

110. Beiträge zur Biochemie der pflanzlichen Plastiden

1. Mitteilung. Zur Kenntnis der Herbstfärbung

von W. Eichenberger und E. C. Grob

(7. III. 62)

1. *Einleitung.* Gegen Ende jeder Vegetationsperiode erfährt der Stoffwechsel vieler Pflanzen eine tiefgreifende Umgestaltung. Diese Umwandlung betrifft auch die Blattfarbstoffe und äussert sich alljährlich in Form der auffälligen Herbstfärbung. Bekanntlich sind an der Erzeugung der gelben bis roten Herbstfarben die Carotinoide massgebend beteiligt. Unsere bisherigen Untersuchungen über die Herbstfärbung befassten sich ausschliesslich mit den Carotinoiden. Sie hatten zum Ziel, Beziehungen zwischen der äusserlichen Verfärbung und den Änderungen von Art und Menge der gelben Farbstoffe herzuleiten und die Umwandlungen zeitlich zu verfolgen. Vor ungefähr 25 Jahren haben KARRER & WALKER¹⁾ dem Problem der Herbstpigmente eine umfassende Arbeit gewidmet. Seither sind die Trennungsmethoden, insbesondere auch durch die Entwicklung der Dünnschichtchromatographie, bedeutend verfeinert worden. Die sinngemässe Anwendung dieser leistungsfähigeren Methoden dürfte deshalb zu neuen Erkenntnissen führen.

Da der Herbst als Fortsetzung der Sommerperiode aufzufassen ist, haben wir vorerst die Verhältnisse in den grünen Sommerblättern untersucht. Als Versuchsobjekt diente ein jüngerer Ahornbaum (*Acer platanoides* L.) in annähernd natürlicher Lage (Park). Zunächst galt es, die Carotinoide grüner Sommerblätter auf chromatographischem Wege zu isolieren und zu charakterisieren.

2. *Charakterisierung der Sommercarotinoide.* Aus grünen Blättern, Ende Juni 1961 geerntet, wurde ein Extrakt hergestellt und ein Teil davon auf einer Dünnschichtplatte chromatographiert (Fig. 1). Von den entstandenen 5 gelben Zonen erwiesen sich Zonen 1–4 als chromatographisch einheitlich, während Zone 5 sich beim zweiten Chromatographieren an einer Säule (Ca(OH)₂ mit Petroläther 50–70°) in 4 neue Zonen (5–8) aufspaltete.

Entsprechend ihrer geringen Polarität laufen die Kohlenwasserstoffe in der vordersten Zone. Weiter hinten sind die hydroxylierten Carotinoide und zuhinterst die hydroxylierten Epoxid-Verbindungen zu erwarten.

Von allen Zonen wurden Absorptionsspektren aufgenommen. Die Substanzen der Zonen, die auf Grund des Spektrums und des Rf-Wertes den Epoxid-Verbindungen zugeordnet werden konnten, wurden mit Salzsäure in Chloroform behandelt. Diese Behandlung führt, wie KARRER²⁾ hat zeigen können, zur Umlagerung vorhandener Epoxidgruppen in furanoide Gruppen. Dieser Vorgang hat eine Verminderung der konjugierten C-C-Doppelbindungen und dadurch eine typische Verschiebung des Absorptionsspektrums nach kürzeren Wellenlängen zur Folge. Die Verschiebung des

¹⁾ O. WALKER, Diss. Universität Zürich, 1935.

²⁾ P. KARRER & E. JUCKER, Carotinoide, Basel 1948.

Tabelle 1. Charakterisierung der Zonen 1–8 (Sommercarotinoide)

