

- [8] R. I. WAGNER, U. S. Pat. 3086056 (1963), Chem. Abstr. 60, 559 (1964).  
[9] G. SCHWARZENBACH & J. ZURC, Mh. Chem. 81, 202 (1950).  
[10] K. MOEDRITZER & R. R. IRANI, J. inorg. nucl. Chemistry 22, 297 (1961).  
[11] Ref. [2], S. 142; J. R. VAN WAZER, C. F. CALLIS, J. N. SHOOLERY & R. C. JONES, J. Amer. chem. Soc. 78, 5715 (1956).  
[12] J. J. RICHARD, K. E. BURKE, J. W. O'LAUGHLIN & C. V. BANKS, J. Amer. chem. Soc. 83, 1722 (1961).  
[13] A. B. BURG & H. I. SCHLESINGER, J. Amer. chem. Soc. 59, 780 (1937).

## 97. Die Auftrennung der Chlorophylle durch Gegenstromextraktion

von H. Arn, E. C. Grob und R. Signer

(13. XII. 65)

Zum Studium von Chemie und Biosynthese der Chlorophylle suchten wir einen Weg, Chlorophyll a und b sowie Protochlorophyll präparativ zu isolieren. Dazu bedient man sich im allgemeinen der Chromatographie [1] an Cellulosepulver, Stärke oder Puderzucker, welcher häufig eine Vorreinigung durch Adsorption an Talk [2] oder Polyäthylen [3] vorausgeht. Die von WILLSTÄTTER [4] angewandte Methode der Darstellung von reinen Chlorophyllpräparaten durch wiederholtes Verteilen der Pigmente zwischen Petroläther und Methanol verschiedenen Wassergehalts ist durch das Aufkommen der Chromatographie etwas in Vergessenheit geraten, obwohl letztere zu Aufarbeitungen in grösserem Maßstab schwierig durchzuführen ist.

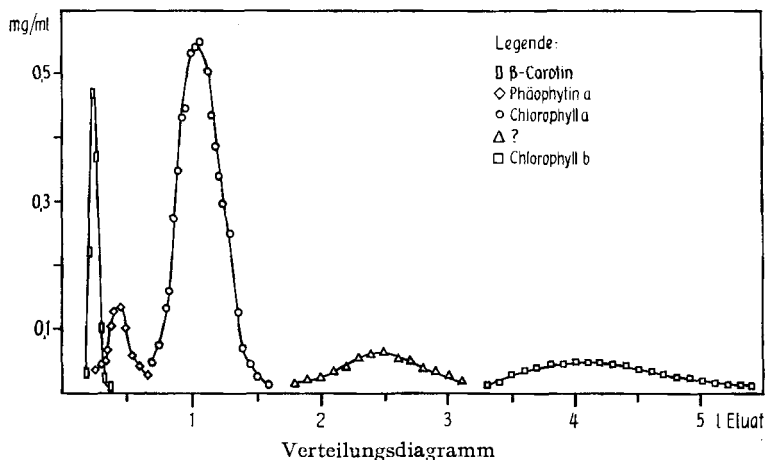
Die Entwicklung vielstufiger Verteilungsapparate legt die Wiederaufnahme der WILLSTÄTTER'schen Methode nahe. So trennten CONIGLIO & WOLF [5] die Pigmente von *Spinacia oleracea* durch Gegenstromextraktion zwischen 90-proz. Äthanol und Petroläther in einer 100 stufigen CRAIG-Apparatur auf; METZNER & STRUSS [6] erhielten bei einer ähnlichen Auftrennung eines Extrakts von *Anacystis nidulans* über 40 Stufen im System 94-proz. Methanol/Petroläther Präparate von intaktem Chlorophyll a. Reines Chlorophyll b war jedoch schwieriger zu erhalten, da es im einen Fall [5] mit den Xanthophyllen, im andern [6] mit Chlorophyll a vergesellschaftet auftrat.

Der in dieser Arbeit verwendete Verteilungsapparat, über den demnächst in dieser Zeitschrift ausführlich berichtet wird, arbeitet nach dem 1956 veröffentlichten Prinzip der dauernden Bewegung beider Phasen ohne Zerteilung ineinander [7]. Die 187 Kammern von je 10 ml beider Phasen sind zu einem länglichen rotierenden Zylinder vereinigt, der unter 45° zur Horizontalebene geneigt ist. Die leichtere Phase bildet in jeder Kammer eine auf der schwereren schwimmende dünne Schicht und durchströmt den Zylinder kontinuierlich von oben nach unten. Die Drehzahl des Zylinders beträgt 17,5 Umdrehungen pro Minute. Mit diesem Apparat wurden die Chlorophylle a und b aus *Brennesselblättern* zwischen 95-proz. wässrigem Methanol als ruhender und Petroläther als bewegter Phase isoliert.

