

## Mitteilungen.

### 407. Richard Willstätter: Über Pflanzenfarbstoffe.

[Vortrag, gehalten in der Deutsch. Chemisch. Gesellschaft am 25. April 1914.]

(Eingegangen am 21. Oktober 1914.)

Am Anfang des vorigen Jahrhunderts war die organische Chemie die Lehre von den Stoffen der Pflanzen- und Tierwelt. Erst am Ende des dritten Dezenniums und in den folgenden begannen die Arbeiten von Wöhler, von Frankland und von Berthelot die organische Synthese zu begründen und der Chemie neue Aufgaben und weite Gebiete zu erschließen. Es war um die Mitte des Jahrhunderts, als aus den Gedanken und Forschungen von Gerhardt, Williamson, Kolbe und besonders von Kekulé die Strukturchemie herauswuchs, deren Erfolg die Ausdehnung und die Ordnung der Reihen organischer Verbindungen gewesen ist. Die Benzolformel von Kekulé hat die systematische Bearbeitung der aromatischen Verbindungen angebahnt und organisiert und die fruchtbare Wechselbeziehung zwischen der wissenschaftlichen Erforschung und der Industrie der Teerprodukte eingeleitet.

Auch auf die Kenntnis pflanzlicher Stoffe hat die Begründung der aromatischen Chemie einen merkwürdigen Einfluß ausgeübt. Die beiden wichtigsten vegetabilischen Farbstoffe sind in berühmten Arbeiten auf Bestandteile des Steinkohlenteers durch Abbau zurückgeführt und aus technisch zugänglichen aromatischen Verbindungen synthetisch gewonnen worden: Alizarin von Graebe und Liebermann, Indigo durch v. Baeyer, dann durch Heumann.

In den letzten Jahrzehnten hat sich das Bild der organischen Chemie verändert. Die möglichen Typen organischer Verbindungen sind beschrieben, die wichtigen Reihen mit beinahe ausreichender Vollständigkeit untersucht, die Wege der Synthese und der Umformung vervollkommenet, neue Methoden und Hilfsmittel der physikalischen Chemie für die Lösung von Konstitutionsfragen nutzbar gemacht.

Zu gleicher Zeit aber erweitert sich wieder das Gebiet der organischen Chemie durch das Studium der Naturprodukte, der Kohlehydrate, der Purinderivate, der Terpene und anderer Riechstoffe, des Kautschuks, der Alkaloide, der vegetabilischen Beizenfarbstoffe, der Gerbstoffe. Besonders sind es die Meisterarbeiten über Eiweißstoffe, durch die der pflanzlichen und tierischen Welt große neue Gebiete

schwierig zu erforschender Stoffe abgerungen werden. Ein bedeutender Zuwachs organischer Verbindungen wird nämlich geliefert durch hochmolekulare, kompliziert aufgebaute, durch nicht krystallisierende, durch leicht veränderliche Stoffe.

Die organische Chemie wird wieder mehr in die Richtung der physiologischen Chemie geleitet. Diese neuere Entwicklung führt dazu, analytisch in die Chemie der Zelle tiefer einzudringen und dadurch mit neuen Anregungen die synthetische Chemie zu beleben.

Von dieser Absicht sind einige Untersuchungen beeinflusst, die ich in den letzten Jahren mit einer Schar vortrefflicher Mitarbeiter ausgeführt habe. Ich folge der ehrenvollen Einladung des Vorstandes unserer Gesellschaft, in einem zusammenfassenden Vortrage darüber zu berichten, nicht leichten Herzens; denn ich kann Ihnen noch keine reifen Früchte abgeschlossener Untersuchungen darbieten, sondern nur Unvollständiges, wenn ich von zwei Kapiteln aus der Chemie der Pflanzenfarbstoffe berichte, von den Pigmenten der Blätter und von den Farbstoffen der Blüten und Beerenfrüchte.

Die einzelnen Abschnitte der Untersuchung haben nur in technischer Hinsicht ein Gemeinsames darin, daß die präparative Arbeit und die analytische Behandlung des Stoffes in besonderem Maße in den Vordergrund treten. Einen konstitutionellen Zusammenhang hat vor 55 Jahren eine Hypothese von Hlasiwetz<sup>1)</sup> gesucht, der in den Anthocyanen Derivate der gelben Beizenfarbstoffe und im Chlorophyll ein Eisensalz einer verwandten farblosen oder schwach farbigen Verbindung vermutet hat. Aber eine solche Beziehung zwischen Chlorophyll und Anthocyan hat sich nicht ergeben.

### Über Chlorophyll<sup>2)</sup>.

#### Die Methode der Untersuchung.

Vor einigen Jahren war Chlorophyll als Substanz in chemischer Hinsicht unbekannt. Es war zweifelhaft, ob es ein Chlorophyll gäbe oder mehrere ähnliche Pigmente oder eine große Anzahl grüner Blattfarbstoffe. Die ersten Fragen der Analyse harrten der Lösung; es war noch unentschieden, welche Elemente dem Molekül des Chlorophylls angehören. Durch die Untersuchungen von F. Hoppe-

<sup>1)</sup> Sitzungsberichte der mathematisch-naturwissenschaftlichen Klasse der K. Akademie der Wissenschaften (Wien) **36**, 401 [1859].

<sup>2)</sup> Eine ausführlichere zusammenfassende Darstellung ist von R. Willstätter und A. Stoll veröffentlicht worden in den »Untersuchungen über Chlorophyll«, Berlin 1913, Verlag von J. Springer.

Seyler<sup>1)</sup>, E. Schunck und L. Marchlewski<sup>2)</sup> und M. Nencki<sup>3)</sup> war im wesentlichen die Tatsache ermittelt, daß der Abbau des Chlorophylls zu Pyrrolderivaten führt, die mit Abkömmlingen des Blutfarbstoffs verwandt sind.

Seit einigen Versuchen von Hoppe-Seyler<sup>4)</sup> und von A. Gautier<sup>5)</sup> (1879) war die Isolierung des Chlorophylls von den Chemikern nicht mehr angestrebt worden, und sie erschien zunächst aussichtslos wegen der Veränderlichkeit, der chemischen Indifferenz und der Leichtlöslichkeit des mit so vielen farblosen und gelben Begleitern verdünnten Farbstoffs. Es ist aber möglich gewesen, ohne das Chlorophyll selbst zu untersuchen, die Eigentümlichkeiten seiner Konstitution aus der Betrachtung der Derivate abzuleiten, die bei der Reaktion mit Säure und mit Alkali entstehen.

Die beiden Mittel wirken augenfällig verschieden auf Chlorophyll ein, und die Ergebnisse der beiden Abbauverfahren vermögen einander zu ergänzen.

Wenn man Alkalihydroxyd auf Chlorophyll einwirken läßt, so wird es in Salze verwandelt, deren Farbe noch chlorophyllgrün ist. 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.

Es ist ein anderer Teil des Moleküls, auf den sich die gelinde Einwirkung von Säure richtet. Die Chlorophyllfarbe schlägt dabei in Oliv um, zugleich wird die Fluorescenz abgeschwächt; 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 verschonen 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

<sup>1)</sup> H. 3, 339 [1879]; 4, 193 [1880]; 5, 75 [1881].

<sup>2)</sup> Die Arbeiten von E. Schunck und L. Marchlewski sind vollständig referiert in den drei Monographien von L. Marchlewski: Die Chemie des Chlorophylls, Hamburg 1895; Artikel »Chlorophyll« in Roscoe-Schorlemmer-Brühl 3, 848 [1901]; Die Chemie der Chlorophylle, Braunschweig 1909.

<sup>3)</sup> B. 29, 2877 [1896]; M. Nencki und J. Zaleski, B. 31, 997 [1901]; M. Nencki und L. Marchlewski, B. 34, 1687 [1901].

<sup>4)</sup> H. 3, 339 [1879]. <sup>5)</sup> C. r. 89, 861 [1879].

zerstört wird. Gemäß diesem leitenden Gedanken war es möglich<sup>1)</sup>, 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 den Verseifungsprodukten anderer in den Lösungen enthaltener Stoffe einigermaßen rein abtrennen. Aus ihrer ätherischen Lösung wurden sie von Dinatriumphosphat aufgenommen und mit Mononatriumphosphat wieder daraus entbunden. Sie haben sich bei der Analyse als Magnesiumverbindungen erwiesen<sup>2)</sup>. Das Metall befindet sich in ihnen am Stickstoff, und zwar in komplexer Bindung. Die magnesiumhaltige Gruppe ist sehr empfindlich gegen Säure, aber sie ist ungemein beständig gegen Alkalien. Infolgedessen bleibt sie bei tiefgreifenden Umwandlungen der Moleküle unversehrt, durch die sogar Carboxylgruppen, eine nach der andren, abgespalten werden. Der Nachweis des Magnesiums und der angenommenen Bindungsweise desselben hat durch die fortgesetzte Einwirkung der Alkalien Bestätigung gefunden<sup>3)</sup>, nämlich durch den Abbau der Chlorophylline beim Erhitzen mit konzentrierten, alkoholischen Alkalien bis auf 240°. Dabei tritt eine Reihe gut krystallisierender, farbenprächtiger und intensiv fluoreszierender Abbauprodukte auf mit drei, zwei und schließlich einer Carboxylgruppe, die sogen. 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, krystallisiertem Zustande dargestellt haben, sind magnesiumhaltig und dabei freie Säuren.

Die Annahme des vom Magnesium mit den stickstoffhaltigen Ringen gebildeten Komplexes ist noch in den letzten Jahren Zweifeln begegnet; aber sie ist vor kurzem einwandfrei bewiesen worden<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> R. Willstätter, Verhandlungen der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte, 78. Versammlung zu Stuttgart 1906, II, 1. Hälfte, 123. — R. Willstätter und F. Hocheder, A. **354**, 205 [1907].

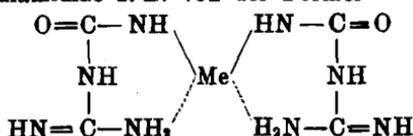
<sup>2)</sup> R. Willstätter, A. **350**, 48 [1906].

<sup>3)</sup> R. Willstätter und A. Pfannenstiel, A. **358**, 205 [1907]; R. Willstätter und H. Fritzsche, A. **371**, 33 [1909]; R. Willstätter und M. Utzinger, A. **382**, 129 [1911]; R. Willstätter, M. Fischer und L. Forsén, A. **400**, 147 [1913].

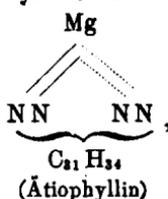
<sup>4)</sup> R. Willstätter und M. Fischer, A. **400**, 182 [1913].

durch den Abbau der Phylline zur carboxylfreien Stammsubstanz, dem Ätiophyllin, dessen Zusammensetzung durch die Formel  $C_{21}H_{34}N_4Mg$  ausgedrückt wird. Der Aschegehalt ist hier infolge der Verkleinerung des Moleküls auf 8% Magnesiumoxyd gestiegen. Hier sind, abgesehen von den Valenzen des Kohlenstoffs, nur noch stickstoffhaltige Gruppen zur Verfügung, nämlich vier Stickstoffatome, um das Magnesium mit zwei Valenzen zu binden und mit Nebervalenzen komplex zu befestigen. Die Konstitution der übrigen Phylline ist analog; die Sauerstoffatome, nämlich die Carboxylgruppen, haben keinen Anteil an der Bindung des Metallkomplexes.

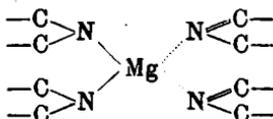
Diese Vorstellung mag in Übereinstimmung mit den Anschauungen von A. Werner<sup>1)</sup> über die Konstitution von komplexen Metallverbindungen und in Analogie mit den von H. Ley<sup>2)</sup> und von L. Tschugaeff<sup>3)</sup> erforschten Metallderivaten der Säure-imide, des Biurets und des Dicyandiamidins z. B. von der Formel



einen Ausdruck erhalten<sup>4)</sup>, nach welchem sich in den zwei Valenzen, die von dem Stickstoff zweier Pyrrolkerne ausgehen, die Affinität des Magnesiums nicht erschöpft; durch Partialvalenzen verbindet es sich noch mit zwei andren Pyrrolstickstoffen zum Komplex:



oder ausführlicher:



Der Magnesiumgehalt des Chlorophylls ist konstant<sup>5)</sup>. Er ist mit ausnahmsloser Übereinstimmung bei Land- und Wasserpflanzen der

<sup>1)</sup> Neuere Anschauungen auf dem Gebiete der anorganischen Chemie, 3. Auflage, Braunschweig 1913.

<sup>2)</sup> B. 40, 705 [1907].    <sup>3)</sup> B. 40, 1973 [1907].

<sup>4)</sup> R. Willstätter und H. Fritzsche, A. 371, 33 [1909].

<sup>5)</sup> R. Willstätter und A. Pfannenstiel, A. 358, 205 [1907]; R. Willstätter und H. J. Page, A. 404, 237 [1914].

verschiedenen Klassen ermittelt worden. Daß die Magnesia als Mineralbestandteil der Pflanze unentbehrlich ist, war lange bekannt; aber eine bestimmte Funktion des Metalls ist dadurch erst festgestellt worden. Da es sich nicht um einen katalytischen Einfluß handelt, wie er dem Eisen für die Chlorophyllbildung zugeschrieben wird, sondern um eine stöchiometrische Beteiligung des Magnesiums am Aufbau des Chlorophylls, so ist die Aufmerksamkeit der Agrikulturchemiker auf die Frage hinzulenken, ob die natürliche Versorgung der Nutzpflanzen mit Magnesium ausreicht. Die Wirkung eines Zusatzes von Magnesiumsalz bei verschiedenartigen Kulturen auf Chlorophyllbildung und Wachstum hat vor kurzem E. Mameli<sup>1)</sup> im botanischen Institut zu Pavia untersucht; dabei ist ein günstiger Einfluß des Magnesiumzusatzes zutage getreten.

Die sämtlichen Phylline verlieren unter der Einwirkung von Mineralsäuren und auch schon von Essigsäure das Magnesium; die Carbonsäuren der Phyllinreihe gehen dadurch in mehrbasische und einbasische Aminosäuren über, die außer den sauren auch charakteristische basische Eigenschaften aufweisen. Sie bilden eine natürliche Gruppe mit dem von F. Hoppe-Seyler<sup>2)</sup> entdeckten, dann von A. Tschirch<sup>3)</sup>, sowie von E. Schunck<sup>4)</sup> und L. Marchlewski<sup>5)</sup> untersuchten, aber nicht einheitlich erhaltenen Phylloporphyrin. Daher werden sie als Porphyrine bezeichnet und zwar mit demjenigen Präfixum, das dem entsprechenden Phyllin zukommt. Aus dem sauerstofffreien Ätiophyllin entsteht das einfachste Porphyrin, Ätioporphyrin<sup>6)</sup> von der Formel  $C_{31}H_{26}N_4$ .