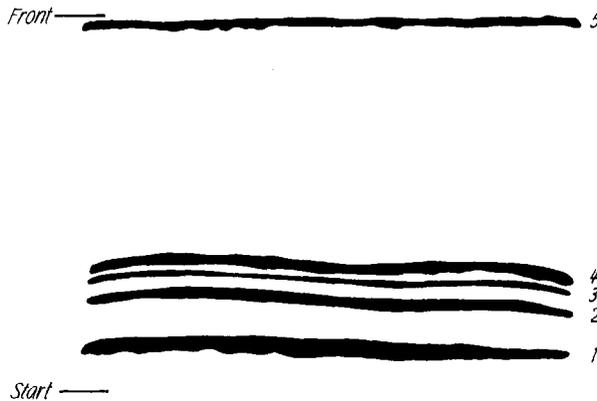
Zone	Vorbehandlung	Lösungs- mittel	Extrema des Absorptions- spektrums (in m μ)	Extinktionen bezogen auf das Hauptmaximum
1	—	Äthanol	468,5	0,89
			457	0,64
			439	1,0
			423	0,69
			416	0,72
			449	0,95
			437	0,65
			423	1,0
			407	0,67
			401	0,70
2	—	Äthanol	469	0,89
			458	0,69
			441	1,0
			425	0,73
			418	0,76
			427	0,97
			415	0,51
			402	1,0
			389	0,54
			381	0,63
3	—	Äthanol	473	0,83
			463	0,74
			446	1,0
			429	0,76
			424	0,78
			452	0,70
			444	0,65
			426	1,0
			412	0,73
			404	0,78
4	—	Äthanol	474	0,87
			461	0,74
			445	1,0
			428	0,78
			422	0,78
			450	0,85
5	—	Petroläther (63–78°)	441	0,77
			425	1,0
			407	0,74
			402	0,75
			472	0,86
			464	0,81
6	—	Petroläther (63–78°)	446	1,0
			306	0,21
			478	0,87
			468	0,80
7	—	Petroläther (58–64°)	451	1,0

längstwelligen Maximums beträgt bei Verlust einer Doppelbindung 18–22 $m\mu$ in CS_2 . (Wir haben festgestellt, dass bei Behandlung mit HCl in Chloroform auch nicht-epoxidische Hydroxycarotinoide verändert werden³⁾.)

Tabelle 1. (Fortsetzung)

Zone	Vorbehandlung	Lösungs- mittel	Extrema des Absorptions- spektrums (in $m\mu$)	Extinktionen bezogen auf das Hauptmaximum
8	—	Petroläther (58–64°)	474 461 445 426 421 370 361 350	0,90 0,71 1,0 0,68 0,69 0,18 0,21 0,18

Die charakteristischen Eigenschaften der Sommercarotinoide sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Fig. 1. Grüne Blätter von *Acer platanoides*

Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel G mit Petroläther-Benzol-Äthanol 10:2:1

Auf Grund spektroskopischer und chromatographischer Daten und mit Hilfe von Vergleichssubstanzen haben wir folgende Zonen bestimmten Verbindungen zuzuordnen können (Tab. 2).

Auf Grund der beschriebenen Trennmethode war auch eine quantitative Bestimmung der einzelnen Carotinoide möglich. Figur 2 zeigt die prozentualen Anteile der einzelnen Sommercarotinoide in Blättern von Ende Juni 1961.

Die quantitativen Bestimmungen wurden während der ganzen folgenden Zeit bis Ende Oktober in Abständen von ca. 1 Woche weitergeführt. Da wir vorläufig nur die

³⁾ R. PFLUGSHAUPT, Lizentiatsarbeit, Bern 1961.

Tabelle 2. Identifizierung der Sommercarotinoide

Zone	Identifiziert als	Zur Identifikation benützte Kriterien
1	Neoxanthin	Rf-Wert, Absorptionsspektrum, Umlagerungsprodukte mit HCl in Chloroform.
2	Violaxanthin	Rf-Wert, Absorptionsspektrum, Umlagerungsprodukte mit HCl in Chloroform. Vergleich mit natürlichem Violaxanthin (Roche)
3	Xanthophyllepoxid	Absorptionsspektrum, Umlagerungsprodukte mit HCl in Chloroform.
4	Xanthophyll	Rf-Wert, Absorptionsspektrum, Vergleich mit natürlichem Xanthophyll.
7	β -Carotin	Rf-Wert, Absorptionsspektrum, Vergleich mit synthetischem β -Carotin (Roche).
8	α -Carotin	Rf-Wert, Absorptionsspektrum.

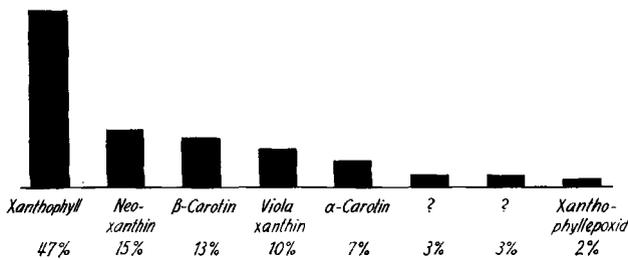


Fig. 2. Prozentuale Anteile einzelner Carotinoide in grünen Blättern von *Acer platanoides*

