, die der russische Botaniker Tswett im vorigen Jahre veröffentlicht hat. Sie knüpft an die Anschauung an, nach der Fluoreszenten bei der Einwirkung von Licht unter Energieaufnahme umkehrbare molekulare Veränderungen erfahren, so dass sie bei der Rückbildung der ursprünglichen Konstitution der Moleküle die zuerst aufgenommene Energie als Lumineszenzlicht abstrahlen. Demgemäss nimmt Tswett an, dass bei einer umkehrbaren molekularen Veränderung im Chlorophyll Lumineszenz oder vielmehr Phosphoreszenzstrahlung aufträte, die von der Kohlensäure oder ihren Ionen absorbiert werde und ihren Zerfall bewirke.

Soweit ist der Mechanismus der photosynthetischen Energieübertragung behandelt worden ohne Berücksichtigung der chemischen Natur des Chlorophylls.

Seitdem Pelletier und Caventou im Jahre 1818 dem grünen Pigment den Namen Chlorophyll gegeben, hat fast neunzig Jahre lang die chemische Untersuchung keinerlei Anhaltspunkte dafür geliefert, dass zugleich mit seiner optischen das Chlorophyll auch eine chemische Rolle ausübt. Erst in den letzten sieben Jahren hat die Analyse des Farbstoffs begonnen, die Hoffnung zu rechtfertigen, in der sie unternommen worden ist, nämlich die Erkenntnis einer chemischen Funktion des Chlorophylls vorzubereiten.

In der Jugend der organischen Chemie sind unter ihren Objekten die natürlichen Verbindungen, welche der pflanzliche und tierische Organismus zur Verfügung stellt, im Vordergrund gestanden. Dann hat einige Zeit das Gebiet der Benzolderivate, deren Hauptquelle die trockene Destillation der Kohle ist, und der aus ihnen synthetisch gebildeten Farbstoffe einen grossen Teil der chemischen Arbeit in Anspruch genommen, bis schliesslich in den letzten Jahrzehnten die organische Chemie sich wieder überwiegend der Untersuchung physiologisch wichtiger Körper zu widmen begann. Bei dieser Entwicklung der organischen Chemie ist es seltsam, dass das Chlorophyll, von dem Darwin sagt, es sei „perhaps the most interesting of organic substances“, völlig unbekannt blieb hinsichtlich seiner chemischen Natur, seiner empirischen Zusammensetzung, sogar hinsichtlich der Bausteine seines Moleküls. Dies war eine Folge der Unbeständigkeit des Farbstoffs und seiner chemischen Indifferenz, des Mangels an basischen und sauren Eigenschaften; es wird dadurch ausgeschlossen, das Pigment mit den üblichen chemischen Methoden zu isolieren.

Die chemische Literatur weist drei Perioden in der Untersuchung des Chlorophylls auf.

Die erste Epoche umfasst namentlich die Arbeiten von Berzelius in den dreissiger und die von Frémy in den sechziger Jahren.

Berzelius hat in der Meinung, Blattgrün vertrage den Einfluss von Säure und Lauge, ohne zersetzt zu werden, für die Isolierung des Chlorophylls starke Salzsäure und Alkalien angewandt. Er fand, dass das Blattgrün weder ein Harz noch Wachs oder Fett sei, sondern zu den Farbstoffen gehöre und er vergleicht seine Farbkraft mit der von Indigo.

Frémy hat das Pigment als ein Gemisch betrachtet. Auf den Abdampfrückstand eines alkoholischen Extraktes oder auf eine mit Tonerde und Alkalilauge aus dem Extrakt erhaltene gelbe Füllung liess er starke Salzsäure und Äther einwirken; nach dem Scheiden war der Äther rein gelb, die Säure blau. In diesen Schichten nahm Frémy zwei Komponenten des Chlorophylls an, die gelbe nannte er Phylloxanthin, die blaue Phyllocyanin. Einige Zeit hielt er das Chlorophyll für ein farbiges Fett, worin dem indifferenten Phylloxanthin die Rolle des Glycerins, dem Phyllocyanin diejenige der Fettsäure zukäme. Später hat Frémy der Hypothese den Vorzug gegeben, Chlorophyll sei ein Gemenge von Phylloxanthin mit dem Kaliumsalz einer Phyllocyaninsäure. Die Namen Phylloxanthin und Phyllocyanin haben weitergelebt und in der Folge ihre Bedeutung öfters gewechselt; ursprünglich lag im Phylloxanthin das freilich noch ganz unreine und durch Säure veränderte Gemisch gelber Begleiter vor, im Phyllocyanin aber ein Gemenge von Spaltungsprodukten des Chlorophylls.