Entsprechend dem Verhalten der Phylline gegen Säure, ist auch die Einwirkung der Säuren auf die Lösungen von Chlorophyll selbst zu verstehen. Für die Verfolgung der Reaktion war die Beobachtung<sup>7)</sup> grundlegend, daß bei der gelinden Zersetzung mit Oxalsäure ein in Alkohol schwer lösliches Chlorophyllderivat frei von farblosen und gelben Begleitstoffen fast quantitativ aus weingeistigen Blätterextrakten ausfällt; es ist Phäophytin genannt worden. Es enthält kein

<sup>1)</sup> Atti della Soc. Ital. per il Progr. d. Scienze 5, 793 [1911]; Atti dell' Ist. Bot. dell' Università di Pavia, Serie II, 15, 1 [1912].

<sup>2)</sup> H. 4, 193 [1880].

<sup>3)</sup> Untersuchungen über das Chlorophyll 1884, S. 84; Ber. d. D. Bot. Ges. 14, 86 [1896]; B. 29, 1766 [1896].

<sup>4)</sup> Proc. Roy. Soc. 50, 302 [1891].

<sup>5)</sup> E. Schunck und L. Marchlewski, A. 284, 81 [1894]; Proc. Roy. Soc. 57, 314 [1895].

<sup>6)</sup> R. Willstätter und M. Fischer, A. 400, 182 [1913].

<sup>7)</sup> R. Willstätter und F. Hocheder, A. 354, 205 [1907].

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 der Arbeit ergeben haben<sup>1)</sup>.

Das Phäophytin erinnert an die Präparate, welche im Jahre 1879 F. Hoppe-Seyler<sup>2)</sup> und zu gleicher Zeit A. Gautier<sup>3)</sup> als Produkt unbeabsichtigter Zersetzung des Chlorophylls durch die in den Extrakten enthaltenen Pflanzensäuren erhalten haben. Diese älteren Präparate<sup>4)</sup> waren aber nicht frei von Begleitstoffen und nicht unversehrt in den leicht veränderlichen Atomgruppen des Farbstoffmoleküls. Hoppe-Seyler fand in einem solchen Präparate, dem Chlorophyllan, einen Phosphorgehalt von 1.4% und kam dadurch zu der Vermutung, Chlorophyll zähle zu den Lecithinen. Die von Hoppe-Seyler vorsichtig geäußerte Hypothese wird bis zum heutigen Tage von J. Stoklasa<sup>5)</sup> heftig verfochten, der im Chlorophyll Phos-

<sup>1)</sup> R. Willstätter und M. Isler, A. 380, 154 [1911] und A. 390, 269 290, 304 [1912].

<sup>2)</sup> H. 3, 339 [1879].

<sup>3)</sup> C. r. 89, 861 [1879]. — A. Gautier vertritt die Ansicht (Bl. [4] 5, 319 [1909]), daß sein Präparat reines Chlorophyll in kristallisiertem Zustand gewesen sei. Die veröffentlichten Analysen stehen aber dieser Erklärung im Wege.

	Chlorophyll nach Gautier	Chlorophyll (a + b) nach Willstätter und Stoll	Äthyl-chlorophyllid (kryst. Chlorophyll nach Borodin)
C	79.97	73.53	68.57
H	9.80	8.09	5.97
N	4.15	6.14	8.80
Asche, Phosphate	1.75	Asche = MgO 4.33	Asche = MgO 5.92

Das Präparat von Gautier besaß übrigens saure Eigenschaften. Vom kristallisierten Chlorophyllid nach Borodin ist es durch seine Leichtlöslichkeit in Äther und in Petroläther, vom Chlorophyll auch durch seine Löslichkeit in Petroläther verschieden. Der niedrige Aschengehalt beweist, daß das Chlorophyll durch Pflanzensäure zerstört war; der Gehalt an Phosphor läßt erkennen, daß es Beimischungen enthalten hat.

<sup>4)</sup> Vergl. R. Willstätter und M. Isler, A. 390, 287 und 337 [1912].

<sup>5)</sup> Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 26, 69 [1907] und 27, 10 [1909]; Mitt. d. Kalisyndikates IV, 73 und 85 [1908]; J. Stoklasa, J. Šebor und E. Senft Beihefte z. Bot. Zentralbl. 30, Erste Abt., Heft 2, 167 [1913]. Die Angaben von Stoklasa über die Zusammensetzung des Chlorophylls sind unrichtig, sie können nur auf der Analyse ganz unreiner Präparate beruhen. Ich habe weder in den Chlorophyllderivaten noch im Chlorophyll selbst Phosphor oder Kalium gefunden.

phor und Kalium findet und zwar noch mehr Phosphor als im Lecithin.

An die Stelle des umständlichen und unsicheren Weges, der zum Chlorophyllan geführt hatte, tritt eine Methode, welche das Chlorophyll irgend welcher Herkunft in der Form eines reinen Derivates abzuschneiden erlaubt. Man kann es mit den Hilfsmitteln des Laboratoriums kilogrammweise gewinnen; das Mehl getrockneter Brennesselblätter ist dafür ein geeignetes Ausgangsmaterial. (Ausbeute aus 1 kg: 4—6.5 g Phäophytin.)

Das Phäophytin ist eine wachsartige Substanz ohne saure Eigenschaften und von sehr schwach basischer Natur. In der Farbe seiner Lösungen ist es ganz verschieden von Chlorophyll; mit einem Schlage aber wird dieses Spaltungsprodukt dem Chlorophyll wieder ähnlich, sobald man in sein Molekül ein Metall einführt, das komplexe Bindung eingeht<sup>1)</sup>. Manche Metalle treten sehr leicht ein, z. B. Kupfer und Zink bei der Einwirkung ihrer essigsauren Salze auf die alkoholische Lösung von Phäophytin. Die Komplexbildung ist eine so augenfällige Erscheinung, daß man die geringsten Spuren gewisser Metalle mit Hilfe von Chlorophyllderivaten nachweisen kann. Viel schwieriger war es wegen der Säureempfindlichkeit des Magnesiumkomplexes, auch das Magnesium wieder einzuführen. Dies ist schließlich erreicht worden<sup>2)</sup> bei der Einwirkung von Grignardscher Lösung, z. B. von Methylmagnesiumjodid auf Phäophytin oder auf Porphyrine. Ein zweites Verfahren<sup>3)</sup>, die Einwirkung von Magnesiumoxyd und Alkali in der Hitze, ist zwar für die Rückbildung des Chlorophylls wegen dessen Unbeständigkeit gegen Alkali nicht anwendbar, aber sehr geeignet für die Bildung der Phylline aus den Porphyrinen. Ebenso ließ sich Eisen durch Erhitzen mit methylalkoholischer Kalilauge und Eisenoxyd in die Porphyrine einführen<sup>4)</sup>.

Das Phäophytin<sup>5)</sup> erweist sich bei der Verseifung mit Alkalien als ein Ester; es liefert dabei neben hochmolekularen stickstoffhaltigen Säuren mit 34 Kohlenstoffatomen einen stickstofffreien Alkohol mit zwanzig Kohlenstoffatomen, den Willstätter und Hocheder aufgefunden und Phytol genannt haben. Dieses entspricht der Formel  $C_{20}H_{38}.OH$ , es ist ein ungesättigter primärer Alkohol mit offener

<sup>1)</sup> R. Willstätter und F. Hocheder, A. 354, 208 [1907]; R. Willstätter und M. Utzinger, A. 382, 170 und 189 [1911]; R. Willstätter, A. Stoll und M. Utzinger, A. 385, 180 [1911].

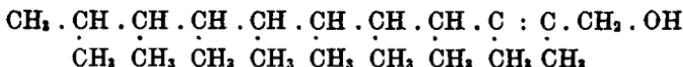
<sup>2)</sup> R. Willstätter und L. Forsén, A. 396, 180, 189 [1913].

<sup>3)</sup> R. Willstätter und L. Forsén, A. 396, 186 [1913].

<sup>4)</sup> R. Willstätter und M. Fischér, H. 87, 482 [1913].

<sup>5)</sup> R. Willstätter und F. Hocheder, A. 354, 205 [1907].

Kette von Kohlenstoffatomen. Untersuchungen<sup>1)</sup> über seinen Abbau haben es wahrscheinlich gemacht, daß sein Kohlenstoffgerüst stark verzweigt ist; von seiner Struktur mag folgende freilich in ihren Einzelheiten hypothetische Konstitutionsformel ein vorläufiges Bild geben:



Es ist nicht unwahrscheinlich, daß Beziehungen bestehen zwischen dem Isopren, dem wohlbekannten Baustein der Terpene und des Kautschuks, und dieser alkoholischen Komponente des Chlorophylls.

Das durch die Säure gebildete Chlorophyllderivat hat also den gesuchten Aufschluß gegeben über die hauptsächlichliche Änderung, welche die Alkalien an dem Molekül des Chlorophylls bewirken; sie verseifen die Phytolstergruppe. Ihre Wirkung beschränkt sich aber nicht darauf; das Phäophytin, folglich das Chlorophyll, enthält nämlich ferner eine Gruppe  $\cdot\text{COOCH}_3$ , die an zweiter Stelle der Hydrolyse anheimfällt.

Außer der Änderung der zwei Estergruppen erfolgt bei der Einwirkung der Alkalien noch eine eigentümliche Umwandlung, die sich durch einen merkwürdigen Farbumschlag verrät, durch die sogenannte braune Phase<sup>2)</sup>. Die Lösung von Phäophytin wie von Chlorophyll wird beim Versetzen mit methylalkoholischem Kali intensiv braun, dann kehrt in einigen Minuten die ursprüngliche Farbe der Flüssigkeit zurück. Beim Stehen in alkoholischer Lösung unterliegt das Chlorophyll leicht einer Änderung<sup>3)</sup> (Allomerisation), bei welcher ihm dieses Merkmal der braunen Phase verloren geht.

Das Phytol tritt konstant als Komponente des Chlorophylls auf, und es macht ein Drittel des Moleküls aus<sup>4)</sup>. Diese Erkenntnis hat

<sup>1)</sup> R. Willstätter, E. W. Mayer und E. Hüni, A. 378, 73 [1910] und O. Schuppli, Promotionsarbeit, Zürich 1912. In noch unveröffentlichten Versuchen hat es sich gezeigt, daß mehrere Angaben der Arbeit von Willstätter, Mayer und Hüni der Richtigstellung bedürfen; die Annahme in der angeführten Untersuchung, daß die Doppelbindung des Phytols bei der Destillation wandere, hat sich nicht bestätigt.

<sup>2)</sup> R. Willstätter und M. Utzinger, A. 382, 129, 135 [1911]. — Diese Reaktion ist wahrscheinlich zuerst von H. Molisch beobachtet worden (Ber. d. Deutsch. bot. Ges. 14, 16 [1896].

<sup>3)</sup> R. Willstätter und A. Stoll, A. 387, 317, 357 [1911/1912].

<sup>4)</sup> R. Willstätter, F. Hocheder und E. Hug, A. 371, 1 [1901]; R. Willstätter und A. Oppé, A. 378, 1 [1910]; R. Willstätter und H. J. Page, A. 404, 237 [1914].

sich nicht so geraden Weges bei der Verarbeitung verschiedener Pflanzen ergeben. Anfangs zeigten die Phäophytin-Präparate verschiedener Herkunft erhebliche Schwankungen. Der Phytolgehalt überschritt nie 33%, blieb aber nicht selten darunter und sank in manchen Fällen bis auf Null. Diese Erscheinung trat in Beziehung zu einer neuen Beobachtung. Eben diejenigen Pflanzen, deren Chlorophyll wenig Phytol zu enthalten schien, erwiesen sich als ausgezeichnetes Material, um das Chlorophyll in der Form wunderschöner Krystalle zu isolieren. Es waren dieselben Krystalle, die der russische Botaniker J. Borodin<sup>1)</sup> schon im Jahre 1881 in mikroskopischen Objekten entdeckt hatte. Borodin sah unter bestimmten Bedingungen, nämlich beim Eintrocknen mit Alkohol befeuchteter Blatt-schnitte, die Krystalle entstehen; er ließ die Frage offen, ob sie von Chlorophyll selbst oder von einem Derivat des Chlorophylls her-rührten. N. A. Monteverde<sup>2)</sup> hat diese Untersuchung fortgesetzt, und er hat solche Krystalle im kleinen schon isoliert, um sie spektro-skopisch zu kennzeichnen. Aber das Präparat ist nicht analysiert und chemisch untersucht worden; in den Monographien über Chloro-phyll wurde daher von der Arbeit Borodins nicht einmal Notiz ge-nommen. So blieb jene Entdeckung nutzlos, bis sie ein zweites Mal im chemischen Laboratorium gemacht wurde<sup>3)</sup>. Im Jahre 1907 habe ich gemeinsam mit M. Benz das sogenannte »krystallisierte Chloro-phyll« in großem Maßstab arbeitend gewonnen, allerdings zu einer Zeit, da die Analyse des Chlorophylls schon mit indirekten Methoden vollendet war.

Die Gewinnung des krystallisierten Chlorophylls in präparativem Maßstab war für die Untersuchung so lange von besonderem Werte, bis es gelang, den natürlichen Farbstoff selbst in reinem Zustand ab-zuscheiden.

Die Bildung der krystallisierten Verbindung und das damit Hand in Hand gehende Fehlen des Phytols hat erst auf einem Umwege die richtige Erklärung<sup>4)</sup> gefunden, nämlich auf Grund der Beobach-tung<sup>5)</sup>, daß bei raschem Extrahieren mancher Blätter der Phytol-

<sup>1)</sup> Botanische Zeitung 40, 608 [1882].

<sup>2)</sup> Acta Horti Petropolitani 13, Nr. 9, 123 [1893].

<sup>3)</sup> R. Willstätter und M. Benz, A. 358, 267 [1907].

<sup>4)</sup> M. Tswett hat zuerst erkannt, daß die krystallisierte Verbindung erst durch die Behandlung der Blätter bei der Extraktion aus dem Chloro-phyll entsteht. (Bio. Z. 10, 414 [1908].)

