

73. Die kristallisierten natürlichen Chlorophylle a und b

9. Mitteilung über Chlorophyll¹⁾

von **A. Stoll** und **E. Wiedemann**

Herrn Prof. Dr. P. KARRER zum 70. Geburtstag gewidmet

(7. II. 59)

Einleitung. Seit 1953 ist über die Kristallisation von Chlorophyll a wiederholt berichtet worden²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾. Mit diesen Arbeiten wird versucht, für Chlorophyll a den Nachweis des mikrokristallinen Zustandes mit Hilfe von DEBYE-SCHERRER-Diagrammen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu erbringen³⁾⁵⁾. Abgesehen davon, dass für elektronenmikroskopische Präparate einer Substanz von der Empfindlichkeit des Chlorophylls ein Genuinitätsbeweis kaum geliefert werden kann, dürften in den photographierten «rolled sheets» Bruchstücke von amorphen Filmen, nicht aber Chlorophyll-a-Kristalle vorgelegen haben.

Um das Vorliegen kristallisierten Chlorophylls zu beweisen, ist unseres Erachtens nicht nur eine entsprechende photographische Dokumentation, sondern auch der Nachweis erforderlich, dass diese Kristalle aus reinem Chlorophyll bestehen, also das entsprechende Absorptionsspektrum ergeben, eine positive Phasenprobe zeigen, Wachs natur besitzen und die Phytol estergruppe enthalten.

Unsere Versuche, über die wir anlässlich der Jahresversammlung der Gesellschaft deutscher Chemiker am 14. September 1955 in München vorläufig berichtet haben⁶⁾, konnten zeigen, dass reinste Präparate sowohl von Chlorophyll a als auch von Chlorophyll b nicht nur mikrokristallin, sondern auch in schönen makroskopischen Kristallen erhalten werden können, die alle erforderlichen Reinheitskriterien erfüllen. Die Frage der Kristallisierbarkeit der Chlorophylle a und b dürfte damit abschliessend positiv beantwortet sein. Im Zusammenhang damit auf die Frage der Kristallisierbarkeit der Chlorophyllide und Phäophorbide einzugehen⁴⁾, dürfte sich schon deshalb erübrigen, weil diese höheren Chlorophyllderivate seit mehr als 45 Jahren als prächtig kristallisierte Verbindungen bekannt sind⁷⁾. Wir beschränken uns daher im folgenden auf die Beschreibung unserer Arbeitsweise zur Gewinnung reiner Präparate von Chlorophyll a und b, der Kristallisation dieser Präparate, sowie der Reinheitskriterien, denen diese Kristallisationen vollauf genügen, und belegen unsere wichtigsten Befunde mit den bereits anlässlich unseres Vortrages⁶⁾ im Lichtbild gezeigten photographischen Dokumenten.

¹⁾ 8. Mitteilung: Helv. **17**, 837 (1934).

²⁾ EARL E. JACOBS, A. E. VATTER & A. S. HOLT, Journ. chem. Physics **21**, 2246 (1953); EARL E. JACOBS & A. S. HOLT, *ibid.* **22**, 142 (1954).

³⁾ EARL E. JACOBS, A. E. VATTER & A. S. HOLT, Arch. Biochemistry Biophysics **53**, 228 (1954).

⁴⁾ EARL E. JACOBS, A. S. HOLT, R. KROMHOUT & E. RABINOWITZ, Arch. Biochemistry Biophysics **72**, 495 (1957).

⁵⁾ L. P. ZILL, G. COLMANO & H. J. TRURNIT, Science **128**, 478 (1958).

⁶⁾ A. STOLL & E. WIEDEMANN, Angew. Chem. **67**, 716 (1955).

⁷⁾ R. WILLSTÄTTER & A. STOLL, Untersuchungen über Chlorophyll, Springer, Berlin 1913.

Die Chlorophylle a und b und ihre wichtigsten Eigenschaften. Das natürliche Chlorophyll besteht bekanntlich aus den beiden Komponenten a und b, die in den grünen Blättern etwa im Verhältnis 3:1 vorhanden sind. Es kommt dort nicht frei, sondern an Protein gebunden in dem Chromoprotein Chloroplastin⁸⁾ vor. Die Bindungen dieses Symplexes werden durch manche Lösungsmittel, Elektrolyte, und beim Trocknen der Blätter gelockert, wodurch die Blattfarbstoffe leicht extrahierbar werden.