In eine zweite Periode fallen die Untersuchungen von Hoppe-Seyler, Gautier, Tschirch, von Schunck und Marchlewski und von Hartley. Die Methoden der Behandlung des Farbstoffs werden schonender. Die Frage, ob Säure und Alkalien zersetzend wirken und welche Veränderungen sie herbeiführen, 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 hier nicht vor schweren Irrtümern geschützt. Wir wissen heute, dass manche bedeutende Veränderung des Chlorophylls und seiner Derivate ohne Einfluss auf das Absorptionsspektrum sind, dass andererseits manche konstitutionell geringfügige Änderungen unverhältnismässig grosse Änderungen im Spektrum hervorrufen.

Ein einziges Resultat von den Arbeiten dieser Zeit ist bleibend: Man erkennt einen Zusammenhang zwischen dem molekularen Bau des Blut- und des Blattfarbstoffes.

Hoppe-Seyler hat im Jahre 1879 unter Vermeidung energischer Mittel Chlorophyll aus frischem Gras mit Hilfe von siedendem Alkohol zu isolieren versucht. Aus den eingedunsteten Extrakten ist durch eine Folge von Trennungs- und Reinigungsoperationen ein kristallisierendes Chlorophyllderivat hervorgegangen, das Chlorophyllan. Es war nach der oliv-grünen Farbe seiner Lösungen nicht unverändertes, sondern, wie sich nachher gezeigt hat, durch Pflanzensäure zersetztes Chlorophyll, übrigens nicht in reinem Zustand. Seine Analyse, besonders der Phosphorgehalt (1,4 Prozent) seiner Asche, hat Hoppe-Seyler zu der Vermutung geführt, Chlorophyll zähle zu den Lecithinen. Diese Hypothese ist bis in die letzten Jahre hartnäckig und heftig von Stoklasa verfochten worden, der im Chlorophyll Phosphor und Kalium findet und zwar noch mehr Phosphor als im Lecithin.

Hoppe-Seyler hat mit dem Chlorophyllan einen wichtigen Versuch ausgeführt. Bei dem Erhitzen mit Alkalien auf hohe Temperatur beobachtete er seine Umwandlung in einen purpurroten Farbstoff, den er Dichromatinsäure nannte. Mit Salzsäure entstand daraus eine Verbindung, das Phylloporphyrin, das in seinen optischen Merkmalen auffallend ähnlich dem Hämatoporphyrin war, das aus Hämin durch starke Säuren gebildet wird. Wenn Hoppe-Seyler auch das Missgeschick hatte, bei der Analyse der Dichromatinsäure den Stickstoffgehalt zu übersehen, so hat er doch die Verwandtschaft von Blatt- und Blutfarbstoff zuerst experimentell festgestellt. Mit grossem Unrecht schreibt man zumeist das Verdienst dieser Entdeckung den späteren Autoren, namentlich Schunck und Marchlewski, zu. Freilich wird auch die Tragweite dieser Beziehung überschätzt. Die Porphyrine aus dem Hämin und aus dem Chlorophyll sind einander ähnlich, aber identisch sind sie durchaus nicht. Zu identischen Produkten gelangt man erst bei ganz tiefgreifender Spaltung des Farbstoffs, bei der Reduktion, die zu einfachen Pyrrolhomologen mit acht und neun Atomen Kohlenstoff, den Hämopyrrolen und dem Phyllopyrrol, führt.