<sup>5)</sup> R. Willstätter und A. Oppé, A. 378, 1 [1910].

gehalt normal, aber bei langsamem Extrahieren zu niedrig wird, also bei längerer Berührung des Extraktes mit der Blattsubstanz oder sogar mit dem Mehle getrockneter Blätter. Das Chlorophyll wird, wie ich gemeinsam mit A. Stoll<sup>1)</sup> gezeigt habe, in den grünen Pflanzenteilen von einem zu den Esterasen zählenden Enzym, der Chlorophyllase, begleitet. Diese ist nicht, wie man von den Enzymen im allgemeinen angenommen hatte, in alkoholischen Medien unwirksam, vielmehr bewirkt sie die Verdrängung des Phytols durch den als Lösungsmittel angewandten Alkohol. Die Reaktion ist also eine Alkohololyse des Chlorophylls. 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<sup>2)</sup>. 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- oder Methylchlorophyllid) abscheiden oder durch Hydrolyse in Form der entsprechenden freien Carbonsäure, des Chlorophyllids.

Auch die Umkehrung der Hydrolyse, die partielle Synthese des Chlorophylls aus den zwei Komponenten, ist ausgeführt worden<sup>3)</sup>, nämlich die Esterifizierung des Chlorophyllids mit dem Alkohol Phytol unter der katalytischen Wirkung der Chlorophyllase. Die üblichen Methoden der Esterbildung würden in diesem Falle wegen der Empfindlichkeit des Chlorophylls versagen.

Da das Phäophytin die geeignetste Form für die Untersuchung des Chlorophylls ist, auch für den Vergleich des Blattfarbstoffes aus den verschiedenen Pflanzen, so setzt die Beschreibung des Chlorophylls außer der Bestimmung des Magnesiums und des Phytols vor allem die Kenntnis der stickstoffhaltigen Carbonsäuren voraus, welche neben dem Phytol bei der Verseifung von Phäophytin auftreten. Dieses ist zwar reine Chlorophyllsubstanz, aber es ist, worauf schon frühzeitig M. Tswett<sup>4)</sup> hingewiesen hat, nicht eine einheitliche Ver-

<sup>1)</sup> R. Willstätter und A. Stoll, A. 378, 18 [1910].

<sup>2)</sup> R. Willstätter und A. Stoll, A. 387, 317 [1911/12].

<sup>3)</sup> R. Willstätter und A. Stoll, A. 380, 148 [1911].

<sup>4)</sup> R. Willstätter und F. Hocheder, A. 354, 212 und 242 [1907]. — M. Tswett, Bio. Z. 5, 6 [1907]; 6, 373 [1907]; 10, 404 [1908]; B. 41, 1352 [1908].

biidung; seine saure Komponente setzt sich aus verschiedenen basischen, verschiedenfarbigen Verbindungen zusammen.

Anfangs hat die Untersuchung zu einer großen Zahl <sup>1)</sup> solcher Spaltungsprodukte geführt, welche zwei Gruppen bilden: die einen, *Phytochlorine*, sind in indifferenten Lösungen olivgrün, die andern, *Phytorhodine*, prächtig rot. Wegen ihrer großen Zahl sind die einzelnen Verbindungen mit den Gruppennamen und zugefügten Buchstaben bezeichnet worden.

Es wäre kaum gelungen, in die Gemische von verwirrender Zusammensetzung, denen man bei den ersten Umwandlungen des Chlorophylls begegnete, Klarheit zu bringen, wenn uns nicht die basische Natur der Abbauprodukte in ihrer ungewöhnlichen Differenzierung eine leistungsfähige Methode <sup>2)</sup> zur Bestimmung und Trennung der Chlorophyllderivate in die Hand gegeben hätte. Die von Willstätter und Mieg geschaffene Methode beruht auf der verschiedenen Verteilung dieser Farbstoffe zwischen Äther und verdünnten Salzsäuren. Das Verhältnis, in welchem sich diese Basen, die Abbauprodukte des Chlorophylls und ähnlich die des Blutfarbstoffs <sup>3)</sup>, zwischen Äther und verdünnten Säuren verteilen, verändert sich ungewöhnlich stark mit der Säurekonzentration. Die Konzentration der Salzsäure, die unter den üblichen Arbeitsbedingungen eine reichliche Menge der Substanz aus Äther extrahiert, ist für die präparativen Zwecke so bedeutsam, daß sie besonders gekennzeichnet wurde. Wir nannten »Salzsäure-Zahl« den Prozentgehalt derjenigen Säure, die einem ihr gleichen Volumen ätherischer Lösung beim Durchschütteln ungefähr zwei Drittel der gelösten Substanz entzieht.

Die in Gemischen auftretenden Spaltungsprodukte des Phäophytins werden daher durch Fraktionierung ihrer ätherischen Lösung mit Salzsäure von verschiedenem Prozentgehalt getrennt. Mit diesem Mittel ist es gelungen, aus Phäophytin die *Phytochlorine* und *Phytorhodine* in größerer Zahl rein darzustellen.

<sup>1)</sup> R. Willstätter und W. Mieg, A. 350, 1 [1906]; R. Willstätter und F. Hocheder, A. 354, 205 [1907]; R. Willstätter und M. Utzinger, A. 382, 129 [1911]; R. Willstätter, M. Fischer und L. Forsén, A. 400, 174 [1913].

<sup>2)</sup> R. Willstätter und W. Mieg, A. 350, 1 [1906]; R. Willstätter, M. Fischer und L. Forsén, A. 400, 151, 178 [1913]; R. Willstätter und A. Stoll, Untersuchungen über Chlorophyll, Kap. XIV.

<sup>3)</sup> R. Willstätter und M. Fischer, H. 87, 439 [1913].

## Salzsäure-Zahlen.

	Spuren gehen in Salzsäure von:	Geht fast vollständig in Salzsäure von:	Salzsäure-Zahl
Phäophytin a . . . .	25	32	29
Phäophytin b . . . .	30	—	35
Methylphäophorbid a . . . .	13	18	16
Methylphäophorbid b . . . .	17	23	21
Phäophorbid a . . . .	12	17	15
Phäophorbid b . . . .	16	22	19 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>
Phytochlorin e . . . .	1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	4—5	3
Phytochlorin f . . . .	7	12	10
Phytochlorin g . . . .	8	12—13	10—11
Phytorhodin g . . . .	6	11	9
Phytorhodin i . . . .	11	20	15—16
Phytorhodin k . . . .	9	18	14—14 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>
Glaukoporphyrin . . . .	2	6	4—5
Cyanoporphyrin . . . .	1	5	4
Rhodoporphyrin . . . .	2	4	3
Rubiporphyrin . . . .	2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	6 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	4 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>
Pyroporphyrin . . . .	1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	3	1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>
Phylloporphyrin . . . .	1 <sup>1</sup> / <sub>10</sub>	1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	3 <sup>1</sup> / <sub>4</sub>
Ätioporphyrin . . . .	1	4	3
Hämatoporphyrin . . . .	0.033	0.4	0.1—0.15
Mesoporphyrin . . . .	0.5	3	1—1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>
Hämoporphyrin . . . .	0.15	2	3 <sup>1</sup> / <sub>4</sub>

Das Auftreten der komplizierten Gemische war aber nur eine Folge gewisser Umwandlungen, denen das in alkoholischer Lösung sehr veränderliche Chlorophyll unter den Versuchsbedingungen anheimfiel, z. B. bei zu langsamem Extrahieren und bei zu langsamem Ausfällen mit Säure. Die Vorbehandlung des Pflanzenmaterials und namentlich seine Extraktion und die Behandlung der Extrakte mit Säure war zu verbessern und gleichmäßiger zu gestalten. Dadurch, daß wir die Ursachen der in den Lösungen auftretenden Veränderungen aufsuchten und sie zu vermeiden lernten, sind die Unterschiede zwischen unseren Präparaten seltener und geringfügiger geworden und es ist schließlich gelungen, auf dem Wege über Phäophytin ausschließlich zwei gut krystallisierende und charakteristische Spaltungsprodukte zu erhalten<sup>1)</sup>:

Phytochlorin e von der Zusammensetzung  $C_{34}H_{34}O_8N_4$  und

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

Das Phytochlorin e ist eine Tricarbonsäure mit zwei freien Carboxylgruppen und einer als Lactam gebundenen. Das Phyto-

<sup>1)</sup> R. Willstätter und M. Isler, A. 380, 154 [1911]; R. Willstätter und M. Utzinger, A. 382, 129 [1911]; R. Willstätter und M. Isler, A. 390, 269 [1912].

rhodin g ist eine Tetracarbonsäure, von deren Carboxylen sich nur zwei oder drei in freiem Zustand befinden.

Das gemeinsame Auftreten eines grünen und eines roten Spaltungsproduktes bei der aufeinanderfolgenden Hydrolyse des Chlorophylls durch Säure und Alkali hat eine wichtige Frage gestellt<sup>1)</sup>. Ist es bedingt durch den Zerfall eines größeren Moleküls 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 andre einen nachfolgenden Zustand des Abbaues darstellt. Allein Phytochlorin und Phytorhodin lassen sich nicht ineinander überführen, auch entstehen sie 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 andre das Phytorhodin g.

Daraufhin haben wir die Auflösung des Komponentengemisches mit physikalischen und mit chemischen Mitteln erzielt.

Der eine Weg, der bei Chlorophyll-Lösungen<sup>2)</sup>, bei krystallisiertem Chlorophyll<sup>3)</sup> und bei Phäophytin Anwendung findet, besteht in der Verschiebung des gegebenen Komponentenverhältnisses durch ungleiche Verteilung des Farbstoffgemisches zwischen mehreren miteinander nicht mischbaren Lösungsmitteln, z. B. wasserhaltigem Holzgeist und Petroläther, oder bei den schwer löslichen phytolfreien Verbindungen Methylalkohol mit Äther-Petroläther. Die Verschiebung des Komponentenverhältnisses läßt sich durch zahlreiche Wiederholungen der Operation steigern und so ansnützen, daß schließlich die beiden Komponenten von magnesiumhaltigen oder magnesiumfreien Farbstoffen in reinem Zustande vorliegen. Die andre Methode<sup>4)</sup>, die freilich nur bei den magnesiumfreien Verbindungen anwendbar ist, besteht in der Fraktionierung mit Salzsäure nach dem Verfahren von Willstätter und Mieg. Das Phäophytin ist so schwach basisch und empfindlich in seiner Phytolestergruppe gegen hydrolytische Mittel, daß es nicht eben nahe lag und besondere Hindernisse bot, diese Trennung auszuführen. Sie hat dennoch zum Ziele geführt und die Ergebnisse der Entmischungsmethode bestätigt.

<sup>1)</sup> A. 380, 154 [1911]; 390, 269 [1912].

<sup>2)</sup> R. Willstätter und M. Isler, A. 390, 269 [1912]; R. Willstätter und A. Stoll, Untersuchungen über Chlorophyll, Kapitel VI.

<sup>3)</sup> R. Willstätter und A. Stoll, A. 387, 317 [1911].

<sup>4)</sup> R. Willstätter und A. Stoll, Untersuchungen, Kapitel XV.

Mit diesen Resultaten hat eine Ansicht Bestätigung gefunden, die schon im Jahre 1864 der englische Physiker Stokes<sup>1)</sup> 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<sup>2)</sup> und Kraus<sup>3)</sup> 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 der Botaniker Tswett<sup>4)</sup> in Warschau auf neuem und originellem Wege bestätigt, nämlich durch eine Trennung des natürlichen Pigments 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. Solche Änderungen treten leicht ein. Darauf ist es zurückzuführen, daß auch in diesen Arbeiten von Stokes, Sorby und Tswett wesentliche Irrtümer enthalten sind. So soll nach Stokes<sup>5)</sup>, Sorby<sup>6)</sup> und Tswett<sup>7)</sup> eine dritte Chlorophyllkomponente als Pigment der Phäophyceen vorkommen. Eine in jüngster Zeit ausgeführte Untersuchung der Braunalgen-Pigmente von Willstätter und H. J. Page<sup>8)</sup> hat aber zu dem Ergebnis geführt, daß das Chlorophyll dieser Algen identisch ist mit dem der Landpflanzen. Nur tritt die Komponente b bei den Phäophyceen viel mehr zurück. Der angenommene dritte Chlorophyllfarbstoff war ein Zersetzungsprodukt des Chlorophylls.

Ob das Chlorophyllmolekül in den feineren Einzelheiten unversehrt ist, muß durch den Abbau der Präparate zu den typischen Spaltungsprodukten (Phytochlorin e und Phytorhodin g) geprüft

<sup>1)</sup> G. G. Stokes, Proc. Roy. Soc. **13**, 144 [1864].

<sup>2)</sup> H. C. Sorby, Proc. Roy. Soc. **15**, 433 [1867]; **21**, 442 [1873]; Quarterly Journ. of Microscopical Science **11**, 215 [1871]; Quarterly Journ. of Science **8**, 64 [1871].

<sup>3)</sup> G. Kraus, Zur Kenntnis der Chlorophyllfarbstoffe und ihrer Verwandten; Stuttgart 1872.

<sup>4)</sup> M. Tswett, Ber. d. D. bot. Ges. **24**, 316 und 384 [1906]; **25**, 137 und 388 [1907]; B. **41**, 1352 [1908]; **43**, 3139 [1910]; **44**, 1124 [1911]; ferner: Die Chromophylle in der Pflanzen- und Tierwelt, Warschau 1910 (russisch.)

<sup>5)</sup> Proc. Roy. Soc. **13**, 144 [1864]. <sup>6)</sup> Proc. Roy. Soc. **21**, 442 [1873].

<sup>7)</sup> Ber. d. D. bot. Ges. **24**, 235 [1906]. <sup>8)</sup> A. **404**, 237 [1914].

werden. Die hierin bestehende Kennzeichnung der Bestandteile des Blattgrüns ist die Voraussetzung gewesen, um schließlich 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.

### Isolierung des Chlorophylls und Trennung in seine Komponenten.

Die Isolierung des Chlorophylls, die uns im Jahre 1911 gelungen ist<sup>1)</sup>, stützte sich auf die colorimetrische Bestimmung des Reinheitsgrades seiner Lösungen und beruhte 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-proz. Chlorophyll enthalten, gehen Lösungen von etwa 70-proz. 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 neueren Versuchen von Willstätter und Stoll ist aber durch Abänderungen in den Methoden der Extraktion<sup>2)</sup> und Entmischung<sup>3)</sup> das Verfahren vervollkommenet worden.

Das Material für unsere Arbeiten in größerem Maßstabe sind zumeist getrocknete und zerkleinerte Blätter. Es hat sich gezeigt, daß ein beträchtlicher Wassergehalt der Lösungsmittel das Ausziehen des gesamten Blattfarbstoffes wesentlich erleichtert und beschleunigt. Die Pigmente befinden sich in den Chloroplasten auch nach dem Trocknen in kolloidalem Zustand und sind in diesem schwer löslich;

<sup>1)</sup> R. Willstätter und E. Hug, A. 380, 177 [1911].

