

Methanol unter Verwendung von etwas Carboraffin wurde es in farblosen, zu Drusen vereinigten Nadeln erhalten, die bei 263–264<sup>0</sup> (korr., Berl) schmolzen.

4.068 mg Sbst. (im Vakuum bei 80<sup>0</sup> getrockn.): 10.92 mg CO<sub>2</sub>, 2.685 mg H<sub>2</sub>O. — 4.048 mg Sbst.: 10.89 mg CO<sub>2</sub>, 2.62 mg H<sub>2</sub>O. — 4.115 mg Sbst.: 11.035 mg CO<sub>2</sub>, 2.63 mg H<sub>2</sub>O. — 4.257 mg Sbst.: 11.46 mg CO<sub>2</sub>, 2.76 mg H<sub>2</sub>O. — 3.477 mg Sbst.: 9.39 mg CO<sub>2</sub>, 2.30 mg H<sub>2</sub>O. — 3.882 mg Sbst.: 10.42 mg CO<sub>2</sub>, 2.435 mg H<sub>2</sub>O. — 3.983 mg Sbst.: 10.72 mg CO<sub>2</sub>, 2.685 mg H<sub>2</sub>O. — 6.270, 7.185 mg Sbst. verbraucht. 3.8, 4.4 ccm n/100-NaOH.

C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub> (328.2). Ber. C 73.12, H 7.37, Äquiv.-Gew. 164.1.

Gef. C 73.21, 73.36, 73.15, 73.42, 73.66, 73.20, 73.40. H 7.39, 7.24, 7.15, 7.26, 7.40, 7.02, 7.54, Äquiv.-Gew. 165, 164.

#### Molekulargewichts-Bestimmung nach Rast:

1) 0.265 mg Sbst. in 5.05 mg Campher:  $\Delta_1 = 6.2^0$ . — 2) 0.186 mg Sbst. in 4.73 mg Campher  $\Delta_1 = 4.3^0$ . Mol.-Gew. 340, 360.

#### Chromsäure-Oxydation.

10.264, 10.884 mg Sbst.: 7.78, 8.01 ccm n/100-NaOH.

Gef. 2.49, 2.41 Mole Essigsäure.

#### Katalytische Hydrierung (Differenzialmethode).

2.590 mg Sbst. gegen 2.104 mg Sorbinsäure mit 10.1 mg Pt auf SiO<sub>2</sub> Nr. 17 v. Gef.: 3.94 | . — 0.798 mg Sbst. mit 10.03 mg SiO<sub>2</sub>, Pt. Nr. 13. Gef.: 4.0 | .

Der Deutschen Forschungs-Gemeinschaft danken wir aufrichtig für die Überlassung von Apparaten.

### 354. Richard Kuhn und Alfred Winterstein: Reduktionen mit Zinkstaub in Pyridin, III. Mitteil.<sup>1)</sup>: Umkehrbare Hydrierung und Dehydrierung der Chlorophylle<sup>2)</sup>.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]  
(Eingegangen am 19. Oktober 1933.)

Unterwirft man die Chlorophylle oder die Methyl-chlorophyllide<sup>3)</sup> dem von R. Kuhn und A. Winterstein beschriebenen Reduktions-Verfahren<sup>4)</sup> mit Zinkstaub in Pyridin unter Zusatz von etwas Eisessig, so ver-

<sup>1)</sup> II. Mitteil.: B. **65**, 1742 [1932].

<sup>2)</sup> Den Hydrierungs-Dehydrierungs-Versuch hat R. Kuhn vorgeführt am Kaiser-Wilhelm-Institut, Heidelberg, am 3. Oktober 1932 aus Anlaß eines Vortrages von L. Michaelis über Redox-Potentiale von Farbstoffen und A. Winterstein in einem Vortrag „Zur Kenntnis der Chlorophylle“ auf der Frühjahrs-Versammlung der Schweizer Chemischen Gesellschaft in Neuenburg am 25. Februar 1933.

<sup>3)</sup> Ein Teil der Versuche wurde mit einem Präparat von Methyl-chlorophyllid aus Heracleum (Gemisch von a + b) ausgeführt, das wir der Freundlichkeit von Hrn. Prof. Dr. A. Stoll, Basel, verdanken.