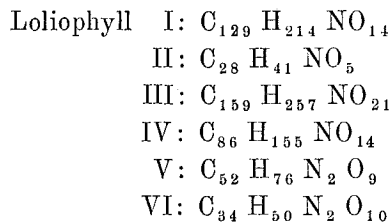
Biologische Folgerungen hat Nencki aus der Verwandtschaft zwischen den beiden für die Lebensprozesse wichtigsten Pigmenten zu ziehen versucht. Er meinte, dass die Beziehung zwischen Phylloporphyrin und Hämatoporphyrin uns einen Einblick in die entfernteste Vergangenheit der Entwicklung organischer Wesen gestatte und auf die Stammverwandtschaft der pflanzlichen und tierischen Organismen hinweise. Die Folgerung ging über die experimentellen Grundlagen weit hinaus und war verfrüht. Das Unterscheidende in der molekularen Struktur von Chlorophyll und Hämin ist erst später zutage

getreten; es ist entsprechend der ganz verschiedenen Funktion beider Pigmente viel tiefer greifend als die konstitutionelle Verwandtschaft.

Zu gleicher Zeit mit Hoppe-Seyler hat A. Gautier in Paris ein Präparat gewonnen, das er für reines Chlorophyll hielt. Nach Analyse und Beschreibung war es auch ein Produkt der Zersetzung durch Säure und es steht dem Chlorophyllan sehr nahe.

In den folgenden Jahrzehnten haben Schunck und Marchlewski bei der Einwirkung von Säuren und Alkalien auf Chlorophyll Spaltungsprodukte gewonnen, Phylloxanthin, Phyllocyanin, Phyllo-taonin u. a., deren genetischer Zusammenhang mit dem Chlorophyll unerklärt blieb und über deren Zusammensetzung fast keine Angaben veröffentlicht worden sind. Das durch Säure gebildete Phylloxanthin gab Asche, die als integrierenden Bestandteil Eisen aufwies; die mit Alkalien erhaltenen Abbauprodukte waren frei von Mineralbestandteilen. Gerade umgekehrt finden wir heute beim Abbau von Chlorophyll mit Säure aschefreie Substanzen, mit Alkalien hingegen die Derivate mit einem wesentlichen und charakteristischen Mineralbestandteil.

In allen diesen Untersuchungen ist für das Pigment, dessen physiologische Rolle einzigartig, dessen Farbe und Spektrum so ausgezeichnet ist, noch gar kein chemisches Merkmal festgestellt worden, das ermöglichen würde, das Chlorophyll verschiedener Pflanzen zu vergleichen. Die Ansichten über Identität oder Verschiedenheit des Farbstoffs 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 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.

Einen dritten Abschnitt in der Untersuchung des Chlorophylls haben die Arbeiten eingeleitet, welche aus dem chemischen Laboratorium der eidgenössischen technischen Hochschule in den letzten Jahren veröffentlicht worden sind.

Für die Analyse des Chlorophylls mussten, da es selbst noch nicht bekannt war, fürs erste seine Derivate dienen, die aus der Reaktion mit Säure und mit Alkali hervorgehen. Wenn man Alkalihydroxyd auf Chlorophyll einwirken lässt, so entstehen Alkalisalze von chlorophyllgrüner Farbe. Aus dem chemisch indifferenten Chlorophyll ist eine Säure geworden, die wasserlösliche Alkalisalze bildet. Bei der Reaktion mit Alkalien ist also ohne eine bedeutende optische Änderung eine Komponente hydrolytisch abgespalten worden, welche mit der saueren Gruppe verbunden war. Die gelinde Einwirkung von Säure, wobei die Chlorophyllfarbe in oliv umschlägt, richtet sich auf einen anderen Teil des Moleküls; eine salzbildende Gruppe entsteht nicht, die Verseifung wird also dabei vermieden. Es ist daher möglich, bei der Spaltung durch Säure diejenige Komponente des Chlorophylls zu verschonen und im Spaltungsprodukt aufzufinden, welche durch Alkalien abgetrennt wird und umgekehrt müssen die Alkaliderivate des Farbstoffs noch eine charakteristische Atomgruppe aufweisen, welche von Säure so leicht zerstört wird. Es gelingt also, ohne das Chlorophyll selbst zu kennen, seine Merkmale aus der Analyse der von Säure und Alkali gebildeten Abbauprodukte zu kombinieren — und zwar so gut, dass die Analyse am Ende gar nichts Neues mehr ergibt, als es gelingt, den natürlichen Farbstoff in reinem Zustand zu isolieren.