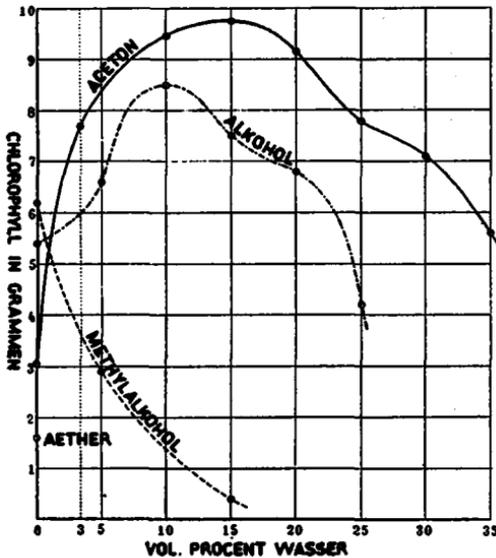
<sup>2)</sup> R. Willstätter und A. Stoll, Untersuchungen über Chlorophyll, Kapitel III.

<sup>3)</sup> Untersuchungen, Kapitel VI.

sie werden durch ein Lösungsmittel, welches Salze aus der Blattsubstanz auflöst, ausgeflockt und dadurch leichter löslich gemacht.

Außerdem wird die Menge der in Lösung gehenden Begleitstoffe vermehrt; nicht mehr das Lösungsmittel selbst, sondern seine Mischung mit den Begleitstoffen wird das eigentliche Extraktionsmittel für das Blattgrün, und zwar ein so ausgezeichnetes, daß damit die Farbstoffe rasch und leicht fast quantitativ ausgezogen werden. Es scheint, wie wenn geradezu die ganze Chloroplasten-Substanz vom Lösungsmittel mit geeignetem Wassergehalt weggeführt würde.

Die besten Lösungsmittel sind 85–90-proz. Alkohol und namentlich 80–85-proz. Aceton; die folgende Figur zeigt den Einfluß des Wassergehaltes auf den Chlorophyllgehalt der Extrakte.



Die Extraktion wird mit niedriger Schicht des Blattmehles auf einer Steinzeugnutsche<sup>1)</sup> ausgeführt, z. B. mit Mengen von 2 kg Brennnesselmehl; der Extrakt enthält den Farbstoff fast quantitativ. Die große Menge von Beimischungen, die hier dem Chlorophyll folgen, wirkt auf den Reinheitsgrad der zu gewinnenden Petrolätherlösung des Farbstoffes weit weniger ungünstig als die Begleitstoffe in Extrakten von geringem Wassergehalt. Wasserfreie Lösungsmittel extrahieren

<sup>1)</sup> R. Willstätter und A. Stoll, Untersuchungen über Chlorophyll, S. 75.

nämlich viele Begleitstoffe des Chlorophylls, die diesem in den Löslichkeitsverhältnissen gleichen und ihm daher hartnäckig folgen. Die wasserhaltigen Extrakte hingegen sind arm an Begleitstoffen, die mit dem Chlorophyll beim Entmischen in den Petroläther übergehen, und an denjenigen, die sich beim Ausfällen des Chlorophylls mit Wasser oder bei der Abscheidung des Phäophytins niederschlagen.

Es gelingt nun ohne viel Mühe, aus einigen Kilogrammen trockener Blätter das reine Chlorophyll in wenigen Stunden zu isolieren, mit einer Ausbeute von gegen 80% der gesamten Menge, nämlich etwa 6.5 g aus 1 kg trockener Blätter.

Das Verfahren läßt sich auf frische Blätter übertragen und wie im ganzen Verlauf der Arbeiten, so ergibt sich auch bei der Darstellung der Chlorophyllpräparate und in ihren Eigenschaften kein Unterschied zwischen frisch gepflückten und getrockneten Blättern. In einer Vorlesungsstunde kann man aus einem Viertelkilogramm frischer Brennnesseln ein Viertelgramm reines Chlorophyll isolieren; mit mehr Zeitaufwand verarbeitet man auf einmal 2½ kg frischer Blätter und gewinnt daraus 4 g Chlorophyll, d. i. etwa ⅓ von ihrem Chlorophyllgehalt.

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

Bei den Entmischungsprozessen, die zur Isolierung des Chlorophylls dienen, beobachten wir, daß sich die beiden Komponenten in ungleicher Weise zwischen Methylalkohol und Petroläther verteilen. Durch systematische Fraktionierung sind schließlich aus dem Gemisch die zwei ganz einheitlichen Komponenten hervorgegangen<sup>1)</sup>. Die eine Komponente, Chlorophyll a, ist blaugrün, die zweite, Chlorophyll b, gelbgrün<sup>2)</sup>. 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 da-

<sup>1)</sup> R. Willstätter und M. Isler, A. 390, 269, 327 [1912]; R. Willstätter und A. Stoll, Untersuchungen über Chlorophyll, Kapitel VI, 3 u. 4.

<sup>2)</sup> Über die Absorptionsspektren der Komponenten und ersten Derivate des Chlorophylls siehe R. Willstätter, A. Stoll und M. Utzinger, A. 385, 156 [1911]; sowie R. Willstätter und A. Stoll, Untersuchungen über Chlorophyll, Kapitel XXV.

durch ab, daß zwei Atome Wasserstoff durch ein Atom Sauerstoff ersetzt werden entsprechend den Formeln:

Chlorophyll a  $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$  d. i.  $[C_{32}H_{36}ON_4Mg](CO_2CH_2)(CO_2C_{20}H_{36})$ ,

Chlorophyll b  $C_{55}H_{70}O_5N_4Mg$  d. i.  $[C_{32}H_{36}O_5N_4Mg](CO_2CH_2)(CO_2C_{20}H_{34})$ .

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 angenommene Beziehung zwischen den beiden Komponenten gewinnt aber an Wahrscheinlichkeit durch das Verhalten der Derivate des Chlorophylls b gegen Grignardsches Reagens<sup>1)</sup>, nämlich durch ihre Umwandlung in Verbindungen der Reihe a, und ferner durch den Verlauf des Abbaus, der in der b-Reihe gleichfalls zum Ätiophyllin und Ätioporphyryn geführt hat<sup>2)</sup>.

#### Die Carotinoide.

Bei der Reindarstellung des Blattgrüns war die Abtrennung der gelben Begleiter, die in den Pflanzen außerordentlich verbreitet und mit dem Chlorophyll in den Chloroplasten vergesellschaftet sind, eine wichtige Aufgabe. Das gemeinsame Vorkommen der gelben Farbstoffe mit den grünen weist auf eine bedeutsame physiologische Rolle dieser Carotinoide hin und hat uns veranlaßt, auch sie in reiner Form darzustellen und sie zu analysieren. Sie sind Nebenprodukte bei der Gewinnung der Chlorophyllpräparate geworden<sup>3)</sup>.

In jedem grünen Blatt kommen zwei wohlkristallisierende, stickstofffreie Pigmente vor, denen viele Eigenschaften gemeinsam sind, die aber im Verhalten gegen Lösungsmittel differieren und die hiernach von J. Borodin<sup>4)</sup> und von A. Tschirch<sup>5)</sup> unterschieden worden sind. Eines von diesen Pigmenten ist, wie schon A. Arnaud<sup>6)</sup> wahrscheinlich gemacht hat, mit dem lange bekannten Carotin der Möhre iden-

<sup>1)</sup> R. Willstätter und A. Stoll, Untersuchungen, S. 331.

<sup>2)</sup> R. Willstätter und M. Fischer, A. 400, 182 [1913].

<sup>3)</sup> R. Willstätter und A. Stoll, Untersuchungen über Chlorophyll, Kapitel XII.

<sup>4)</sup> Mélanges biologiques tirés du Bull. de l'Acad. Impér. de St. Petersburg II, 512 [1883].

<sup>5)</sup> Ber. d. D. Bot. Ges. 14, 76 [1896] und 22, 414 [1904].

<sup>6)</sup> C. r. 100, 751 [1885]; 102, 1119 u. 1319 [1886]; 104, 1293 [1887]; 109, 911 [1889]; Bl. [2] 48, 64 [1887].

tisch. Die Analyse von Willstätter und Mieg<sup>1)</sup> hat ergeben, daß es ein ungesättigter Kohlenwasserstoff von der Formel  $C_{40}H_{56}$  ist. Sein Begleiter, das Xanthophyll<sup>2)</sup>, war in Substanz noch unbekannt, trotzdem er in den Blättern der Menge nach überwiegt. Er ist nach seiner Zusammensetzung  $C_{40}H_{56}O_2$  und nach seinen Eigenschaften als ein Oxyd des Carotins aufzufassen. Der Kohlenwasserstoff ist in Petroläther erheblich löslich, die Sauerstoffverbindung hingegen nur in Alkohol. Den beiden gelben Pigmenten ist eine große Affinität zum Sauerstoff eigen, den sie, namentlich in ihren Lösungen, gierig absorbieren.

Ein drittes Carotinoïd, das Fucoxanthin<sup>3)</sup>, findet sich in den Braunalgen; es drängt hier die Menge der beiden andren zurück. Willstätter und Page haben vor kurzem das Fucoxanthin in reinen Krystallen isoliert; seine Zusammensetzung ist  $C_{40}H_{54}O_6$ . Es ist in chemischer Beziehung dem Carotin und Xanthophyll ähnlich, aber vor ihnen ausgezeichnet durch die beträchtlichen basischen Eigenschaften seiner ätherartig gebundenen Sauerstoffatome. Es bildet ein charakteristisches blaues Chlorhydrat, das als ein Oxoniumsalz aufzufassen ist.

Die Carotinoide sind sehr verbreitet. Willstätter und H. H. Escher<sup>4)</sup> haben ein Isomeres des Carotins (Lycopin) aus der Beerenfrucht von *Lycopersicum esculentum* (Tomate) isoliert, ein Isomeres des Xanthophylls (Lutein) aus dem Hühnereidotter<sup>5)</sup>.

Die Konstitution dieser gelben Pigmente ist noch unaufgeklärt; die Untersuchung wird dadurch erschwert, daß man bei dem Abbau bisher nur zu amorphen Produkten gelangte.

#### Vergleichende Untersuchung der Blattpigmente.

Mit der Beschreibung und Analyse des Chlorophylls und seiner gelben Begleiter sind die Vorbedingungen erfüllt, um das Mengenverhältnis aller Komponenten des Blattfarbstoffs zu ermitteln und um das Blattgrün in den verschiedensten Pflanzenarten zu vergleichen. Das Material für den Vergleich in Bezug auf die chemischen Merkmale des Chlorophylls boten über 200 Pflanzen aus zahlreichen Klassen der Kryptogamen und der Phanerogamen.

Unsere Methode war die Prüfung des Phäophytins, welches durch rasches Extrahieren der Blätter und rasches Füllen mit Säure

<sup>1)</sup> A. 355, 1 [1907].

<sup>2)</sup> R. Willstätter und W. Mieg, A. 355, 1 [1907].

<sup>3)</sup> R. Willstätter und H. J. Page, A. 404, 237, 253 [1914].

<sup>4)</sup> H. 64, 47 [1910].

<sup>5)</sup> R. Willstätter und H. H. Escher, H. 76, 214 [1912].

abgeschieden wurde, auf seinen Phytolgehalt, sowie auf seine basischen Spaltungsprodukte Phytochlorin e und Phythorhodin g und zur Ergänzung der Abbau der Chlorophyllinsalze zu dem krystallisierenden Rhodophyllin, dessen Asche in 7.04% Magnesiumoxyd besteht.

Das Ergebnis<sup>1)</sup> ist die Identität des Chlorophylls in allen untersuchten Pflanzen. Wir finden nur ein einziges Blattgrün, bestehend aus den zwei Komponenten a und b von Chlorophyll. Auch in dem quantitativen Verhältnis zwischen diesen beobachteten wir eine große Regelmäßigkeit; a überwiegt, auf fast drei Moleküle Chlorophyll a trifft nur ein Molekül von Chlorophyll b.

Für diese quantitative Beziehung aber bilden eine Ausnahme die Phäophyceen, in welchen neben dem Chlorophyll a nur eine verschwindend kleine Menge der Komponente b vorkommt<sup>2)</sup>.

Die von M. Isler und von A. Stoll ausgeführte Untersuchung des Komponentenverhältnisses betrifft die zwei grünen, sowie die zwei gelben Pigmente der Chloroplasten. Die ersteren wurden in der Form ihrer Spaltungsprodukte Phytochlorin e und Phythorhodin g durch Fraktionieren mit Salzsäure getrennt und colorimetrisch bestimmt. Die Carotinoide, vom grünen Farbstoff nach seiner Verseifung mit Lauge abgetrennt, fraktionieren wir hingegen durch ihre verschiedene Verteilung zwischen Petroläther und verdünntem Holzgeist, um sie gleichfalls mit einem colorimetrischen Verfahren quantitativ zu bestimmen. Die Analysen ergaben bisher keine bedeutende Abhängigkeit des Komponentenverhältnisses von äußeren Faktoren, wie von der Jahreszeit, der Tageszeit, der Belichtung, und keinen erheblichen Unterschied zwischen dieser und jener Pflanzenart; unter extremen Lebensbedingungen betragen die Abweichungen von der durchschnittlichen Verhältniszahl nicht mehr als 30% derselben.

Auch das molekulare Verhältnis der grünen zu den gelben Pigmenten ist annähernd konstant, nämlich 3 : 1, und das Verhältnis des Carotins zum Xanthophyll beträgt mit unbedeutenden Schwankungen in Lichtblättern 0.6 : 1.

Die Mengen und die Mengenverhältnisse der Farbstoffe, die sich aus unseren colorimetrischen Bestimmungen ergeben haben, werden in den beiden Tabellen verzeichnet.

<sup>1)</sup> R. Willstätter und M. Isler, A. 380, 154 [1911]; 390, 269 [1912]; R. Willstätter und A. Stoll, Untersuchungen über Chlorophyll, Kapitel IV und V, Abschn. 6.

<sup>2)</sup> R. Willstätter und H. J. Page, A. 404, 237 [1914].