Chemisch unterscheiden sich die beiden Chlorophyll-Komponenten a und b nur durch den Ersatz der 3-Methylgruppe des Chlorophylls a durch eine 3-Aldehydgruppe im Chlorophyll b. Da diese Carbonylgruppe in Konjugation zu den Doppelbindungen des Phorbiringes steht, hat sie Einfluss auf das Absorptionsspektrum des Chlorophylls b, das deshalb von dem des Chlorophylls a deutlich verschieden ist. Auch ist das Chlorophyll b etwas schwächer basisch als das Chlorophyll a, was jedoch erst bei einem Vergleich der Magnesium-freien Derivate zu erkennen möglich ist.

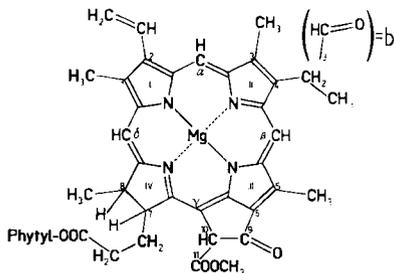


Fig. 1. Strukturformeln der Chlorophylle a und b
Chlorophyll a bzw. Chlorophyll b
 $C_{55}H_{72}O_6N_4Mg$ $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$

Die 7-Stellung ist bei beiden Chlorophyll-Komponenten durch die Phytol-estergruppe substituiert, die ihnen ihre Wachsnatur verleiht und die man bisher dafür verantwortlich hielt, dass die Kristallisation auch reiner Chlorophyllpräparate nicht gelang, obschon seit mehr als 40 Jahren immer wieder entsprechende Versuche unternommen wurden.

Die Darstellung reiner Chlorophyllpräparate. Anlässlich der wiederholten Darstellung der chromatographisch reinen Chlorophylle konnte man beobachten, dass die Lösungsfarbe des Chlorophylls a von Versuch zu Versuch von blaugrün bis grünlichblau variierte, ohne dass andere Reinheitskriterien Unterschiede erkennen liessen. Wir vermuteten in den Präparaten grünlicherer Lösungsfarbe noch Spuren sehr schwer entfernbare Begleitstoffe oder von Zersetzungsprodukten und stützten uns dabei auf die bekannte grosse Empfindlichkeit des Chlorophylls gegenüber äusseren Einflüssen. Um diese so weit wie irgend möglich auszuschalten, erschien es uns, von der Verwendung besten Ausgangsmaterials und reiner Reagenzien (Lösungs- und Adsorptionsmittel) abgesehen, als besonders wichtig, alle Arbeitsstufen bis zur Isolierung der reinsten Komponenten ohne jede Unterbrechung, also so schnell wie irgend möglich, zu durchlaufen. Auch dabei stützten wir uns auf Erfahrungen von WILLSTÄTTER, sowie auf eigene Beobachtungen bei der Darstellung reiner Phäophorbide⁹⁾.

⁸⁾ A. STOLL, E. WIEDEMANN & A. RÜEGGER, Verh. Schweiz. Naturf. Ges. 1941, 125.

⁹⁾ A. STOLL & E. WIEDEMANN, Naturwiss. 20, 628 (1932).