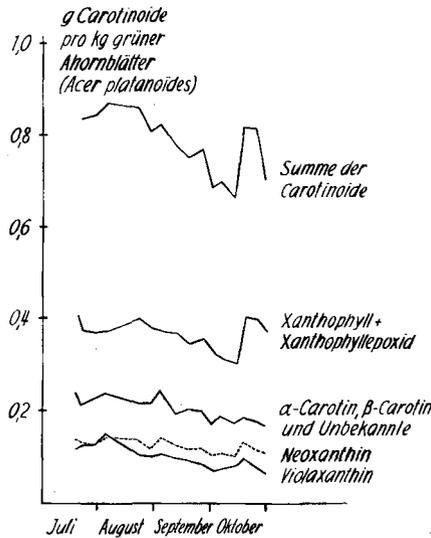


Fig. 3. Einzelne und Gesamtcарotinoide bei *Acer platanoides* während Sommer und Herbst 1961

Hauptcarotinoide mit einem relativen Anteil von mehr als 3% berücksichtigen wollten, haben wir Xanthophyllepoxyd und Xanthophyll (Zonen 3 und 4), sowie die beiden nicht identifizierten Pigmente, α -Carotin und β -Carotin (Zonen 5–8), je gesamthaft bestimmt (vgl. Fig. 1 und 2).

Die Ergebnisse werden durch Figur 3 veranschaulicht. Den Kurven liegen Mittelwerte aus durchschnittlich 2 Blattproben zu Grunde. Die Gesamtcarotinoide wurden rechnerisch durch Summierung der einzelnen Komponenten bestimmt. Figur 3 zeigt,

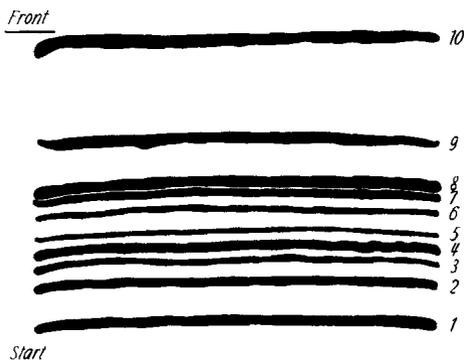


Fig. 4. Gelbe Partien vergilbter Blätter von *Acer platanoides*
Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel G mit Petroläther-Benzol-Äthanol 10:2:1

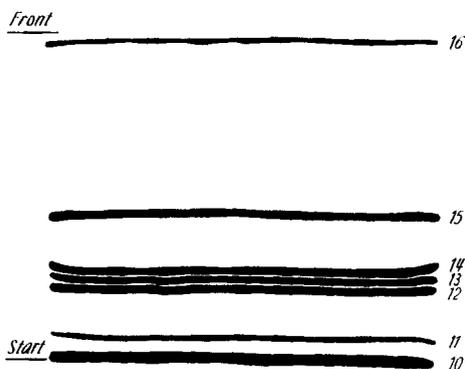


Fig. 4a. Zone 10 aus Fig. 4
Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel G mit Petroläther-Essigester 20:1

dass der Carotinoidgehalt im Gesamten sowie das Verhältnis der einzelnen Komponenten unter sich während der ganzen Dauer des grünen Zustandes konstant bleiben.

3. Die Carotinoide vergilbter Blätter. Zu Beginn der herbstlichen Verfärbung (Mitte Oktober) bildeten sich auf den Blättern des untersuchten Baumes getrennte grüngelbe Partien. Diese färbten sich allmählich gelb. In gleicher Weise verfärbten sich auch die restlichen noch grünen Blattbezirke bis zur gleichmässigen Gelbfärbung des ganzen Blattes. Aus Blättern, die noch grüne, grüngelbe und gelbe Partien nebeneinander aufwiesen, wurden die gleichartigen Bezirke herausgeschnitten und auf die gewohnte

Art extrahiert. Wie bei den Sommerblättern wurden die einzelnen Komponenten durch chromatographische Trennung in zwei Schritten isoliert. Figur 4 und 4a zeigen die entsprechenden Chromatogramme aus gelben Partien.

Die grünen Partien liefern ein Chromatogramm, das identisch ist mit demjenigen aus grünen Sommerblättern (vgl. Fig. 1). Das Chromatogramm der grüngelben Partien dagegen setzt sich zusammen aus den Komponenten der grünen Partien und denjenigen der gelben Partien. Die verschieden gefärbten Blattbezirke stellen also verschiedene Stadien der Vergilbung dar. Die grünen Bezirke entsprechen dem Zustand der grünen Sommerblätter, die gelben Bezirke demjenigen völlig vergilbter Blätter, während die grüngelben Bezirke als Übergangsstadium aufzufassen sind. Der Vergleich der Chromatogramme zeigt ferner, dass im Verlauf der Vergilbung sich die Zahl der einzelnen Carotinoide verdoppelt. Da der Rf-Wert einer Substanz auch