## Gehalt der Blätter an den grünen und gelben Farbstoffen.

Nr.	Pflanze	Lebensbedingungen	Trockengehalt	Mengen (in g) in 1 kg frischer Blätter				Mengen (in g) in 1 kg trockner Blätter					
				Chloro- phyll a	Chloro- phyll b	Carotin	Xantho- phyll	Chloro- phyll a	Chloro- phyll b	Carotin	Xantho- phyll	Gesamt- chloro- phyll	Summe der gelben Pigmente
1	<i>Sambucus nigra</i>	Lichtblätter	27.8	1.615	0.599	0.146	0.263	5.82	2.16	0.52	0.95	7.98	1.47
2	»	»	24.5	1.616	0.607	0.145	0.262	5.82	2.18	0.52	0.94	8.00	1.46
3	»	»	28.8	1.536	0.552	0.134	0.226	6.26	2.25	0.55	0.92	8.51	1.47
4	<i>Aesculus hippocastanum</i>	»	35.5	1.514	0.559	0.133	0.230	6.18	2.28	0.54	0.94	8.46	1.48
5	»	»	35.5	1.732	0.605	0.146	0.301	6.13	2.14	0.51	1.06	8.27	1.57
6	»	»	38.5	1.725	0.628	0.144	0.298	6.10	2.22	0.51	1.05	8.32	1.56
7	<i>Platanus acerifolia</i>	»	37.5	2.517	0.885	0.291	0.444	7.09	2.49	0.82	1.25	9.58	2.07
8	»	»	35.0	2.477	0.890	0.291	0.444	6.44	2.31	0.76	1.15	8.75	1.91
9	<i>Fagus sylvatica</i>	»	—	2.123	0.873	0.298	0.466	5.66	2.33	0.79	1.24	7.99	2.03
10	<i>Populus canadensis</i>	»	33.5	1.692	0.489	0.106	0.233	5.29	1.53	0.33	0.73	6.82	1.06
11	»	»	—	1.666	0.508	0.152	0.323	4.76	1.45	0.43	0.92	6.21	1.35
1a	<i>Sambucus nigra</i>	Schattenblätter	16.3	2.060	0.670	0.185	0.299	—	—	—	—	—	—
6a	<i>Aesculus hippocastanum</i>	»	25.0	1.395	0.476	0.097	—	4.16	1.42	0.29	—	5.58	1.56
8a	<i>Platanus acerifolia</i>	»	25.0	1.395	0.488	0.097	—	4.16	1.42	0.29	—	5.62	1.57
9a	<i>Fagus sylvatica</i>	»	37.3	1.32	0.378	0.053	—	—	—	—	—	—	—
				1.285	0.630	0.063	0.192	7.91	3.88	0.38	1.18	11.79	1.56
				1.304	0.645	0.063	0.179	8.02	3.97	0.39	1.11	11.99	1.57
				1.959	0.864	0.093	0.279	7.93	3.73	0.37	1.11	11.66	1.48
				2.112	0.679	0.127	0.311	8.45	2.70	0.51	1.25	11.15	1.76
				2.775	0.965	0.131	0.252	7.45	2.59	0.35	0.68	10.04	1.03

## Komponentenverhältnis der grünen und gelben Farbstoffe.

Nr.	Pflanze	Lebensbedingungen	Tageszeit	$\frac{Q_a}{b}$	$\frac{Q_c}{x}$	$\frac{Q_a+b}{c+x}$
1	<i>Sambucus nigra</i>	Lichtblätter	5h N.	2.74	0.588	3.33
				2.70	0.588	3.35
2	»	»	4h V.	2.83	0.629	2.83
				2.71	0.613	2.88
3	»	»	5h N.	2.90	0.510	3.10
				2.80	0.513	3.04
4	<i>Aesculus hippocastanum</i>	»	4h V.	2.89	0.699	2.84
5	»	»	5h N.	2.82	0.699	2.80
6	»	»	7h V.	2.47	0.676	2.40
7	<i>Platanus acerifolia</i>	»	4h V.	3.52	0.478	3.98
8	»	»	5h N.	3.34	0.500	2.83
9	<i>Fagus silvatica</i>	»	4h N.	3.13	0.653	3.45
				—	0.649	—
10	<i>Populus canadensis</i>	»	7h V.	2.98	—	—
				2.90	—	—
11	»	»	7h V.	2.82	—	—
1a	<i>Sambucus nigra</i>	Schattenblätter	5h N.	2.07	0.345	4.63
				2.05	0.347	4.72
6a	<i>Aesculus hippocastanum</i>	»	7h V.	2.30	0.353	4.70
8a	<i>Platanus acerifolia</i>	»	5h N.	3.16	0.433	3.31
9a	<i>Fagus silvatica</i>	»	5h N.	2.92	0.553	6.02

Ein Beispiel soll die Ergebnisse veranschaulichen.

In 1 kg trockner Hollunderblätter (entsprechend 4 kg frischer Blätter) sind enthalten:

8.48 g Chlorophyll, nämlich: 6.22 g Chlorophyll a, 2.26 g Chlorophyll b.

1. 48 g Carotinoide, nämlich: 0.55 g Carotin, 0.93 g Xanthophyll.

Diese Mengen entsprechen folgendem molekularen Verhältnisse:

Auf 1 Mol. Chlorophyll (a + b) treffen 0.35 Mol. der Carotinoide.

Auf 1 Mol. Chlorophyll a treffen 0.36 Mol. Chlorophyll b.

Auf 1 Mol. Carotin treffen 1.61 Mol. Xanthophyll.

Das quantitative Verhältnis zwischen den zwei Chlorophyllkomponenten haben wir nicht allein unter den natürlichen Bedingungen des Pflanzenlebens annähernd konstant gefunden; es ist auch in einer Untersuchung des Hrn. Stoll nicht gelungen, bei höchst gesteigerter Assimilationstätigkeit der Chloroplasten das Verhältnis zu verschieben. Auch mit chemischen Mitteln ist es nicht gelungen, das Chlorophyll a zu b zu oxydieren oder b zu a zu reduzieren. Der Unterschied zwischen beiden, der vermutlich auf der Oxydation einer Methylengruppe zum Carbonyl beruht, verschwindet erst bei weitgehendem Abbau.

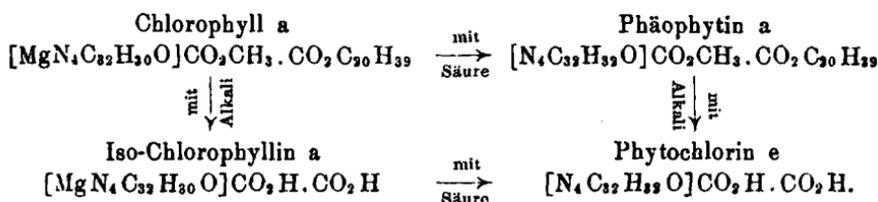




## Konstitutionsfragen.

Wenn wir den Abbau der zwei Chlorophyllkomponenten zum Ätiophyllin und Ätioporphyrin an Hand der Tabellen betrachten, so sehen wir auf dem Wege zu der Stammsubstanz viele Zwischenprodukte. In den mittleren Vertikalreihen der Tabelle stehen die magnesium-haltigen Carbonsäuren, die durch Verseifung des Chlorophylls und durch höheres Erhitzen mit Alkali gebildet werden, die grünen, blauen und roten Phylline. Links und rechts von diesen stehen die magnesium-freien Verbindungen, worunter die Phäophytine, Phytochlorin e und Phytorhodin g und die Porphyrine wichtig sind.

Aus Chlorophyll a entsteht durch Austritt des Magnesiums Phäophytin, das mit Alkali Phytochlorin e liefert; dieses wird andererseits gebildet, wenn zuerst Alkali, dann Säure auf Chlorophyll einwirkt:



Die Beziehung zwischen Chlorophyll und den Chlorophyllinsalzen ist keine einfache. Aus jeder Chlorophyllkomponente gehen nämlich je nach den Bedingungen der alkalischen Hydrolyse zwei in einheitlichem Zustand erhaltene Alkalisalze hervor, von denen eines fluoresciert wie Chlorophyll selbst, während dem andren die Fluorescenz fehlt: Chlorophyllin und Isochlorophyllin<sup>1)</sup>. Die Reaktion besteht nicht allein in der Verseifung zweier Estergruppen, sondern zu allererst in einer Umwandlung, die am Auftreten der sogenannten braunen Phase kenntlich ist.

Man wird nur in einer Erklärung<sup>2)</sup> dieser braunen Phase den Schlüssel finden zum Verständnis der ersten Stufen des Abbaus und der Veränderungen, welche Chlorophyll so leicht und spontan in seinen Lösungen erleidet.

Vergegenwärtigen wir uns, daß bei der Einwirkung von Alkalien auf Chlorophyll und Chlorophyllide die grüne Farbe zuerst in intensives Braun, in Gelbbraun bei der Komponente a, in Rot bei b umschlägt und daß dann in einigen Minuten in den alkalischen Medien die ur-

<sup>1)</sup> R. Willstätter und M. Utzinger, A. 382, 129, 157 [1911]; R. Willstätter, M. Fischer und L. Forsén, A. 400, 147 [1913]; R. Willstätter und A. Stoll, Untersuchungen über Chlorophyll, Kapitel XVIII.

<sup>2)</sup> R. Willstätter und M. Utzinger, A. 382, 128, 135, 139 [1911]; R. Willstätter und A. Stoll, A. 387, 317, 326 [1911].

springliche Chlorophyllfarbe zurückkehrt. Die Reaktion erweckt den Anschein einer gänzlichen Zersetzung und einer Neubildung des Chlorophylls. Sie ist natürlich so zu verstehen, daß eine an dem chromophoren Komplex wesentlich beteiligte Gruppe durch Hydrolyse verändert und daß an ihrer Stelle eine neue ähnliche gebildet wird.

Wir versuchen dieses Verhalten des Chlorophylls als ein »Umlactamisieren« zu erklären, als Öffnung eines vorhandenen Lactamringes und als Schließen eines neuen, zwar ähnlichen, jedoch alkalibeständigen Ringes.

Die Erscheinung ist übrigens nicht auf die Magnesiumverbindungen beschränkt. Eine ähnliche braune Phase geben mit Alkali die Phäophytine und die Phäophorbide.

Die Bildung eines neuen Lactamringes kann auf mehrere Arten erfolgen; gerade dadurch erklären sich die verschiedenen Reihen der Chlorophylline und das so schwer zu vermeidende Auftreten der schwachbasischen Phytochlorine und Phytorhodine.

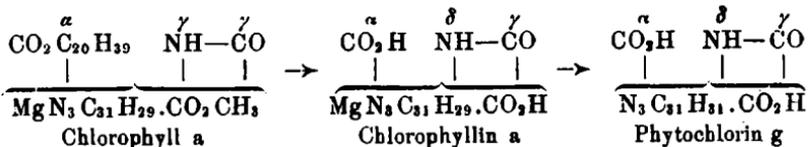
Die anfangs vorhandene Gruppe werde bezeichnet:



Sie kann sich so umlactamisieren, daß das Carboxyl  $\gamma$  mit einer andren Stickstoffgruppe, sie heiße  $\delta$ , in Verbindung tritt, oder das Umlactamisieren erfolgt derart, daß ein andres Carboxyl, nämlich  $\alpha$ , sich z. B. mit dem Stickstoffatom  $\gamma$  vereinigt.

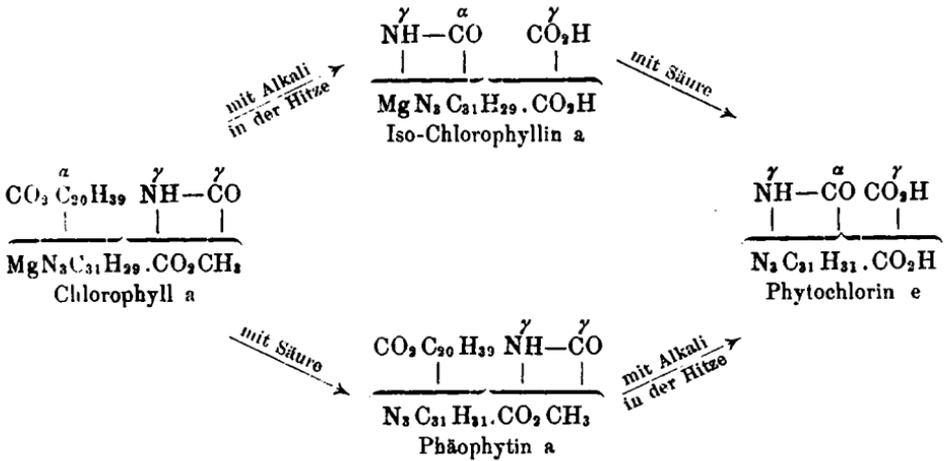
Zwei Richtungen der Chlorophyllinbildung werden dadurch der Einfachheit halber nur für das Chlorophyll a folgendermaßen veranschaulicht.

I. Bei der Verseifung in der Kälte wird zuerst die Lactamgruppe geöffnet, dann verbindet sich überwiegend das frei gewordene Carboxyl  $\gamma$  mit dem Stickstoffatom und zwar geschieht dies auch, wenn das Carboxyl  $\alpha$  schon frei ist, nämlich beim Verseifen der sauren Chlorophyllide:

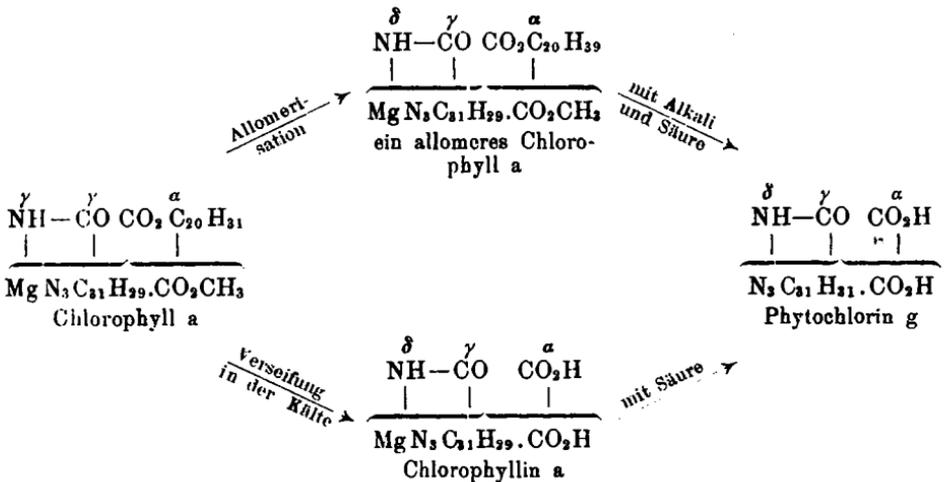


Bei der Verseifung in der Hitze verbindet sich das aus der Estergruppe a frei gewordene oder schon frei vorhandene Carboxyl  $\alpha$  mit dem Stickstoffatom  $\gamma$  der ursprünglichen Lactamgruppe. Es ist wahrscheinlich geworden, daß von mehreren möglichen Umformungen

diese zweite bei energischer Verseifung, z. B. mit konzentriertem Alkali in der Hitze besonders beschleunigt wird und dadurch quantitativ vollzogen werden kann.