Die durch alkalische Verseifung gebildete chlorophyllgrüne Säure, Chlorophyllin, hat sich als eine Magnesiumverbindung erwiesen, in der das Metall komplex gebunden ist, d. h. es ist nicht wie in einem Magnesiumsalz in elektrolytisch dissoziierbarem Zustand, sondern es befindet sich in einer besonderen Art von Bindung und in einem Beständigkeitsverhältnis, an dem die Ionenreaktionen des Metalls versagen. Der Magnesiumkomplex ist zwar sehr empfindlich gegen Säure, aber ungemein beständig gegen Alkalien, so dass er bei tiefgreifenden Umwandlungen der Moleküle, durch die sogar Karboxylgruppen abgespalten werden, unversehrt bleibt. So liefert das Chlorophyll beim Erhitzen mit konzentrierten alkoholischen Alkalien bis auf 240° eine Reihe farbenprächtiger und intensiv fluoreszierender Abbauprodukte mit drei, zwei und schliesslich einer Karboxylgruppe,

die sog. Phylline. In allen, vom Chlorophyll selbst und den grünen Chlorophyllinen an, in dem blauen Glaukophyllin, in den roten Verbindungen Rhodophyllin, Pyrrophyllin und Phyllophyllin, trifft auf vier Atome Stickstoff ein Atom Magnesium; der Aschegehalt von reiner Magnesia beträgt beim Chlorophyll 5 Prozent und steigt infolge der Verkleinerung des Moleküls auf 7,5 Prozent bei den letzten einbasischen Phyllinen. Die Bindungsweise des Metalls lässt sich auf Grund der Anschauungen verstehen, mit denen A. Werner die Metallammoniake und die anderen komplexen Metallverbindungen erklärt hat. Mit den zwei Valenzen, die an den Stickstoff von zwei Pyrrolkernen gebunden sind, ist die Affinität des Magnesiums nicht erschöpft; durch Partialvalenzen verbindet es sich noch mit zwei anderen Pyrrolstickstoffen zum Komplex.

Die Empfindlichkeit gegen Säure ist das gemeinsame Merkmal der gesamten Reihe von Phyllinen. Aus den magnesiumhaltigen mehrbasischen und einbasischen Karbonsäuren gehen durch Abspaltung des Metalls magnesiumfreie Karbonsäuren hervor, die Porphyrine, die mit dem von Hoppe-Seyler, Tschirch, Schunck und Marchlewski untersuchten, wenn auch noch nicht homogen erhaltenen Phylloporphyrin eine natürliche Gruppe bilden; sie sind Karbonsäuren des Kernes $C_{31}H_{36}N_4$.

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 bekannt gewordene wichtige Funktion des Metalls sollte mehr Aufmerksamkeit der Agrikulturchemiker auf die Frage lenken, ob die natürliche Versorgung der Nutzpflanzen mit Magnesium ausreicht. In einer ganz neuen Arbeit hat E. Mameli im botanischen Institut von Pavia den günstigen Einfluss eines Zusatzes von Magnesiumsalz bei verschiedenartigen Kulturen auf Chlorophyll und Wachstum untersucht.