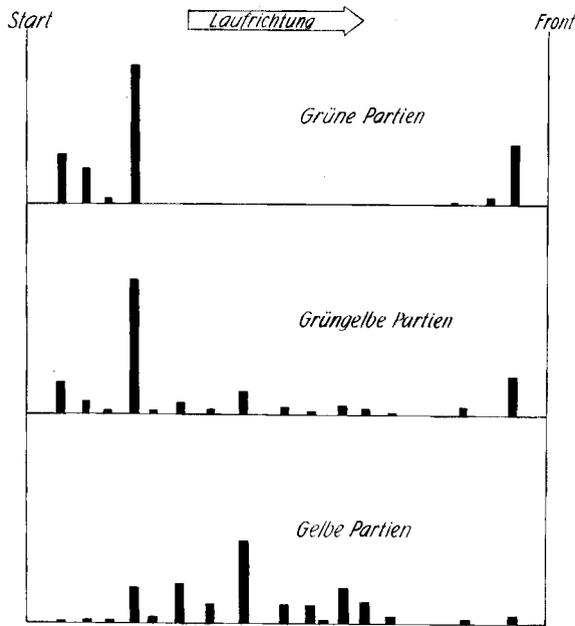


Fig. 5. Teilweise vergilbte Blätter von *Acer platanoides*

Schematische Darstellung der einzelnen Carotinoide nach Menge und Lage im Chromatogramm

Aufschluss gibt über ihr Verhalten bei der Verteilung zwischen Petroläther und wässrigem Methanol, kann man erkennen, dass sich die Herbstcarotinoide im Gegensatz zu den Sommercarotinoiden vermehrt epiphasisch verhalten müssen.

Die Absorptionsbanden der Herbstcarotinoide sind gegenüber denjenigen der Sommercarotinoide nur sehr wenig verschoben. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die Herbstcarotinoide dieselben chromophoren Systeme wie die Sommercarotinoide besitzen.

Es stellte sich die Frage, ob die epiphasischen Anteile der Herbstcarotinoide zusätzlich oder auf Kosten der übrigen Komponenten entstehen. Zu ihrer Beantwortung

wurden grüne, grüngelbe und gelbe Partien teilweise vergilbter Blätter vom 18. 10. 61 untersucht. Nach der chromatographischen Auftrennung wurde die Extinktion am Hauptabsorptionsmaximum der einzelnen Carotinoide bestimmt und daraus deren relative Anteile errechnet.

In Figur 5 sind die Ergebnisse schematisch dargestellt. Entsprechend der im Schema eingezeichneten Laufrichtung stehen die hypophasischen Stoffe mit kleinen Rf-Werten auf der linken Seite, während die rein epiphasischen fast mit der Front laufen. In der Gegenüberstellung der 3 Hauptstadien erkennt man deutlich, dass die Carotinoide der grünen Partien mit Schwerpunkt im hypophasischen Gebiet abnehmen. Dafür entsteht eine Reihe neuer Pigmente mit vermehrt epiphasischem Charakter.

Betrachtet man die Gesamtmenge der Carotinoide in den drei Vergilbungsstadien, so stellt man bei fortschreitender Vergilbung eine deutliche Abnahme fest. Tabelle 3 enthält die Gesamtmenge der Carotinoide in den drei Hauptstadien zu verschiedenen Zeitpunkten.

Tabelle 3. *Gesamtmenge der Carotinoide (in mg pro kg Frischgewicht) in Herbstblättern in der Zeit vom 18. Oktober bis 4. November 1961*

Datum	grüne Partien mg	grüngelbe Partien mg	gelbe Partien mg
18. 10.	823	580	350
20. 10.	—	485	350
25. 10.	819	—	—
30. 10.	703	—	—
4. 11.	687	746	635

Die Feststellung, dass epiphasische Pigmente entstehen, während hypophasische verschwinden, dass ferner die Gesamtmenge der Carotinoide abnimmt und dass die chromophoren Systeme beibehalten bleiben, berechtigt zur Annahme, dass beim Vergilbungsprozess keine Neubildung von Carotinoiden erfolgt, sondern dass die Herbstcarotinoide aller Wahrscheinlichkeit nach aus den Sommercarotinoiden durch Umbau entstehen.

Beobachtet man während der äusserlichen Verfärbung des Blattes die Plastiden, so stellt man fest, dass sich die grünen Chloroplasten in chromoplastenähnliche Gebilde umwandeln, die wir vorderhand als «Herbstchromoplasten» bezeichnen wollen. Damit lässt sich die Herbstfärbung als Folge einer Umwandlung der Plasten und einer damit verbundenen Änderung der chemischen Synthesefähigkeiten auffassen.