Die Lactamtheorie der braunen Phase, obwohl sie in ihren Einzelheiten noch unsicher ist und noch der Entwicklung bedarf, erklärt auch in befriedigender Weise die erwähnte Allomerisation des Chlorophylls in alkoholischer Lösung als ein Umlactamisieren unter der Wirkung des Alkohols:



Da die beim ersten Angriff der Alkalien auf Chlorophyll neu gebildeten Ringgruppierungen beständiger sind als die ursprünglichen, so hat der verschiedene Verlauf der Umlactamisierung bleibende Unterschiede in den Produkten des weiteren Abbaus zur Folge. Daher gehen aus den zwei Grundformen des Abbaus jeder Chlorophyllkomponente, aus dem Chlorophyllin und dem Iso-Chlorophyllin entsprechende Reihen einfacher zusammengesetzter Phylline und Porphyrine hervor; es gibt also im ganzen bei dem Alkali-Abbau vier Reihen <sup>1)</sup>, die schließlich zu einem einzigen Endprodukt führen.

Aus Isochlorophyllin a entstehen:

- die Dicarbonsäure Cyanophyllin, in Lösung blau;
- die Dicarbonsäure Erythrophyllin, in Lösung rot;
- die Monocarbonsäure Phyllophyllin, in Lösung blau-  
stichig rot.

Aus Chlorophyllin a gehen hervor:

- die Dicarbonsäure Glaukophyllin, in Lösung blau;
- die Dicarbonsäure Rhodophyllin, in Lösung blaurot;
- die Monocarbonsäure Pyrrophyllin, in Lösung blau-  
stichig rot.

Die Abspaltung des letzten Carboxyls ist von Willstätter und M. Fischer <sup>2)</sup> bei Phyllinen wie Porphyrinen durch Erhitzen sehr kleiner Substanzmengen mit Natronkalk erzielt worden. Dasselbe Ätiophyllin  $C_{31}H_{34}N_4Mg$  und Ätioporphyrin  $C_{31}H_{36}N_4$  entstand aus den Derivaten von Chlorophyll a und b.

Diese Stammsubstanzen sind gut krystallisierende Verbindungen, die sich dem Gruppenbilde einfügen, das mit den zuvor untersuchten Phyllinen und Porphyrinen gezeichnet worden ist.

Um die Betrachtung der Struktur des Chlorophylls zu vereinfachen, möchte ich mich darauf beschränken, für die Konstitution des Ätioporphyrins einen Ausdruck zu suchen. Er muß die Ergebnisse der Oxydation und der Reduktion der Chlorophyllderivate berücksichtigen.

Phylloporphyrin liefert bei der Oxydation <sup>3)</sup> Verbindungen, welche aus den gründlichen Untersuchungen von W. Küster <sup>4)</sup> über den

<sup>1)</sup> R. Willstätter, M. Fischer und L. Forsén, A. 400, 147 [1913].

<sup>2)</sup> A. 400, 182 [1913].

<sup>3)</sup> R. Willstätter und Y. Asahina, A. 373, 227 [1910].

<sup>4)</sup> Beiträge zur Kenntnis des Hämatins, Tübingen 1896; H. 28, 1 [1899]; 29, 185 [1900]; 44, 391 [1905]; 54, 501 [1908]; 61, 164 [1909]; A. 315, 174 [1900].

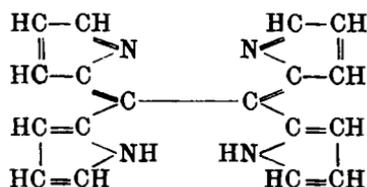


Das Ätioporphyrin setzt sich mithin aus 4 Pyrrolkernen zusammen. Die Zahl seiner Wasserstoffatome ist auffallend niedrig, die Pyrrole müssen daher so verbunden und substituiert sein, daß dabei im Vergleich mit einfachen Bindungen 8 Atome Wasserstoff erspart werden, sei es durch Doppelbindungen oder weitere Ringschlüsse.

Wenn man die zur Erklärung der Oxydationsprodukte erforderlichen Äthylgruppen berücksichtigt, so erscheint es nicht möglich, ohne Annahme eines Kohlenstoffringes das Ätioporphyrin zu formulieren.

Hinsichtlich der Art, in der man die Pyrrolkerne verknüpft denken kann, begegnet man wohl in der Literatur über Hämin einigen Vorstellungen, nämlich bei W. Küster<sup>1)</sup> und bei O. Piloty<sup>2)</sup>, aber die Frage ist dadurch nicht gelöst worden.

Als eine einfache Verknüpfung von vier Pyrrolkernen, von nur zwei salzbildenden und zwei komplexbildenden, zu einem Farbstoff ist mir folgende Formel wahrscheinlich:

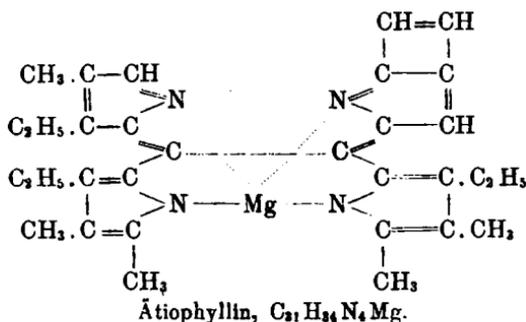
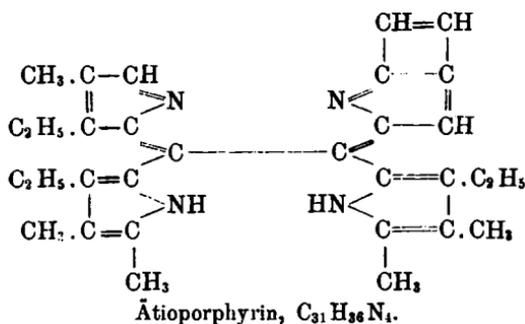


Läßt man in diese Grundsubstanz mit Rücksicht auf die Oxydationsprodukte drei Methyl- und drei Äthylgruppen und wegen der Reduktionsprodukte mindestens noch ein Methyl eintreten, so bleibt schließlich für die letzten drei Kohlenstoffatome des Ätioporphyrins nur so viel Wasserstoff übrig, daß entweder zwei Doppelbindungen oder zwei Kohlenstoffringe oder je eines von beiden angenommen werden muß. Wenn man entsprechend dem Verlauf der Reduktion es vermeidet, einen Cyclopentan- oder -hexan-Ring anzunehmen, so gelangen wir mit einiger Wahrscheinlichkeit zu folgenden Formeln<sup>3)</sup> für Ätioporphyrin und Ätiophyllin:

<sup>1)</sup> H. 82, 463 [1912].

<sup>2)</sup> O. Piloty und E. Dormann, A. 388, 313 [1912]; O. Piloty und J. Stock, A. 392, 215 [1912].

<sup>3)</sup> R. Willstätter und M. Fischer, H. 87, 428 [1913]; siehe dazu W. Küster, H. 88, 377 [1913].



Mehrere Einzelheiten dieser Formel, wie die Stellung von zwei Methylen, sind willkürlich, auch könnte der Cyclobutenring in  $\beta, \beta$ -Stellung an das Pyrrol angegliedert sein.

Die Konstitutionsfrage gewinnt an Bedeutung dadurch, daß es Willstätter und M. Fischer gelungen ist, den Blutfarbstoff zum nämlichen Ätioporphyrin abzubauen. Es ist dadurch zum erstenmal aus Hämin und Chlorophyll ein Umwandlungsprodukt erhalten worden, dessen Molekül noch in naher Beziehung zum Farbstoff selbst steht. Identisch waren bisher nur die Zerfallprodukte von Hämin und Chlorophyll, einfachere Pyrrolderivate, welche die Oxydation und Reduktion geliefert hat. Die Porphyrine aus beiden Pigmenten wiesen zwar, was Hoppe-Seyler, sowie Schunck und Marchlewski erkannt haben, manche Ähnlichkeit auf, aber sie zeigten doch auch noch erhebliche Unterschiede (z. B. in ihren basischen Eigenschaften).

Aus dem Hämin gehen Porphyrine durch ganz andre Reaktionen hervor als aus Chlorophyll, nicht etwa einfach durch Austritt des Metalls. Hämatoporphyrin, das Produkt der Einwirkung von Bromwasserstoffsäure auf Hämin, ist nämlich eine Dioxysäure. Es gelang, dasselbe beim Erhitzen mit methylalkoholischer Kalilauge und Pyridin zu einem neuen Porphyrin zu reduzieren, welches ich Hämoporphyrin genannt habe. Es unterscheidet sich in seiner Zusammensetzung vom Hämatoporphyrin durch das Minus von zwei Hydroxyl-

gruppen. Gleich dem Rhodoporphyrin, mit welchem es isomer ist, läßt es sich durch Erhitzen mit Natronkalk decarboxylieren<sup>1)</sup>.

Aus der Zusammensetzung  $C_{21}H_{36}N_4$  des auch so gewonnenen Ätioporphyrins geht hervor<sup>2)</sup>, daß Hämoporphyrin der Formel  $C_{33}H_{36}O_7N_4$ , somit Hämin nicht der allgemein angenommenen Formel  $C_{34}H_{32}O_4N_4FeCl$  entspricht, sondern der Formel  $C_{33}H_{32}O_4N_4FeCl$ .

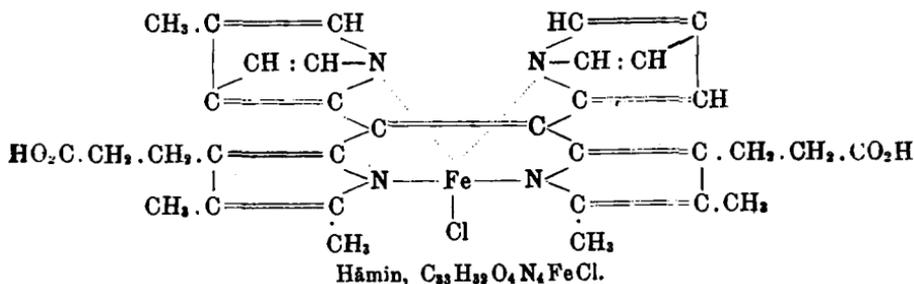
Wenn schon das Ätioporphyrin von der Formel  $C_{21}H_{36}N_4$  auffallend wasserstoffarm erscheint, so leitet sich Hämin  $C_{33}H_{32}O_4N_4FeCl$  von einer noch um zwei Wasserstoffatome ärmeren Grundsubstanz



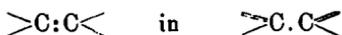
ab, was die Annahme von Doppelbindungen und Kohlenstoffringen nötig macht.

In der Untersuchung von Willstätter und M. Fischer über den Verlauf der Hämoporphyrin-Bildung ist eine Reihe von Zwischenprodukten dieser Reaktion aufgefunden worden. Diese Arbeit hat zu der Annahme geführt, daß im Hämin zwei reaktionsfähige Vinylgruppen an Pyrrolstickstoff gebunden sind.

Auf der Grundlage der angenommenen Verknüpfung von vier Pyrrolen durch die Gruppe  $>C-C<$  und der Bindung von zwei Vinylen an Stickstoffatome wurde versucht, eine dem Verhalten bei der Oxydation und Reduktion und bei der Porphyrinbildung genügende Konstitutionsformel des Hämins zu entwickeln, die in mehreren Einzelheiten noch nicht bewiesen ist, aber weitere Untersuchungen, wie wir hoffen, anzuregen vermag:



Bei der Bildung des Hämoporphyrins werden sich die Brücken von den zwei Pyrrolstickstoffen lösen, worauf sich die mittlere Gruppe

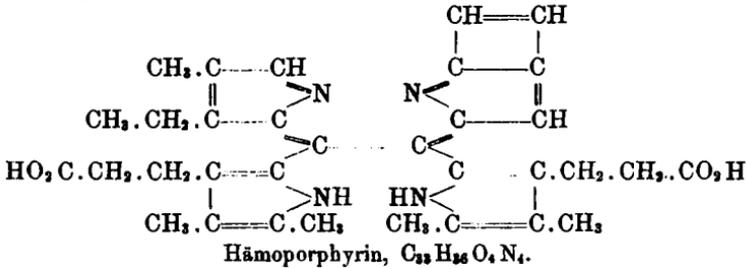


umwandeln kann.

<sup>1)</sup> R. Willstätter und M. Fischer, H. 87, 423 [1913].

<sup>2)</sup> R. Willstätter und M. Fischer, H. 87, 423, 426, 463, 483 [1913].

Bei den Umwandlungen des Hämatoporphyrins soll nach unserer Annahme die Kondensation eines Vinylrestes mit einem Kohlenstoffatom des Pyrrolkernes erfolgen, welche das Strukturbild des Ätioporphyrins zum Ausdruck bringt. Das Hämatoporphyrin wird daher durch folgende Formel erklärt:



Obwohl nun Chlorophyll und Hämin auf das gleiche Ätioporphyrin zurückgeführt worden sind, das man als eine Stammsubstanz bezeichnen kann, ziehen wir aus den Untersuchungen über den Abbau nicht den Schluß einer nahen konstitutionellen Verwandtschaft zwischen Chlorophyll und Hämin. Hier Magnesium, dort Eisen, hier Esterbildung mit Phytol, dort Paarung mit Globin; zu solchen der ungleichartigen Funktion entsprechenden Unterschieden kommen noch in dem eigentlichen Farbstoffkern bedeutende Unterschiede, die erst bei tiefgreifendem Abbau verschwunden sind.

Auf dem Wege vom Hämin zum Ätioporphyrin gibt es zwei Verwandlungen, die den Bau des Moleküls wesentlich ändern, nämlich dessen Übergang vom Hämin zum Hämatoporphyrin und von diesem zu Hämatoporphyrin, das mit den Porphyrinen des Chlorophylls isomer ist.

Auch zwischen Chlorophyll und dem Ätiophyllin und sogar zwischen Chlorophyll und den ersten zweibasischen Porphyrinen wie Cyanoporphyrin oder Erythroporphyrin liegen zwei das Molekül wesentlich umgestaltende Schritte, die sich mit den Reaktionen des Hämins nicht in Parallele bringen lassen.

Der eine Schritt ist die Umlactamisierung der Chlorophyllkomponenten, durch die ein Ringsystem aufgespalten, ein neues synthetisiert wird. Die zweite Umformung des Moleküls, die noch nicht klargelegt ist, findet zwar weniger augenfällig statt, ist aber doch tiefgreifend. Sie geschieht durch die Einwirkung von Alkali bei höherer Temperatur und führt von den Chlorophyllinen zu den einfacher konstituierten zweibasischen Phyllinen oder vom Phytochlorin und Phytochloridin zu den entsprechenden Porphyrinen<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> R. Willstätter, M. Fischer und L. Forsén, A. 400, 147, 151 [1913].