Die Reaktion der Säuren mit Chlorophyll liess sich auf Grund der Entdeckung verfolgen, dass bei der gelinden Zersetzung mit Oxalsäure ein in Alkohol schwer lösliches Chlorophyllderivat, Phäophytin, in geradezu reinem Zustand und fast quantitativ aus weingeistigen Blattextrakten ausfällt. An die Stelle des umständlichen und wenig ergiebigen Verfahrens, nach welchem Hoppe-Seylers Chlorophyllan als Produkt unbeabsichtigter Spaltung des Farbstoffs durch pflanzliche Säure erhalten worden, tritt eine Methode, welche das Chlorophyll irgendwelcher Herkunft in zum Vergleich wohlgeeignetem Zustand abzuscheiden erlaubt. Das Phaeophytin enthält

kein Magnesium mehr, die Abspaltung des Metalls 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, z. B. Zink oder Kupfer, einführt, wobei dieses komplex gebunden wird.

Zur Gewinnung von Phäophytin, und zwar kilogrammweise, dient im hiesigen Laboratorium zumeist das Mehl getrockneter Brennesseln, das in Fässern zu 900 bis 1000 Fr. für die Tonne von deutschen Drogenhandlungen bezogen wird. 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 Zustand 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.

Die Erkenntnis, dass dieses Phytol ein konstanter Bestandteil des Chlorophylls ist, 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 Prozent, 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 sogenanntes „kristallisiertes Chlorophyll“, das von dem russischen Botaniker Borodin im Jahre 1881 in Blattschnitten unter dem Mikroskop entdeckt worden war. Monteverde in St. Petersburg hatte zu Anfang der neunziger

Jahre das kristallisierte Chlorophyll spektroskopisch untersucht. Er unterschied zwei Arten von Chlorophyll, kristallisiertes und amorphes, und betrachtete ersteres als das natürliche Pigment, das letztere als ein Umwandlungsprodukt. Diese Ansicht erkennen wir jetzt als irrtümlich. Das phytolfreie kristallisierte Chlorophyll ist nur ein Abkömmling des phytolhaltigen natürlichen Pigmentes, das infolge des Gehalts an dem hochmolekularen Alkohol eine mehr wachsähnliche Konsistenz zeigt.

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

Die Bildung des kristallisierten Chlorophylls und das damit Hand in Hand gehende Fehlen des Phytols hat in den letzten Jahren vollständige Erklärung gefunden durch eine von mir gemeinsam mit A. Stoll ausgeführte Untersuchung. Den Schlüssel für viele rätselhafte Erscheinungen hat nämlich die Beobachtung geliefert, 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 Alkohololyse 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 „kristallisierten 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 Kohlensäure, Chlorophyllid.

Umgekehrt ist 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.

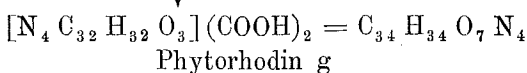
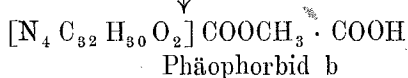
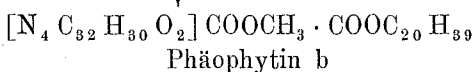
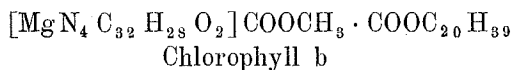
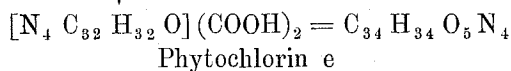
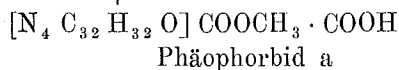
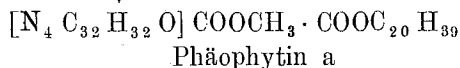
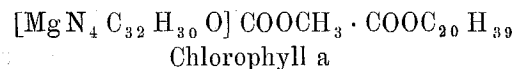
Für den Vergleich der verschiedenen Pflanzen kommt nun zu den beiden ersten Merkmalen, dem Magnesium und dem Phytol, die genauere Untersuchung des Phytochrominkernes, der bei der Ver-

seifung des Phäophytins in Form hochmolekularer, stickstoffhaltiger Karbonsäuren auftritt. Anfangs hat die Untersuchung zu einer grossen Zahl verschiedener Spaltungsprodukte geführt, die zwei Gruppen angehören: die einen, Phytochlorine, sind in indifferenten Lösungen 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 worden, 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 " " " $C_{34}H_{34}O_7N_4$