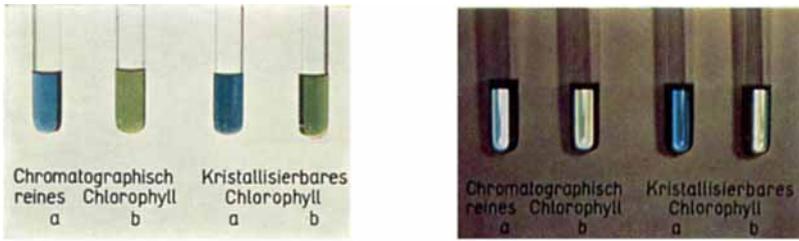


Fig. 2

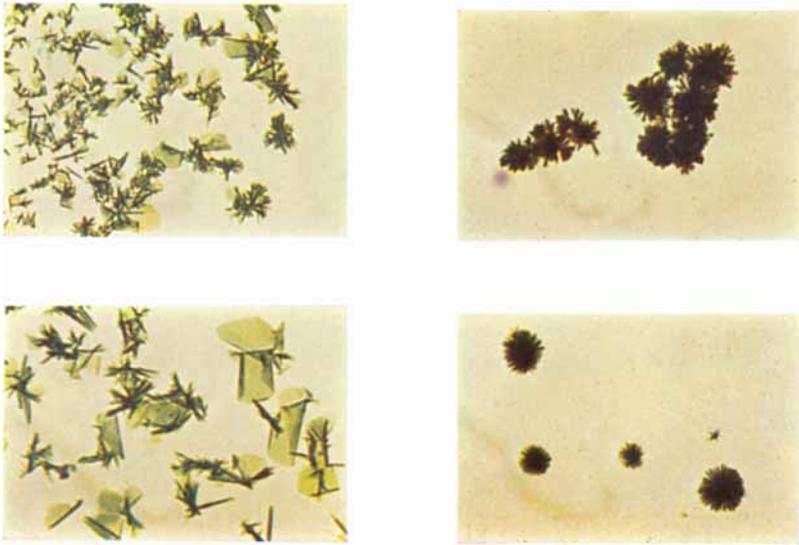


Fig. 3

Kristallisiertes Chlorophyll a

Kristallisiertes Chlorophyll b

Ausgehend von früheren Untersuchungen zur Trennung und Reindarstellung der beiden Chlorophyllkomponenten, die mit den Namen TSWETT¹⁰⁾, WILLSTÄTTER¹¹⁾, WINTERSTEIN¹²⁾ und anderen verknüpft sind, gelangten wir schliesslich zu der folgenden neuen Arbeitsweise:

Das Mehl sorgfältig getrockneter Brennesselblätter wird mit nur 80-proz. Aceton kurz extrahiert. Der Extrakt wird sofort in Talk eingerührt und das Chlorophyll durch Verdünnen mit Wasser ausgefällt. Das auf dem Talk niedergeschlagene Pigment wird nach dem Auswaschen des Acetons mit Wasser direkt mit einer Mischung von Benzol und Petroläther 1:1 herausgelöst, worauf man diese Lösung sofort auf inzwischen mit Benzol-Petroläther eingeschlammten Puderzuckersäulen chromatographiert. Führt man diese einfachen Operationen mit reinsten Reagenzien, ohne Unterbrechung und unter Ausschluss direkten Tageslichtes durch, so erhält man die Chlorophylle a und b durch Extraktion der entsprechenden Säulenabschnitte mit Äther in stets gleicher Beschaffenheit und in einem bisher nicht erreichten Reinheitsgrad. Beispielsweise zeigt die auf diese Weise erhaltene ätherische Lösung von Chlorophyll a eine rein tintenblaue Farbe, wie sie bei früheren chromatographisch reinen Präparaten nie beobachtet werden konnte (s. Tafel, Fig. 2).

Die Chromatographie der Chlorophylle mittels Puderzucker ist neuerdings durch jene mit Eisenoxyd (-Gel bzw. Hämatit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$)) ergänzt worden¹³⁾. Es ist jedoch noch nicht bekannt, ob damit die Chlorophyllkomponenten in ebenso reiner Form erhalten werden können.

Mit den nach unserer neuen Vorschrift erhaltenen Chlorophyllpräparaten haben wir Kristallisationsversuche angestellt, um ihre Reinheit gegebenenfalls noch weiter zu steigern. Hierbei war zu bedenken, dass die Chlorophylle a und b als Phytol ester Wachs natur besitzen. Bei Kristallisationsversuchen war daher jede Erwärmung zu vermeiden und die Abscheidung fester Substanz nur durch Änderung des Mischungsverhältnisses der Lösungsmittel bei höchstens Raumtemperatur vorzunehmen. Auf diese Weise gelang es relativ bald, das Chlorophyll a aus 90-proz. Aceton und das Chlorophyll b sowohl aus Chloroform-Methanol wie auch aus 90-proz. Äthanol in gut ausgebildeten Kristallen abzuscheiden (s. Tafel, Fig. 3.).