Künftige Untersuchungen über die Konstitution des Chlorophylls finden daher große Aufgaben, für deren Lösung wir nur die ersten Vorarbeiten ausgeführt haben. Die Beziehungen zwischen den beiden Chlorophyllkomponenten und die Umwandlungen, welche vom Chlorophyll zu den Chlorophyllinen, von den Chlorophyllinen zu den zweibasischen Phyllinen führen, sind aufzuklären und die Struktur des Ätioporphyrins ist noch in wichtigen Einzelheiten zu erforschen.

Von noch größerer Bedeutung werden die Fragen sein, welche die Pflanzenphysiologie stellt; ihre Behandlung wird vielleicht durch die Bestimmung und Isolierung der Komponenten des Blattfarbstoffes unterstützt. Diese Fragen beziehen sich auf die Möglichkeit einer chemischen Funktion des Chlorophylls und auf die Art derselben.

### Über Anthocyane.

#### Zur Geschichte.

Über den Anfang unserer Untersuchungen habe ich gemeinsam mit Hrn. Arthur E. Everest<sup>1)</sup> am Ende des letzten Jahres berichtet; sie sind im Kaiser-Wilhelm-Institut für Chemie im letzten Semester fortgeführt worden<sup>2)</sup> und zum großen Teil noch nicht veröffentlicht<sup>3)</sup>.

Wie in den rohen Chlorophyll-Lösungen, so findet man in den Extrakten der Blüten den Farbstoff mit einer großen Menge von hochmolekularen, zum Teil kolloidalen Begleitstoffen vermischt und überdies durch die Veränderlichkeit des Farbstoffes seine Isolierung erschwert. Bei dem chemisch indifferenten Chlorophyll war die Lösung der Aufgabe allein durch Ausnützung der Löslichkeitsverhältnisse zu erzielen. Bei den Anthocyanen führen chemische Mittel zum Ziel.

Die Anthocyane haben, wie seit langem bekannt, phenolischen Charakter; sie bilden also Metallsalze.

Die Literatur, aus der ich nur die wichtigsten Angaben zitieren kann, weist fast durchgehends Versuche auf, auf Grund der phenolischen Eigenschaften, nämlich durch die Fällung als Bleisalze die

<sup>1)</sup> R. Willstätter und A. E. Everest, A. 401, 189 [1913].

<sup>2)</sup> R. Willstätter, Sitzungsber. d. Kgl. Preuß. Akad. d. Wissensch. 1914, 402.

<sup>3)</sup> Nach meinem Vortrage sind zwei Arbeiten ausgeführt worden, deren Ergebnisse hier unberücksichtigt geblieben sind: R. Willstätter und H. Mallison, Über die Verwandtschaft der Anthocyane und Flavone, Sitzungsber. d. Kgl. Preuß. Akad. d. Wissensch. 1914, 769 und R. Willstätter und L. Zechmeister, Synthese des Pelargonidins, Sitzungsber. d. Kgl. Preuß. Akad. d. Wissensch. 1914, 886.

Anthocyane rein zu gewinnen. Die Methode hat aber in keinem Falle zu einem einheitlichen und unversehrten Produkt geführt. Die Fällbarkeit durch Bleiacetat ist zu wenig spezifisch, um eine Trennung von den Begleitstoffen herbeizuführen.

Alte Versuche, den Farbstoff der Weintraube zu isolieren, beruhen auf dem Prinzip der Bleifällung: die Arbeiten von G. J. Mulder<sup>1)</sup> (1856), A. Glénard<sup>2)</sup> (1858) und die späteren Untersuchungen von A. Gautier<sup>3)</sup>. Ähnlich hatten E. Frémy und S. Cloez<sup>4)</sup> schon im Jahre 1854 das Anthocyan der Kornblume und des Veilchens abscheiden wollen. Neuere Arbeiten über den Farbstoff der Weintraube und der Heidelbeere sind von R. Heise<sup>5)</sup> (1889 und 1894) im Kaiserlichen Gesundheitsamte ausgeführt worden. Auch diesen Versuchen liegt die Methode von Glénard zugrunde, nämlich die Fällung mit Bleiacetat und Zersetzung des Niederschlages mit salzsäurehaltigem Äther. Heise findet den Beerenfarbstoff zum Teil als Glucosid, zum Teil zuckerfrei; seine Präparate, von denen nur der Heidelbeerfarbstoff analysiert worden ist, waren amorph und weder rein noch intakt.

Eine neue Anregung für die Gewinnung der Anthocyane ist von einer Untersuchung ausgegangen, die der Botaniker H. Molisch<sup>6)</sup> im Jahre 1905 veröffentlicht hat. Molisch hat in Blüten und roten Blättern einer beträchtlichen Anzahl von Pflanzen beobachtet, daß das Anthocyan nicht bloß im Zellsaft gelöst, sondern auch in fester Form ausgeschieden vorkommt, entweder krystallisiert oder in amorph erscheinenden Ballen. Bei manchen Pflanzen ist es Molisch gelungen, auch außerhalb der Zellen mikroskopische Krysallisationen von Anthocyan abzuscheiden. Ein Blumenblatt wurde mit Wasser oder Essigsäure oder verdünnter Salzsäure zerdrückt und die Lösung auf dem Objektträger unter dem Deckglase verdunstet. Mitunter, z. B. bei Pelargonien- und Rosenblüten, traten unter dem Rande des Deckgläschens schöne rote Krystalle auf.

Unter dem Einfluß dieser Arbeit hat V. Grafe<sup>7)</sup> im pflanzenphysiologischen Institut in Wien eingehender und in präparativem Maßstab einige Anthocyane untersucht, namentlich den Farbstoff der

<sup>1)</sup> Die Chemie des Weines, S. 44 und 228 (Leipzig 1856).

<sup>2)</sup> C. r. 47, 268 [1858]; A. ch. [3] 54, 366 [1858].

<sup>3)</sup> C. r. 86, 1507 und 87, 64 [1878].

<sup>4)</sup> J. pr. 62, 269 [1854].

<sup>5)</sup> Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte 5, 618 [1889] und 9, 513 [1895].

<sup>6)</sup> Botan. Ztg. 63, 145 [1905].

<sup>7)</sup> Sitzungsber. d. Wiener Akad. d. Wissensch., math.-nat. Kl. 115, 975 [1906]; 118, 1033 [1909]; 120, 765 [1911].

Pelargonie, aber seine Resultate erfordern in den wesentlichen Punkten Richtigstellung.

### Eigenschaften der Anthocyane<sup>1)</sup>.

Die Anthocyane sind stickstofffreie und dennoch basische Farbstoffe. Auf ihre basische Natur läßt sich ihre Isolierung viel besser gründen, als auf die phenolischen Eigenschaften.

Mit Mineralsäuren und mit organischen Säuren bilden die Anthocyane ausgezeichnet krystallisierende Salze. Es sind Oxoniumsalze; den vierwertigen Sauerstoff nehmen wir in ihnen chinoid gebunden an, um die stark basischen Eigenschaften zu erklären.

Die Verbindungen der Anthocyane mit Säure sind rot, ihre neutrale Form, die als Phenolbetain zu verstehen ist, violett und die Alkalisalze blau. Viele Variationen der Blütenfarben beruhen auf dem Vorkommen dieser drei Verbindungsformen.

Die Anthocyane entfärben sich in ihren Lösungen, in den neutralen und noch leichter in den Alkalisalz-Lösungen. Diese Erscheinung ist oft als eine Reduktion angesprochen worden. Aber die Farbe kehrt beim Ansäuern quantitativ wieder. Die Entfärbung ist daher eine Isomerisation. Durch hydrolytische Dissoziation entsteht aus dem Salze die Farbbase, die sich durch Wanderung des Hydroxyls vom Sauerstoff an Kohlenstoff in eine Pseudobase, in ein Carbinol, verwandelt. Die Reaktion entspricht daher der Bildung von Rosanilin aus Fuchsin.

Die Anthocyane sind Glucoside, und zwar finden sie sich in der Pflanze häufig quantitativ oder fast quantitativ als Glucoside.

Bei kurzem Erhitzen mit 20-prozentiger Salzsäure werden die Anthocyane vollständig gespalten in Zucker und die eigentlichen Farbstoffkomponenten, die ich Anthocyanidine genannt habe.

Die Verteilung zwischen Amylalkohol und verdünnter Säure ermöglicht nach Willstätter und Everest Anthocyan und Anthocyanidin zu unterscheiden. Das Glucosid wird von der verdünnten Säure aufgenommen, das zuckerfreie Derivat geht quantitativ in den Amylalkohol über.

### Methoden der Isolierung<sup>2)</sup>.

In manchen Fällen gelingt die Isolierung durch Extrahieren der Blüten oder der Beerenhäute mit Alkohol oder Eisessig, Fällen der Extrakte mit Äther und Krystallisieren der Rohfällung aus Salzsäure.

<sup>1)</sup> Vergl. R. Willstätter und A. E. Everest, A. 40f, 189 [1913].

<sup>2)</sup> Nach unveröffentlichten Arbeiten.

Zumeist ist aber schon ein beträchtlicherer Reinheitsgrad des Farbstoffes erforderlich, damit das Chlorid sich abscheidet, selbst wenn es in reinem Zustande schwer löslich ist. Wenn durch die Wirkung der Begleitstoffe die Abscheidung der Anthocyanosalze verhindert wird, so führen wir eine vorsichtige Hydrolyse der beigemischten hochmolekularen Stoffe aus. Die sirupösen Rohprodukte werden mit verdünnter Säure gelinde erwärmt oder mit Alkohol, Essigsäure und etwas Salzsäure stehen gelassen; dann verändern sich die Begleitstoffe derart, daß ihre lösende Wirkung sich vermindert und daß es gelingt, den Farbstoff auszufällen.

Ein zweites Verfahren ist die Fällung von Anthocyanen in der Form ihrer schwer löslichen, gut krystallisierenden Pikrate, also eine Methode, mit welcher man die Pflanzenalkaloide abscheidet. Hr. Zollinger hat das Pikratverfahren zuerst bei dem Farbstoff der Weintraube angewandt, es ist dann auch bei mehreren anderen Beeren- und Blütenfarbstoffen erfolgreich gewesen. Aus den Häuten der Weintraube kann man in einigen Minuten die schönen roten Krystalle des Anthocyan-pikrats gewinnen; mit methylalkobolischer Salzsäure wird dieses in Chlorid umgewandelt.

#### Die Anthocyane und Anthocyanidine<sup>1)</sup>.

Das erste, in Krystallen des Chlorids erhaltene Anthocyan war der Farbstoff der Kornblume, das Cyanin von Willstätter und Everest; in der blauen Blüte findet es sich als Kaliumsalz.

Eine Untersuchung des Hrn. Nolan betrifft den Farbstoff der Rose. Er hat sich als identisch mit dem Cyanin erwiesen. Die Rose ist dafür ein viel besseres Ausgangsmaterial als die Kornblume; man gewinnt leicht annähernd 1% der trocknen Blüte an krystallisiertem Cyaninchlorid.

Das Cyanin zerfällt in zwei Moleküle Glucose und in Cyanidin.

Nach einer Arbeit des Hrn. Mallison ist der Farbstoff der Preiselbeere, das Idaein, eine Verbindung des nämlichen Cyanidins. Das Idaein besteht aus je einem Mol Galaktose und Cyanidin.

Dem Cyanidin ist auf Grund einer nur vorläufigen analytischen Untersuchung zuerst die Formel  $C_{16}H_{13}O_7Cl$  zugeschrieben worden. Die eingehendere Untersuchung hat ergeben, daß das für wasserfrei gehaltene Chlorid sehr hartnäckig Wasser gebunden hält, das im Vakuum der Quecksilberpumpe erst bei  $105^{\circ}$  entweicht. Die Formel ist abzuändern; die Zusammensetzung des Chlorides ist  $C_{15}H_{11}O_6Cl$ , also der säurefreien Form  $C_{15}H_{10}O_6$ .

<sup>1)</sup> Nach unveröffentlichten Arbeiten.

Das Anthocyan der Scharlach-Pelargonie ist zufolge einer Untersuchung des Hrn. Bolton das Diglucosid eines Anthocyanidins (Pelargonidin), welches um ein Sauerstoffatom ärmer ist als Cyanidin. Seine Formel ist also  $C_{15}H_{10}O_5$ .

Das Anthocyan des Rittersporns (Delphinium Consolida) hat Hr. Mieg in reinem Zustand gewonnen. Es findet sich in der violetten Blüte als Farbbase. Dieses Delphinin ist etwas komplizierter zusammengesetzt, bei der Hydrolyse zerfällt es in zwei Mole Glucose, zwei Mole *p*-Oxy-benzoesäure und ein Mol des Anthocyanidins. Letzteres, das Delphinidin, entspricht als Chlorid der Formel  $C_{15}H_{11}O_7Cl$ , enthält also ein Atom Sauerstoff mehr als Cyanidin.

Die Derivate des Delphinidins scheinen in den tiefvioletten und blauen Blüten und Früchten verbreitet zu sein. Wir haben nämlich vier andre Anthocyane gewonnen, die sich von Methyläthern des Delphinidins ableiten.

Der Farbstoff der Weintraube (Oenin) war leicht in prächtigen Krystallen zu gewinnen. Er ist nach Versuchen des Hrn. Zollinger ein Monoglucosid. Seinem Anthocyanidin, Oenidin, kommt die Formel  $C_{17}H_{14}O_7$  zu. Das Oenidin verliert beim Erwärmen mit Jodwasserstoffsäure zwei Methyle und geht dabei in Delphinidin über, es ist ein Dimethyläther desselben.

Ein isomerer Dimethyläther (mit anderer Stellung eines Methyles) ist nach einer Untersuchung des Hrn. Mieg das Anthocyanidin aus der Waldmalve, Malvidin, welches mit zwei Molekülen Glucose verbunden auftritt. Diese Isomeren unterscheiden sich in charakteristischen Löslichkeitsverhältnissen ihrer wohlkrystallisierten Chloride und Sulfate.

Einen Monomethyläther des Delphinidins erhalten wir bei der Hydrolyse zweier einander sehr ähnlicher Anthocyane. Der Farbstoff der Heidelbeere und derjenige der Stockrose oder schwarzen Malve (*Althaea rosea*) sind nach Arbeiten der HHrn. Martin und Zollinger Monoglucoside, denen dasselbe Anthocyanidin zugrunde liegt; es ist Myrtilidin genannt worden.