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 durch Säure und Alkali konnte durch den Zerfall eines grösseren Moleküls in zwei Bruchstücke bedingt sein, oder dadurch, dass eines einen früheren, das zweite einen folgenden Zustand des Abbaus repräsentiert. Diese Erklärungen werden den Beobachtungen nicht gerecht, vielmehr ist es bewiesen worden, dass das Chlorophyll, in folgedessen auch das Phäophytin stets ein Gemisch aus zwei Komponenten ist, von denen die eine das Phytochlorin e, die andere Phytorhodin g beim Abbau liefert. Die eine Komponente, sie soll als Chlorophyll a bezeichnet werden, ist blaugrün, die zweite, Chlorophyll b, gelbgrün. Der Abbau zum Chlorin und Rhodin wird durch folgende Formeln kurz skizziert:



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 geschieden, 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 Masstab mittels fraktionierter Adsorption aus seinen Lösungen. Während es aber bisher schlechterdings unmöglich war, zu prüfen, ob nicht bei der Extraktion und bei den Trennungsoperationen erst eine Änderung des Farbstoffes erfolgt, ermöglicht jetzt der Abbau zu den typischen Spaltungsprodukten den Nachweis des unveränderten Phytochromins. Erst da die chemischen Merkmale des Chlorophylls genügend bekannt sind, kann zwischen der lange fast vergessenen

Hypothese von Stokes und vielen entgegenstehenden Anschauungen, wie den Angaben von Etard über die unendliche Variabilität des Chlorophylls, die Entscheidung erbracht werden. Die chemische Kennzeichnung des Chlorophylls ist die Voraussetzung gewesen, um das Chlorophyll in unverändertem und reinem Zustand 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 quantitativen kolorimetrischen Bestimmung des Reinheitsgrades seiner Lösungen und auf ihrer systematischen Steigerung durch eine im Wesen neue Anwendung des alten Entmischungsverfahrens. Die Verteilung der in den Extrakten enthaltenen Stoffe zwischen mehreren miteinander nicht mischbaren Lösungsmitteln (Holzgeist-Petroläther) geschieht nämlich hier fürs erste nicht, um die optisch differierenden Komponenten zu entmischen, sondern um die gelben und noch mehr die farblosen Begleiter des Chlorophylls abzutrennen. Aus Extrakten, die infolge der grossen Menge von farblosen Begleitstoffen nur 8- bis 16prozentiges Chlorophyll enthalten, gehen Lösungen von zirka 70prozentigem Chlorophyll durch die Entmischungsoperationen hervor. Dann endlich verhilft eine unerwartete Beobachtung zur Lösung der Aufgabe. Wenn das Chlorophyll einen gewissen Reinheitsgrad erreicht hat, ist es zwar noch in alkoholhaltigem Petroläther leicht löslich, aber überraschender Weise nicht mehr in reinem Petroläther. Wenn man durch Waschen den Äthyl- oder Methylalkohol entfernt, scheidet sich das Chlorophyll aus und es kann durch Umscheiden aus Äther mit Petroläther gereinigt werden.

Anfangs war dieses Verfahren mühsam und die Ausbeute gering. In unveröffentlichten Versuchen ist durch Abänderungen in der Extraktion und der Entmischung das Verfahren vervollkommen worden, so dass man ohne grosse Mühe aus einigen Kilogrammen Brennesselmehl das vollkommen reine Chlorophyll in ein paar Stunden mit einer Ausbeute von gegen 80 Prozent der gesamten Menge isolieren kann. 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 lässt sich aus $\frac{1}{4}$ kg frischer Brennesselblätter $\frac{1}{4}$ g vollkommen reines Chlorophyll isolieren; man kann mit mehr Zeitaufwand $2\frac{1}{2}$ 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.