<sup>4)</sup> R. Pummerer u. G. Dorf Müller, B. **46**, 2386 [1913], haben bereits einen gelben Kohlenwasserstoff der Fluoren-Reihe mit etwas Eisessig und Zinkstaub in Pyridin-Lösung reduziert. Wir sind Hrn. R. Pummerer für den freundlichen Hinweis auf dieses frühe Beispiel für das in unseren Mitteilungen beschriebene Reduktions-Verfahren sehr dankbar. Die Vorteile und der weite Anwendungs-Bereich, besonders auf so empfindliche Substanzen, wie Carotinoide, Cyanin-Farbstoffe, Cyanidine und Chlorophylle, waren nicht vorauszusehen.

schwindet die grüne Farbe nach einigen Sekunden. Unter Luft-Abschluß erhält man ein braunes Filtrat, das bei Zutritt von Sauerstoff wieder tief grüne Farbe mit roter Fluorescenz annimmt. Durch Überführung der Farbstoffe in Benzin und chromatographische Trennung durch Adsorption an Saccharose lassen sich gefärbte Anteile abtrennen, die Zersetzungsprodukte der Chlorophylle darstellen. Die regenerierten Farbstoffe sind spektroskopisch mit dem Ausgangsmaterial identisch. Sie geben, wie dieses, eine sehr gute Phasen-Probe, sind also vor Allomerisation verschont geblieben. Die Asche besteht aus reinem Magnesiumoxyd, es hat also kein Ersatz des Magnesiums durch Zink stattgefunden. Die Unlöslichkeit in Alkali beweist die Unversehrtheit der Estergruppen. Mit 2-n. Salzsäure entstehen Spaltungsprodukte, die spektroskopisch genau übereinstimmen mit denjenigen, die der ursprüngliche Farbstoff unter denselben Bedingungen liefert. Die Elementaranalysen von regeneriertem Chlorophyll a und b stimmen mit den von A. Winterstein und G. Stein<sup>5)</sup> angegebenen, auf die Formeln  $C_{55}H_{72(+2)}O_5N_4Mg$  bzw.  $C_{55}H_{72(\pm 2)}O_6N_4Mg$  überein.

Die Ausbeuten an regeneriertem Chlorophyll betragen nach chromatographischer Reinigung 70–80% des angewandten Farbstoffs.

An magnesium-freien Derivaten von Chlorophyll a und b haben A. Stoll und E. Wiedemann<sup>6)</sup> gezeigt, daß durch katalytische Hydrierung farblose Perhydro-porphyrine erhältlich sind, die an der Luft sehr schnell zu Porphyrinen dehydriert werden. Diese Reaktion erinnert an die katalytische Hydrierung von Proto-porphyrin und Meso-porphyrin zum farblosen Meso-porphyrinogen, das schon durch Luft-Sauerstoff zu Meso-porphyrin dehydriert wird<sup>7)</sup>. Auch nach unserem Verfahren lassen sich Proto-porphyrin, sowie Phäophorbid und Phäophytin zu Leuko-verbindungen reduzieren. Beim Phäophorbid a<sup>8)</sup>, sowie Phäophytin a + b wurden nach Einwirkung des Luft-Sauerstoffs nicht die ursprünglichen Verbindungen, sondern komplexe Zinkverbindungen zurückerhalten. Die aus einem Gemisch von Phäophytin a + b erhaltenen Zinkverbindungen ließen sich durch Adsorption an Zucker in die dem Chlorophyll a und b entsprechenden Komponenten zerlegen. Sie geben ähnliche Phasen-Proben wie die Chlorophylle; die Absorptionsbanden sind gegenüber den Chlorophyllen um 3–4 m $\mu$  nach dem kurzwelligen Gebiet des Spektrums verschoben. Die Zinkverbindungen enthalten 4,26% Zn, dürften also mit der von R. Willstätter und K. Sjöberg<sup>9)</sup> durch Behandeln von Phäophytin in Eisessig mit Zinkacetat erhaltenen Phäophytin-Zinkverbindung identisch sein.

Das Reduktionsverfahren mit Zinkstaub und Pyridin-Acetat führt also bei metall-freien Derivaten der Chlorophylle zu Zink-Komplexen, aber es ist doch so gelinde, daß komplex gebundenes Magnesium nicht verdrängt wird. Zwischen den Porphyrinen und Häminen besteht der scharfe Unterschied, daß nur erstere zu farblosen Porphyrinogenen hydrierbar sind, die ihrerseits kein Eisen komplex

<sup>5)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **220**, 263 [1933].      <sup>6)</sup> Naturwiss. **20**, 791 [1932].

<sup>7)</sup> R. Kuhn u. C. Seyffert, B. **61**, 2509 [1928].