Da ein grosser Teil der Herbstcarotinoide sich epiphasisch verhält, die Absorptionsspektren aber sehr ähnlich denjenigen hypophasischer Sommercarotinoide sind, glauben wir auf veresterte Phytoxanthine schliessen zu dürfen. In diesem Falle müsste eine Verseifung möglich sein. Tatsächlich entstehen unter verseifenden Bedingungen aus diesen Pigmenten im Chromatogramm stärker haftende, also polarere Verbindungen mit unveränderten Absorptionsspektren. Die definitive Identifizierung dieser typischen Herbstcarotinoide ist zur Zeit noch nicht abgeschlossen. Ihre Ergebnisse werden Gegenstand einer nächsten Veröffentlichung bilden.

Experimentelles. a) *Dünnschichtchromatogramme*: Die Platten wurden mit einem Streichgerät nach STAHL hergestellt und anschliessend bei 120° getrocknet. Der Extrakt wurde als Strich über die ganze Plattenbreite aufgetragen. Die aufgetragene Menge entsprach dem Extrakt aus ca. 0,2 g frischen Blattmaterials. Zur Entwicklung diente für die hypophasischen Anteile ein Gemisch von Petroläther-Benzol-Äthanol 10:2:1, für die epiphasischen Stoffe ein solches von Petroläther-Essigester im Verhältnis 20:1.

b) *Herstellung des Extraktes*: Aus durchschnittlich ca. 5 g frischer entstielter Blätter, nach ⁴⁾.

c) *Quantitative Bestimmungen*: Die Extinktionen am Hauptmaximum wurden in einem BECKMAN-DU-Spektrophotometer bestimmt. Die spezifischen Extinktionen wurden älteren Arbeiten entnommen⁵⁾. Für die nicht identifizierten Carotinoide der Sommerblätter (Zonen 5 und 6, Tab. 1) und die Herbstcarotinoide wurde die spezifische Extinktion von β -Carotin, für Xanthophyllepoxyd diejenige von Xanthophyll angenommen.

d) *Verseifung*: Die Substanz wurde in einigen ml Petroläther gelöst und mit 1 ml einer 2-proz. Lösung von Natrium in Alkohol versetzt. Nach Verdrängen der überstehenden Luft durch Stickstoff wurde das Gemisch einige Zeit bei Zimmertemperatur stengelassen, dann mit Wasser entmischt und der Farbstoff mit Äther ausgeschüttelt.

e) *Umlagerung mit HCl/Chloroform*: Substanz mit 1 ml 0,01N HCl in Chloroform versetzt und 10 Min. stengelassen. Nach Entfernen der Säure mit Zinkcarbonat Reaktionsprodukt auf Kieselgel G mit Petroläther-Benzol-Äthanol chromatographiert und die entstehende Hauptzone untersucht.

ZUSAMMENFASSUNG

In den Blättern von *Acer platanoides* L. wurden Art und Menge der Carotinoide während Sommer und Herbst untersucht. Die grünen Sommerblätter enthielten Xanthophyll (Lutein), Neoxanthin, β -Carotin, Violaxanthin, α -Carotin, Xanthophyllepoxyd und 2 nicht identifizierte Carotinoide. Die gesamte Menge der Carotinoide sowie das Verhältnis der einzelnen Komponenten unter sich blieb während der ganzen Dauer des grünen Zustandes konstant. Während der Vergilbung traten eine Reihe neuer Carotinoide mit ähnlichem chromophorem System, aber vermehrt epiphasischem Charakter auf. Gewisse Eigenschaften deuten auf Ester. Die Gesamtmenge der Carotinoide nahm während des Vergilbungsprozesses ab. Eine Neubildung von Carotinoiden während der Herbstfärbung ist daher unwahrscheinlich. Die Umwandlung der Sommercarotinoide ist als Folge einer Veränderung der Plasten und der damit verbundenen Änderung der chemischen Synthesefähigkeiten aufzufassen.

Der Firma F. HOFFMANN-LA ROCHE, Basel, danken wir herzlich für die grosszügig gewährte Unterstützung.

Institut für organische Chemie
und THEODOR-KOCHER-Institut
der Universität Bern

⁴⁾ E. C. GROB & W. EICHENBERGER, *Chimia* 15, 565 (1961).

⁵⁾ T. W. GOODWIN in K. PAECH & M. V. TRACEY, *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Band III, S. 273 (1955); W. SCHUCHARDT, *Chem. Abstr.* 49, 11195a (1955).