Eine Schwierigkeit bei dieser Reindarstellung des grünen Pigmentes hat die Abtrennung der gelben Begleiter geboten. Borodin und nach ihm andere Botaniker haben dieselben in zwei Gruppen eingeteilt, von denen die eine die in Benzin leicht, in Alkohol schwer löslichen gelben Pigmente umfasst, die zweite die in Benzin unlöslichen, in Alkohol löslichen. Der in Benzin leicht lösliche Farbstoff ist, was Arnaud wahrscheinlich gemacht hat, identisch mit dem Carotin der Möhre. Unsere Analyse hat ergeben, dass es ein ungesättigter Kohlenwasserstoff von der Formel $C_{40}H_{56}$ ist. Auch der kristallisierende Repräsentant der zweiten Gruppe, das Xanthophyll, konnte isoliert werden. Er unterscheidet sich in der Zusammensetzung vom Carotin nur durch das Plus von zwei Atomen Sauerstoff. Beide gelbe Pigmente zeichnen sich durch ihre grosse Affinität zum Sauerstoff aus, den sie gierig absorbieren.

Wenn wir bei dem Entmischungsprozess zur Isolierung des Chlorophylls die verschiedenen Fraktionen durch den Abbau zum Phytochlorin und Phytorhodin analysieren, so beobachten wir die ungleiche Verteilung der zwei Chlorophyllkomponenten zwischen Methylalkohol und Petroläther. Die systematische Fraktionierung hat in einer unveröffentlichten Arbeit zu dem Ergebnis geführt, dass sich das Komponentenverhältnis mehr und mehr verschob und endlich so weit, dass aus dem Gemisch die ganz einheitlichen Komponenten hervorgingen. Aus der gereinigten petrolätherischen Lösung des Gesamtchlorophylls erhielt man nach zwanzig Ausschüttlungen mit wasserhaltigem Holzgeist in der petrolätherischen Schicht das blaugrüne Chlorophyll a und in der holzgeistigen Lösung nach weiteren Entmischungsvorgängen das vergleichsweise gelbstichig grüne Chlorophyll b.

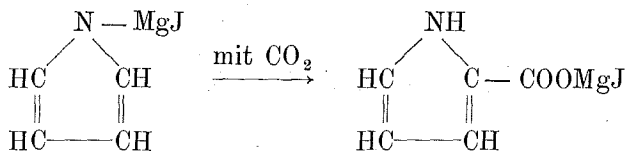
Die Analyse der getrennten Komponenten hat ergeben, dass beide in gleichem Prozentbetrag Magnesium und Phytol enthalten. Die Zusammensetzung des Komponenten ist trotz ihrer optischen Verschiedenheit sehr ähnlich. Der Unterschied besteht in einer verschiedenen Oxydationsstufe. Am Chlorophyll selbst und an den kristallisierten Chlorophylliden bestätigt sich, was die Formeln von Phytochlorin e und Phytorhodin g ausgesagt haben: die Verbindungen der Reihe b leiten sich von a wahrscheinlich dadurch ab, dass zwei Atome Wasserstoff durch ein Atom Sauerstoff ersetzt werden. 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_2 auch CO_2 sein und das würde für die Erklärung der chemischen Rolle des Chlorophylls sehr viel ausmachen. Die Beziehung zwischen den beiden Komponenten kann erst als festgestellt gelten, seitdem in einer unveröffentlichten Arbeit von L. Forsén vor kurzem die Umwandlung der Komponente b in eine Verbindung der Reihe a mittels eines gelinden Reduktionsverfahrens erzielt worden ist. Das Chlorophyll besteht also aus zwei Oxydationsstufen eines und desselben Kernes.

Um das Gewichtsverhältnis der beiden Komponenten zu bestimmen, ist eine quantitative Methode geschaffen worden, die auf der Überführung des Chlorophylls in Phytochlorin und Phytorhodin und der kolorimetrischen Bestimmung dieser Spaltungsprodukte durch Vergleich mit Lösungen von bekanntem Gehalt beruht. Dabei ist es notwendig, mit quantitativer Ausbeute beim Extrahieren und den folgenden Operationen zu arbeiten, um Verschiebungen in dem Verhältnis von a:b zu verhüten. Dieses Verhältnis scheint ziemlich annähernd konstant zu sein, unabhängig von der untersuchten Pflanzenart und den Lebensbedingungen der Pflanze. Im Mittel von 24 Versuchen finden wir 2.5(7) Mole Chlorophyll a auf 1 Mol Chlorophyll b, die mittleren Abweichungen von diesem Durchschnittswerte betragen gegen 10 Prozent, die grössten Abweichungen von ± 0.4 liegen vielleicht noch innerhalb der Fehlergrenzen unserer Bestimmungen.