Beschreibung der kristallisierten Chlorophylle a und b. Das Chlorophyll a kristallisiert aus dünnen Schichten 90-proz. Acetons bei verzögerter Verdunstung desselben bei Zimmertemperatur (Objektträger mit Hohl Schliff, Deckglas, oder ähnliche Anordnungen); es erscheint in dünnen, rein grünen, meist gut ausgebildeten, 6seitigen Blättchen, die vielfach auf der Kante stehen, mitunter aber durch einen kleinen Stoss zum Umfallen gebracht werden können. Man kann die Kristalle durch Schütteln in der Mutterlauge bewegen, ohne sie zu beschädigen. Schon durch gelinden Druck verschmieren sie aber zufolge ihrer Wachs natur.

Das Chlorophyll b erscheint aus dünnen Schichten Chloroform-Methanol oder 90-proz. Äthanol bei verzögerter Verdunstung und Zimmertemperatur in gelbstichig grünen, prismatisch begrenzten, fast immer zu Drusen angeordneten Nadeln oder Spiesen; lockere Büschel werden am ehesten aus 90-proz. Äthanol erhalten. Auch die Kristalle von Chlorophyll b lassen sich in der Mutterlauge unversehrt bewegen, verschmieren aber ebenfalls unter gelindem Druck, was ihre Wachs natur bestätigt.

Bei beiden Chlorophyllen ist die Ausbeute an Kristallen gut. Es bleiben nur hell gefärbte Mutterlauge n zurück, so dass wir annehmen dürfen, reine Präparate in Händen zu haben. Dies wird vor allem durch den Spektralbefund bestätigt, bei welchem die bisher höchsten molaren Extinktionen gemessen werden konnten.

¹⁰⁾ M. TSWETT, Warschauer Naturf. Ges., XIV. Jahrg., Biol. Abt., Nr. 6 (1903).

¹¹⁾ R. WILLSTÄTTER & A. STOLL, Liebigs Ann. Chem. **387**, 317 (1911).

¹²⁾ A. WINTERSTEIN & G. STEIN, Z. physiol. Chem. **220**, 263 (1933).

¹³⁾ O. GLEMSER & G. RIECK, Naturwiss. **45**, 569 (1958).

Fig. 4. *Absorptionsspektren, sichtbarer Bereich*

—— Krist. Chlorophyll a in Dioxan
 - - - - - Krist. Chlorophyll b in Dioxan

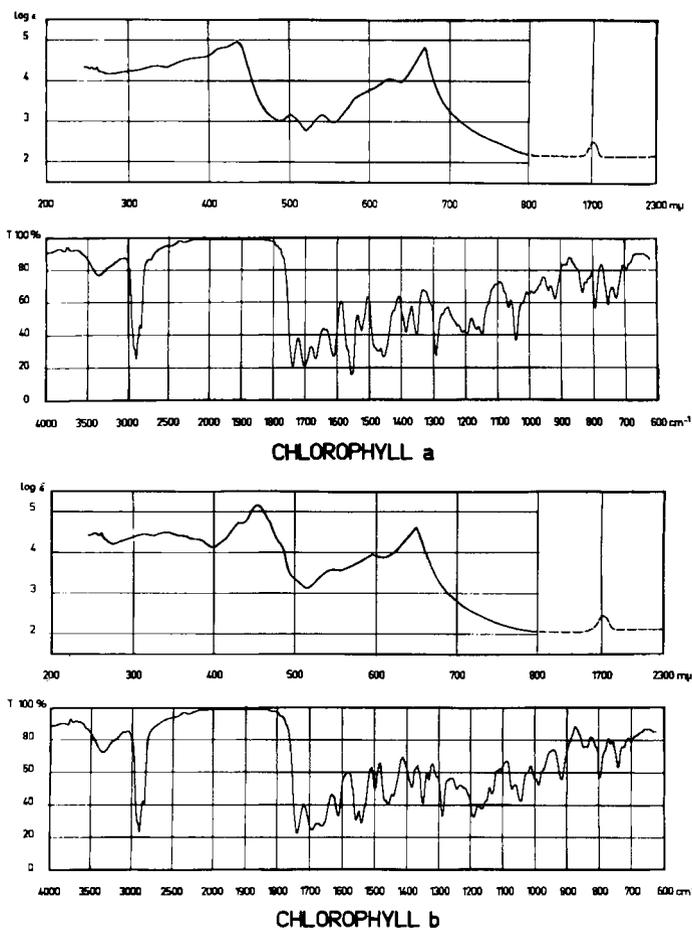
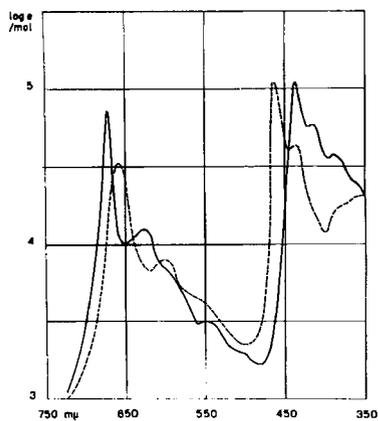