<sup>8)</sup> Für die Überlassung eines Präparates von reinem Phäophorbid a sind wir Hrn. Prof. Dr. A. Stoll, Basel, zu großem Danke verpflichtet.

<sup>9)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **138**, 171 [1924].

zu binden vermögen. Auch nach unserem Reduktions-Verfahren läßt sich Hämin, im Gegensatz zu Porphyrinen, nicht entfärben. Es ist daher unerwartet und pflanzen-physiologisch bemerkenswert, daß unter den von uns aufgefundenen Bedingungen Hydrierung und anschließende Dehydrierung des Chlorophylls unter Erhalt des komplex gebundenen Magnesiums stattfindet.

H. Fischer, O. Süss und G. Klebs<sup>10)</sup> haben die Möglichkeit erörtert, daß normalerweise Chlorophyll im Blatt ständig dehydriert (wie unter Chinon-Einfluß) und wieder hydriert wird, demgemäß eine ähnliche Funktion besitzt wie Glutathion. Nach dieser Auffassung würden im System Chlorophylle  $\rightleftharpoons$  Dehydro-chlorophylle die Chlorophylle als Wasserstoff-Donatoren fungieren. Unsere Versuche legen die Annahme nahe, daß für die Assimilation ein System Chlorophylle  $\rightleftharpoons$  Leuko-chlorophylle von Bedeutung sein kann, in dem die braunen Leuko-chlorophylle den Wasserstoff für die Reduktion der Kohlensäure liefern.

In einer Abhandlung, die A. Stoll über den chemischen Verlauf der Photo-synthese veröffentlicht hat, findet sich bereits eine Stelle<sup>11)</sup>, an der aktivierte Kohlensäure als Acceptor des aktiven Wasserstoffs der höheren Hydrierungs-Stufen des Chlorophylls angesprochen wird. In der Zusammenfassung derselben Abhandlung wird im Gegensatz dazu, nach (1) Bindung und (2) Auflockerung der Kohlensäure, (3) eine Dehydrierung des Chlorophylls und (4) Wieder-aufladung des Chlorophylls mit Wasserstoff angenommen<sup>12)</sup>.

Die von uns erörterte Möglichkeit entspricht der erstgenannten Meinung von A. Stoll. Diese wurde von ihm durch das Verhalten der metall-freien Chlorophyll-Derivate bei der katalytischen Hydrierung gestützt<sup>13)</sup>, wobei es ihm wesentlich schien, daß Hydrierung und Dehydrierung an der „überzähligen“ Doppelbindung, wie an „C<sub>9</sub>“ nur unwesentliche Verschiebungen im Spektrum des Chlorophylls zur Folge haben. Es zeigt sich nun, daß die reversiblen Leuko-chlorophylle ganz andere Eigenschaften besitzen, als die bekannten Hydro-verbindungen. Sie unterscheiden sich durch ihre braune Farbe, die an diejenige der „braunen Phasen“ erinnert, spektroskopisch grundlegend vom Chlorophyll.

Nachdem die bisher nur vermutete, unkehrbare Reaktion Chlorophylle  $\rightleftharpoons$  Leuko-chlorophylle verwirklicht ist, wird es möglich sein, Hypothesen über den Mechanismus der Kohlensäure-Assimilation, bei denen Leuko-chlorophylle eine Rolle spielen, experimentell zu prüfen.

<sup>10)</sup> A. **490**, 38 [1931], u. zw. S. 55; H. Fischer u. H. Siebel, A. **499**, 84 [1932], u. zw. S. 95.

<sup>11)</sup> Naturwiss. **20**, 955 [1932], u. zw. S. 957.

<sup>12)</sup> a. a. O., S. 958. An diese Stelle, die grundsätzlich mit der Ansicht von H. Fischer übereinstimmt, knüpft R. Willstätter an, Naturwiss. **21**, 252 [1933], der Mono-dehydro-chlorophyll als Zwischenprodukt der Kohlensäure-Assimilation in Betracht zieht.

<sup>13)</sup> A. Stoll erwähnt a. a. O. auch Dihydro-verbindungen von Chlorophyll a und b, die durch katalytische Hydrierung erhältlich sind. Nach der genauen Beschreibung der entsprechenden metall-freien Verbindungen durch H. Fischer u. E. Lakatos, A. **506**, 123 [1933], sind diese Dihydro-verbindungen unter den verschiedensten Bedingungen gegen Luft-Sauerstoff völlig beständig und auch spektroskopisch mit unseren höchst sauerstoff-empfindlichen, braunen Leuko-chlorophyllen nicht zu verwechseln.