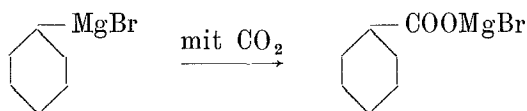
Auf Grund der geschilderten analytischen Untersuchung des grünen Pigmentes lässt sich schon heute der Versuch machen, von der chemischen Funktion des Chlorophylls eine Vorstellung zu entwickeln.

Wir können uns die Rolle des Magnesiums ähnlich wie in den von Barbier und Grignard entdeckten Organomagnesiumverbindungen denken, die bekanntlich in der organischen Synthese infolge ihrer ausserordentlichen Reaktionsfähigkeit die grösste Wichtigkeit erlangt haben. Diese Ansicht, die ich gelegentlich der Veröffentlichung des Magnesiumgehaltes von Chlorophyll geäussert habe, ist bei den Fachgenossen auf Widerspruch gestossen, weil man als das Wesentliche der Barbier-Grignardschen Magnesiumverbindungen die Bindung von Magnesium an Kohlenstoff betrachten wollte, indessen mit Unrecht, wie das Beispiel des im Jahre 1909 von Oddo untersuchten Pyrrolmagnesiumjodids zeigt, das mit Kohlendioxyd unter Bindung desselben an Kohlenstoff reagiert:



Dies ist eine ähnliche Erscheinung wie die Methylierung des Natracetessigesters am Kohlenstoff.

Die Magnesiumverbindung mit Magnesium am Stickstoff zeigt also dieselbe Reaktionsfähigkeit wie die Grignardschen Verbindungen mit Magnesium an Kohlenstoff, z. B. bei der Carbonsäuresynthese:



und es kann wohl keine scharfe Grenze zwischen Magnesiumphenyljodid, Pyrrolmagnesiumjodid und Chlorophyll gezogen werden.

Dieser Vergleich fordert nicht, dass das Chlorophyll die Kohlensäure seinem Molekül einverleibe; dies wird verhindert durch die Substitutionen in den Pyrrolkernen. Vielmehr lässt sich die Funktion des Chlorophylls heute so denken, dass die Affinität der Magnesiumverbindung zur Kohlensäure diese in den Wirkungsbereich der reaktionsfähigen Gruppen des Moleküls zieht und dass die Chlorophyllkomponente a die Reduktion der Kohlensäure in einem Prozesse bewirkt, auf welchen die von dem Farbstoff absorbierte Lichtenergie übertragen wird. Das Chlorophyll a oxydiert sich dabei zum Chlorophyll b. Das Chlorophyll b wird durch Abspaltung von Sauerstoff wieder in das Chlorophyll a zurückverwandelt, und es stellt sich zwischen beiden Komponenten ein Gleichgewichtszustand ein.

Es ist möglich, aber nicht wahrscheinlich, dass diese Abspaltung von Sauerstoff direkt aus der Komponente b erfolgt. Eher kann man sich die Rückverwandlung unter Beteiligung der gelben Pigmente Carotin und Xanthophyll vorstellen, welche die grünen Farbstoffe in den Chlorophyllkörpern konstant begleiten und daher wohl durch eine Funktion verbunden sind mit dem grünen Pigment. Vielleicht ist ihre Funktion die Regulierung des Verhältnisses der Komponenten a und b, etwa in der Weise, dass Carotin dem Chlorophyll b Sauerstoff entzieht, wobei es sich zu einem Xanthophyll oxydiert und dass dieses unter der Wirkung eines katalase- oder reduktaseähnlichen Enzyms freien Sauerstoff entbindet.

Es ist das Ziel für die künftige Fortsetzung der Untersuchung, 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.