Fig. 5. *Absorptionsspektren, Ultraviolett und Infrarot*
 UV.: in Dioxan; IR.: 1 mg Substanz in 300 mg KBr

In der Fig. 4 sind die Absorptionsspektren im sichtbaren Bereich der Chlorophylle a und b übereinander gelagert. Es kommt darin sehr schön zum Ausdruck, wie die Absorptionsmaxima von Chlorophyll b in die Lücken der Absorptionsmaxima von Chlorophyll a fallen, was sich für den photosynthetischen Prozess in einer vollständigeren Ausnützung des Himmelslichts auswirkt.

In der Fig. 5 sind die Spektren im Ultraviolett und im Infrarot der reinsten Chlorophylle a und b, u. W. zum ersten Male, veröffentlicht.

Beide Kristallisationen geben im übrigen alle Reaktionen der unversehrten Chlorophylle a und b, wie zum Beispiel die Phasenprobe (reingelb bei a, tiefrot bei b); ihre ätherischen Lösungen färben 20-proz. Salzsäure auch nicht in Spuren an, was die Unversehrtheit der Phytolstergruppe beweist.

Leider sind unsere Versuche, die kristallisierten Chlorophylle a und b in grösseren Ansätzen zu gewinnen, bisher erheblichen Schwierigkeiten begegnet, was wohl auf den engen Spielraum der Bedingungen und die Wachsnatur der Präparate zurückzuführen ist. Da jedoch die Kristallisation im Mikromaßstab ganz regelmässig und ohne besondere Vorsichtsmassnahmen gelingt, sollten ihrer Übertragung in grössere Maßstäbe keine unüberwindlichen Schwierigkeiten im Wege stehen.

SUMMARY

By careful and speedy work it has been possible to isolate the chlorophyll components a and b in such a pure and intact state that, under suitable conditions, they precipitate in well-formed crystals. The crystalline substances so obtained meet all criteria for pure chlorophylls a and b. The goal of crystallising natural chlorophylls a and b has thus been reached after several decades of endeavour.

Whereas the spectra of pure chlorophylls a and b in the visible have been previously published, this is, to the best of our knowledge, the first time that their infra-red spectra are reported.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium «SANDOZ», Basel

74. Die Glykoside der Zwiebeln von *Ornithogalum umbellatum* L. sowie Prüfung der Zwiebeln von *Ornithogalum prasinum* (LINDL.)¹⁾

Glykoside und Aglykone, 198. Mitteilung²⁾

von H. MROZIK, R. A. WAUD, O. SCHINDLER und T. REICHSTEIN

(17. II. 59)

Ornithogalum umbellatum L.

Über toxische Wirkungen verschiedener *Ornithogalum*-Arten (*Liliaceae*) ist wiederholt berichtet worden³⁾. Einige wurden einer genauen pharmakologischen Prüfung unterworfen⁴⁾; dabei zeigten nur Extrakte aus den Zwiebeln von *Ornithogalum*

¹⁾ Auszug aus Diss. H. MROZIK, Basel 1958.

²⁾ 197. Mitteilung: J. M. NASCIMENTO, H. JÄGER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, Helv. **42**, 661 (1959).

³⁾ Frühere Lit. siehe bei WAUD⁴⁾.

⁴⁾ R. A. WAUD, J. Pharmacol. exp. Therap. **111**, 147 (1954).