### Beschreibung der Versuche.

#### Hydrierung und Dehydrierung von Chlorophyll a.

100 mg reines Chlorophyll a<sup>14)</sup> werden in 50 ccm absol. Pyridin gelöst, dem 0.5 ccm Wasser zugefügt werden. Nach Zugabe von 7.5 g Zinkstaub setzt man unter Schütteln im Verlauf von 2–3 Min. tropfenweise so viel Eisessig (0.5–1 ccm) zu, bis sich die Lösung eben schwach zu erwärmen beginnt. Die Farbe der Lösung fängt dabei an, nach braun unzuschlagen, nach 15–20 Sek. ist die grüne Farbe vollständig verschwunden und hat einer rein braunen Farbe Platz gemacht. Man nutschts sofort ab, wobei ein rein braunes Filtrat erhalten wird, das beim Schütteln an der Luft nach wenigen Sekunden wieder die ursprüngliche, tief grüne Farbe annimmt. Nach Zusatz von 100 ccm Benzin (Sdp. 70–80°) wird das Pyridin, ohne zu schütteln, mit insgesamt 2 l Wasser ausgewaschen. Spuren Pyridin, die in der Benzin-Lösung verbleiben, schaden bei der nachfolgenden Adsorption nicht. Man adsorbiert nach den Angaben von A. Winterstein und G. Stein<sup>14)</sup> an Saccharose in einem Adsorptions-Rohr von 20 cm Höhe und 6 cm Durchmesser. Durch Nachwaschen mit Benzin erhält man 3 Zonen; die unterste, hellgrau gefärbte enthält Zersetzungsprodukte des Chlorophylls (wahrscheinlich Phäophytin), die mittlere, rein blau gefärbte, Chlorophyll a, die oberste, schmale, schwarz gefärbte enthält unbekannte Zersetzungsprodukte. Das Chlorophyll a wird durch Elution mit Äther, Verdampfen des Äthers im Vakuum und Umfällen aus Äther mit Petroläther in reinem Zustand erhalten. Das regenerierte Chlorophyll a zeigte eine tadellose Phasen-Probe und besaß in Äther folgende Absorptionsbanden<sup>15)</sup>:

663 623 607 577 534 507 494 432 m $\mu$ .

Zur Analyse wurde das regenerierte Chlorophyll a im Hochvakuum bei 35° zur Gewichts-Konstanz getrocknet.

3.453 mg Sbst.: 9.24 mg CO<sub>2</sub>, 2.41 mg H<sub>2</sub>O, 0.153 mg MgO. — 3.680 mg Sbst.: 9.70 mg CO<sub>2</sub>, 2.64 H<sub>2</sub>O, 0.173 mg MgO. — 5.233 mg Sbst.: 0.278 ccm N (21°, 747 mm). — 4.800 mg Sbst.: 0.270 ccm N (30°, 755 mm).

C <sub>55</sub> H <sub>72</sub> O <sub>5</sub> N <sub>4</sub> Mg.	Ber. C 73.91,	H 8.13,	N 6.26,	Mg 2.72.
C <sub>55</sub> H <sub>74</sub> O <sub>5</sub> N <sub>4</sub> Mg.	Ber. C 73.75,	H 8.34,	N 6.26,	Mg 2.72.
	Gef. .. 73.00, 73.73,	„ 7.81, 8.03,	„ 6.06, 6.29,	„ 2.67, 2.83.

#### Hydrierung und Dehydrierung von Chlorophyll b.

Die Reduktion von Chlorophyll b wurde in genau der gleichen Weise durchgeführt wie bei Chlorophyll a. Bei der chromatographischen Reinigung bildete das Chlorophyll b im oberen Teil des Adsorptions-Rohres eine grün-gelbe Zone. Es gab eine tadellose, rotbraune Phasen-Probe und besaß in Äther folgende Absorptionsbanden<sup>15)</sup>:

644 614 594 567 642 503 456 428 m $\mu$ .

Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 35° zur Gewichts-Konstanz getrocknet.

<sup>14)</sup> Dargestellt nach A. Winterstein u. G. Stein, Ztschr. physiol. Chem. **220**, 272 [1933].

<sup>15)</sup> s. hierzu die Bemerkungen bei A. Winterstein u. G. Stein, Ztschr. physiol. Chem. **220**, 269 [1933].