Eine alte strittige Frage, ob das Anthocyan des Rotweins und der Heidelbeere identisch sind, wird dadurch gelöst. Sie sind verschieden und leicht zu unterscheiden, z. B. durch die intensive violette Eisenchlorid-Reaktion, welche der Monomethyläther Myrtilidin (und sein Glucosid) noch ebenso wie Delphinidin selbst zeigt, während der Weinfarbstoff keine Farbreaktion gibt.

Die Mengen der Anthocyane in den Pflanzenteilen schwanken in weiten Grenzen. Sie sind in manchen Blüten sehr groß, bei Pelargonie und Waldmalve  $6\frac{1}{2}$ — $7\frac{1}{2}$  % der trocknen Blüte, bei den Beerenfrüchten

viel niedriger, z. B. bei der Preiselbeere 0.4% der getrockneten Beerenhaut.

### Konstitution der Anthocyanidine.

Die Anthocyanidine stehen nach ihrer empirischen Zusammensetzung in naher Beziehung zu den in den Pflanzen sehr verbreiteten gelben Beizenfarbstoffen, besonders zu den Farbstoffen der Flavon- und Flavonolgruppe, welche durch ausgezeichnete analytische Untersuchungen vieler Chemiker, namentlich von H. Hlasiwetz und L. Pfaundler und in neuerer Zeit von A. G. Perkin, sowie J. Herzig, und durch die kunstvollen, erfolgreichen Synthesen von St. v. Kostaněcki<sup>1)</sup> und seinen Mitarbeitern (J. Tambor, V. Lampe u. a.) gründlich erforscht sind.

Das Cyanidin in seiner säurefreien Form ist isomer mit Luteolin und Kämpferol; Pelargonidin ist isomer mit Apigenin und Galangin, Delphinidin ist isomer mit Quercetin und Morin.

Auch im Verhalten zeigt sich eine Analogie, welche für die Ermittlung der Struktur von Bedeutung ist. Diese Farbstoffe werden gleich den bekannten Flavonderivaten durch Erhitzen mit Alkalien zersetzt und liefern am Ende zwei aromatische Spaltungsprodukte, ein Phenol und eine Carbonsäure.

Als phenolische Komponente entsteht aus den sämtlichen bisher untersuchten Anthocyanidinen Phloroglucin und zwar entweder dieses selbst oder sein Monomethyläther. Im zweiten Produkt der Spaltung kommt die Abstufung des Sauerstoffgehaltes zum Ausdruck; wir erhielten nämlich:

*p*-Oxy-benzoesäure aus Pelargonidin,  
 Protocatechusäure aus Cyanidin,  
 Gallussäure aus Delphinidin

und aus den methylierten Delphinidinen zum Teil ebenfalls Gallussäure, zum Teil Gallussäure-methyläther.

Mit dem Anwachsen der Hydroxyle in dem als Oxysäure abgespaltenen Phenylreste geht Hand in Hand die Vertiefung der Farbe: vom Scharlachrot des Pelargonidins zum Carminrot des Cyanidins und zum Blaurot des Delphinidins. Auch die Ausfärbungen auf der Faser, am besten auf zinngebeizter Wolle oder tannierter Baumwolle, zeigen diese Abstufung; Pelargonidin färbt rot, Cyanidin violett, Del-

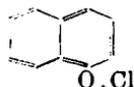
<sup>1)</sup> Synthese von Chrysin, B. **32**, 2448 [1899]; **37**, 3167 [1904]; Apigenin, B. **33**, 1988 [1900]; **38**, 931 [1905]; Luteolin, B. **33**, 3410 [1900]; **37**, 2625 [1904]; Fisetin, B. **37**, 784 [1904]; Quercetin, B. **37**, 1402 [1904]; Kämpferol, B. **37**, 2096 [1904]; Morin, **39**, 625 [1906].

phinidin blau. Die Anthocyanidine ziehen gut auf, die Färbungen sind lichtecht, aber nicht seifenecht.

Nach den Ergebnissen des Abbaues sind die Ansichten zu prüfen, mit welchen Willstätter und Everest die Konstitution des Cyanidins zu erklären versucht haben.

Es bestätigt sich, daß diese Farbstoffe Oxoniumverbindungen sind, welche sich von dem Phenopyrylium oder Benzopyrylium ableiten, das H. Decker und Th. von Fellenberg<sup>1)</sup> in einer grundlegenden Untersuchung synthetisch erhalten und in der Form seines Eisen- und Goldchlorid-Doppelsalzes sowie in zahlreichen Substitutionsprodukten beschrieben haben. Unter die Phenopyrylium-Derivate hat Decker auch eine Anzahl synthetischer Farbstoffe eingereiht, namentlich die Benzopyraole von Bülow.

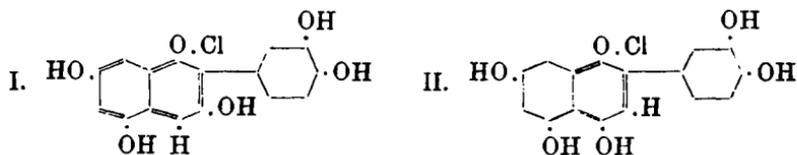
Über die Annahme der Doppelbindungen im Benzopyrylium sind verschiedene Auffassungen möglich. Ich lege der Betrachtung des Cyanidins die von W. H. Perkin und R. Robinson<sup>2)</sup> angenommene orthochoinoide Formel des Benzopyryliums zugrunde:



Willstätter und Everest hatten einen konstitutionellen Unterschied von den Flavonen in der parachinoiden Anordnung des ätherartigen Sauerstoffatoms der Anthocyane gesucht und daher in dem Benzopyron die Oxy-hydrochinon-Stellung der Hydroxyle vermutet. Diese Vermutung hat sich nicht bestätigt. Der Unterschied zwischen Flavonen und Anthocyanen liegt vielmehr nur darin, daß die einen Pyrone, die andren Pyryliumverbindungen sind.

Die Produkte der Alkalisplaltung lassen für den Pyronkern der Anthocyane in allen Fällen außer der Oxoniumgruppe nur ein einziges Sauerstoffatom übrig.

Infolgedessen ist für Cyanidinchlorid zwischen den beiden folgenden Formeln die Wahl zu treffen:

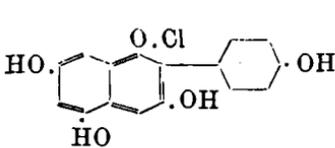


<sup>1)</sup> A. 356, 281 [1907] und 364, 1 [1908].

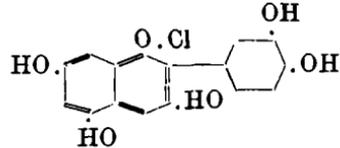
<sup>2)</sup> Soc. 93, 1085 [1908].

Von diesen Formeln ist die zweite zu verwerfen, weil sie nur eine besondere Schreibweise des Chlorhydrates von Luteolin bedeutet. Es ist daher anzunehmen, daß eine Hydroxylgruppe dieselbe Stellung wie in den Flavonolen einnimmt. Demgemäß sind den Anthocyanidinen die in der Tabelle aufgestellten Strukturformeln<sup>1)</sup> zuzuschreiben.

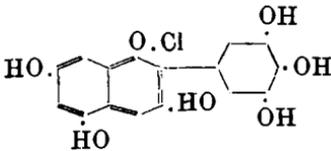
### Anthocyanidine.



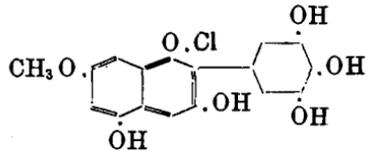
Pelargonidinchlorid.  
(Aus der Pelargonie.)



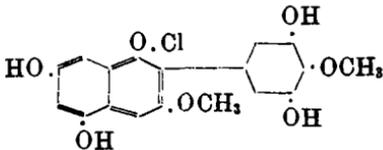
Cyanidinchlorid.  
(Aus der Kornblume und der Rose.)



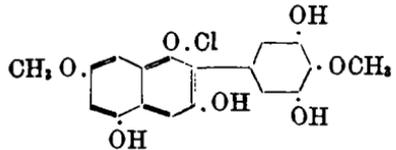
Delphinidinchlorid.  
(Aus dem Rittersporn.)



Myrtillinidinchlorid.  
(Aus Heidelbeere und Stockrose.)

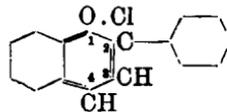
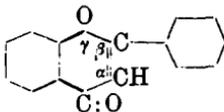


Oenidinchlorid.  
(Aus dem Wein.)



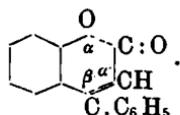
Malvidinchlorid.  
(Aus der Waldmalve.)

In dieser Betrachtung ist allerdings noch eine willkürliche Annahme gemacht worden, daß nämlich diese Verbindungen sich von einem reduzierten  $\beta$ -Phenyl- $\gamma$ -pyron ableiten, also von einem in 2-Stellung phenylierten Benzopyrylium:



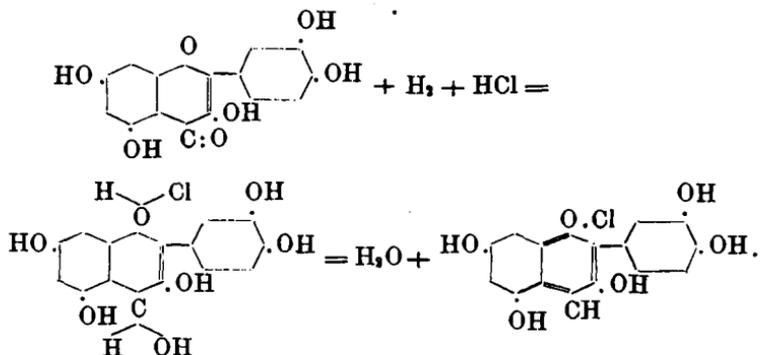
<sup>1)</sup> In den Formeln von Myrtillinidin und Oenidin ist der Ort der Methyl- noch nicht sicher bekannt.

Es könnte auch die Stellung 4 in Betracht kommen, das ist die Ableitung von einem  $\beta$ -Phenyl-benzo- $\alpha$ -pyron



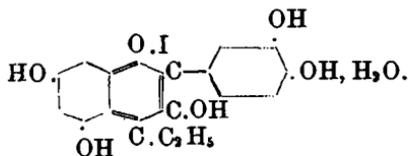
In diesem Falle sollte freilich als Zwischenprodukt der Spaltung durch Alkalien ein Benzophenon (Maclurin aus Cyanidin) auftreten; Versuche, welche ich in dieser Hinsicht mit Hrn. Mallison ausgeführt habe, haben dafür keinen Anhalt geboten.

Nach der Konstitutionsformel, die dem Cyanidin zugeschrieben wird, sollte es möglich sein, das Cyanidin aus dem Quercetin, überhaupt Anthocyanidine aus den Flavonolen zu bilden, sofern es gelänge, die Carbonylgruppen zu reduzieren:



Experimentell ist aber diese nahe Beziehung noch nicht in befriedigender Weise verwirklicht worden.

Unter den Quercetinderivaten dürfte dem Anthocyan ein Produkt am nächsten kommen, das vor kurzem E. R. Watson und K. B. Sen<sup>1)</sup> durch Einwirkung von Magnesiumäthyljodid auf Quercetin'-pentamethyläther und darauf folgende Abspaltung der Methylgruppen mit Hilfe von Jodwasserstoffsäure erhalten haben und dem sie die folgende Formel zuweisen:



<sup>1)</sup> Soc. 105, 389 [1914].

Schon die kurze Beschreibung von Watson und Sen läßt erkennen, daß hier eine dem Cyanidin verwandte Substanz vorliegt.

Die Reduktion von Quercetin und andren gelben Pflanzenfarbstoffen ist häufig untersucht worden, zuerst von W. Stein<sup>1)</sup> im Jahre 1863, dann von H. Hlasiwetz und L. Pfaundler<sup>2)</sup>, in jüngster Zeit von R. Combes<sup>3)</sup>, von E. R. Watson und K. B. Sen<sup>4)</sup> und von A. E. Everest<sup>5)</sup>.

Auch Hr. Mallison hat in meinem Laboratorium die Reduktionsprodukte studiert. Die Farbe der reduzierten Lösungen ist zwar anthocyan-ähnlich, aber die als Hauptprodukte entstehenden roten Farbsalze sind doch von unseren Anthocyanidinen wesentlich verschieden.

Sie sind sogar in saurer Lösung unbeständig. Wir halten es für wahrscheinlich, daß diese Reduktion der Flavone in der Hauptsache nicht am Carbonyl angreift, sondern den Pyronring öffnet. Unter gleichen Bedingungen schreitet die Reduktion in der Tat bis zur vollständigen Ablösung des Phloroglucins fort.

Es bleibt daher eine wichtige Aufgabe künftiger Arbeiten, die gelben und die roten Blütenfarbstoffe in einander überzuführen<sup>6)</sup>.

Die bisher untersuchten Beispiele von Anthocyanen zeigen, daß der Einheit des lebenswichtigen Chlorophylls die Variabilität der Schmuck- und Lockfarben des Pflanzenreichs gegenübersteht, und sie lehren die chemischen Ursachen der Variationen. Es ist zu erwarten, daß die Ausdehnung der analytischen Arbeit zu noch zahlreicheren Typen der Anthocyane führen wird, die eine neue Klasse von pflanzlichen Basen bilden. Vielleicht wird die synthetische Chemie einige Anregung finden durch die Vorbilder dieser schönen, lichtechten Farbstoffe.

<sup>1)</sup> J. pr. [1] 85, 351, 368 [1862]; 88, 280, 293 [1863]; 89, 491 [1863].

<sup>2)</sup> Sitzungsber. d. Wiener Akad. d. Wissensch., math.-nat. Kl. 50, 6 [1864].

<sup>3)</sup> C. r. 157, 1002, 1454 [1913].      <sup>4)</sup> Soc. 105, 389, 395 [1914].

<sup>5)</sup> Proc. Roy. Soc., B. 87, 444 [1914].

<sup>6)</sup> Einige Wochen nach diesem Vortrage ist es mir gemeinsam mit H. Mallison gelungen, bei der Reduktion des Quercetins in untergeordneter Menge, aber in reinem, krystallisiertem Zustand Cyanidinchlorid zu gewinnen und dadurch meine Annahmen von der Konstitution der Anthocyanidine zu bestätigen. Ein weiterer Beweis für die angegebenen Strukturformeln ist endlich vor kurzem von L. Zechmeister und mir durch die Synthese des Pellarгонидins erbracht worden.