4.205 mg Sbst.: 11.18 mg CO<sub>2</sub>, 3.12 mg H<sub>2</sub>O, 0.180 mg MgO. — 4.131 mg Sbst.: 10.97 mg CO<sub>2</sub>, 3.00 mg H<sub>2</sub>O, 0.176 mg MgO. — 4.855 mg Sbst.: 0.254 ccm N (25°, 753 mm). — 5.930 mg Sbst.: 0.315 ccm N (26°, 755 mm).

C<sub>55</sub>H<sub>70</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub>Mg. Ber. C 72.77, H 7.78, N 6.16, Mg 2.68.

C<sub>55</sub>H<sub>72</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub>Mg. Ber. C 72.61, H 7.99, N 6.16, Mg 2.68.

C<sub>55</sub>H<sub>71</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub>Mg. Ber. C 72.45, H 8.19, N 6.16, Mg 2.68.

Gef. „ 72.51, 72.42, „ 8.30, 8.13, „ 5.94, 6.06, „ 2.58, 2.57.

Behandlung von Phäophytin (a + b) mit Zink in Pyridin-Eisessig.

200 mg Phäophytin (a + b) wurden in 50 ccm wasser-freiem Pyridin gelöst und mit 0,5 ccm Wasser versetzt. Nach Zusatz von 7,5 g Zinkstaub wurde tropfenweise Eisessig zugegeben, bis die Lösung sich schwach zu erwärmen begann und an der Flüssigkeits-Oberfläche ein grüner Farbton zu beobachten war. Es wurde noch 1 Min. geschüttelt und dann abgenutscht. Die braune Farbe der Lösung schlug beim Schütteln an der Luft in grün um. Nach Versetzen mit 100 ccm Benzin wurde das Pyridin mit viel Wasser ausgewaschen und die getrocknete Benzin-Lösung, wie oben beschrieben, durch Saccharose filtriert. Durch Nachwaschen mit Petroläther und Benzin wurde zum Chromatogramm entwickelt. Die oberste und unterste, grau gefärbte Zone enthielt Zersetzungsprodukte bzw. unverändertes Phäophytin. Die zweit-unterste, blau gefärbte Zone enthielt die Zinkverbindung von Phäophytin a, die darüberliegende, grüngelb gefärbte Zone diejenige von Phäophytin b. Die beiden Zinkverbindungen geben ähnliche Phasen-Proben wie die Chlorophylle, die Absorptionsbanden sind um 3—4 m $\mu$  nach dem kurzwelligen Gebiet des Spektrums verschoben.

Die beiden mittleren Zonen wurden mit Äther eluiert, der Äther im Vakuum verdampft und zur Analyse im Hochvakuum bei 35° zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das Präparat bestand zu etwa 75 % aus Phäophytin-Zinkverbindung a und 25 % Phäophytin-Zinkverbindung b<sup>16)</sup>.

4.018 mg Sbst.: 10.74 mg CO<sub>2</sub>, 7.84 mg H<sub>2</sub>O, 0.214 mg ZnO. — 5.840 mg Sbst.: 0.290 ccm N (21°, 747 mm). — 6.803 mg Sbst.: 0.359 mg ZnO.

(C<sub>35</sub>H<sub>42</sub>O<sub>5</sub>N<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Zn. Ber. C 73.23, H 8.04, N 6.21, Zn 3.62.

Gef. „ 72.90, „ 7.84, „ 5.67, „ 4.28, 4.24.

In gleicher Weise wurde auch Methyl-chlorophyllid (a + b) reduziert und die Zinkverbindung aus Phäophorbid a dargestellt. Die regenerierten Farbstoffe, die zu den folgenden Analysen dienten, waren jedoch nicht chromatographisch gereinigt worden.

#### Methyl-chlorophyllid.

5.081 mg Sbst.: 0.385 ccm N (20°, 752 mm). — 5.060 mg Sbst.: 0.377 ccm N (22°, 752 mm). — 4.646 mg Sbst.: 0.316 mg MgO.

C<sub>36</sub>H<sub>36</sub>O<sub>5</sub>N<sub>4</sub>Mg. Ber. N 8.91, Mg 3.86. Gef. N 8.68, 8.53, Mg 3.64.

#### Zinkverbindung von Phäophorbid a.

2.998, 2.914 mg Sbst.: 0.406, 0.389 mg ZnO.

C<sub>35</sub>H<sub>36</sub>O<sub>5</sub>N<sub>4</sub>Zn. Ber. Zn 9.92. Gef. Zn 10.90, 10.97.

<sup>16)</sup> Bestimmt nach den Angaben von A. Winterstein u. G. Stein, Ztschr. physiol. Chem. **220**, 270 (1933).