Um die Allomerisation der Chlorophylle bei der mehrtägigen Berührung mit Methanol zu verhindern, setzten wir pro Liter Methanol 10 mg Oxalsäure zu [4]; andererseits spülten wir Lösungsmittel und Apparatur vor und während der Trennung mit Stickstoff, um die Einwirkung des Luftsauerstoffs möglichst auszuschalten. Die Ex-

traktion des Blattmaterials (siehe exper. Teil) und die Auftrennung geschahen im verdunkelten Raum; als Lichtquelle diente einzig eine grüne Dunkelkammerlampe mit einem Intensitätsmaximum bei 580 nm.

Bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 50 ml pro Stunde, die gegen Ende des Versuchs verdoppelt wurde, erzielten wir innert vier Tagen eine einwandfreie Auftrennung der Chloroplastenpigmente (s. Figur).



Einige Stunden nach der Probeneinführung in den Verteilungsapparat tritt im Petroläther-Eluat die gelbe Farbe der Carotin-Kohlenwasserstoffe auf, gefolgt von Phäophytin a, dessen Vorhandensein bereits in den ersten Fraktionen an der olivgrünen Farbe und der roten Fluoreszenz erkennbar ist. Nach 24 Stunden hat die Menge des eluierten Chlorophylls a das Maximum bereits überschritten. Seine Lösungen sind tief tintenblau gefärbt und zeigen eine starke rote Fluoreszenz. Nach dem Absinken der Chlorophyll-a-Konzentration ist das Eluat praktisch farblos. Einen Tag später tritt wiederum ein blauer Farbstoff aus, dessen Absorptionsspektrum bei einer Blauverschiebung von rund 2 nm demjenigen des Chlorophylls a gleicht. Schliesslich erscheint mit grüner Farbe Chlorophyll b, dessen Konzentration bereits ein sehr flaches Maximum durchläuft. Nach dem Verschwinden der grünen Farbe wurde der Versuch unterbrochen. Die Xanthophylle sind bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht aufgetaucht. Bei einem analogen Versuch war erst nach 8 Tagen eine schwach gelbe Farbe des Eluats zu erkennen. Beim Auftreten eines Farbstoffs mit dem a-Spektrum zwischen Chlorophyll a und Chlorophyll b dürfte es sich um ein Artefakt handeln, dessen Bildung möglicherweise durch die Oxalsäure hervorgerufen wurde. Phäophytin a wurde in allen Aufarbeitungen gefunden. Es wird häufig angenommen, dass es erst während der Extraktion durch die Wirkung der Pflanzensäuren aus Chlorophyll gebildet wird. Phäophytin b haben wir indessen nicht angetroffen.

Die Hauptfraktionen der Chlorophylle a und b wurden mit wenig Äther versetzt, mit Wasser ausgewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum in der Kälte zur Trockne eingedunstet. Die Ätherlösungen dieser Präparate zeigen eine einwandfreie Phasenprobe [8]. Ihre Absorptionsspektren stimmen mit den beschriebenen [9] innerhalb der Fehlergrenzen überein.

	Lage der Hauptmaxima		(nm)	$E_{428,5}/E_{661}$	
Chlorophyll a	661	428,5	409	1,35	eigene Werte
	660–662	429–430	410	1,31–1,32	Lit. Werte [9]
$E_{452}/E_{643}$					
Chlorophyll b	643	452	429	2,86	eigene Werte
	642,5–644	453–455	430	2,82–3,01	Lit. Werte [9]

Der Quotient der Extinktion im kurzwelligen zu derjenigen im langwelligen Hauptmaximum ( $E_{428,5}/E_{661}$  bzw.  $E_{452}/E_{643}$ ), der als Reinheitskriterium für Chlorophyllpräparate gilt, ist leicht überhöht. Dies kann aber nicht durch mitgeschleppte Carotinoide verursacht sein. Nach der Verseifung liessen sich bei Chlorophyll a höchstens 0,25‰, bei b höchstens 0,5‰ Carotinoide spektroskopisch nachweisen. Wie sich aus dem Vergleich der gravimetrischen mit den spektroskopischen Daten ergibt, wurde für beide Chlorophylle bei der einmaligen Auftrennung des Blattextrakts bereits eine Reinheit von rund 70% erreicht, so dass wir annehmen können, dass die Gegenstromverteilung in Verbindung mit den bisherigen Methoden die Isolierung der Chlorophylle in Gramm-Mengen in höchster Reinheit ermöglicht.

Aus etiolierten Keimlingen von *Hordeum vulgare* liess sich nach diesem Verfahren Protochlorophyll anreichern. Unsere weiteren Versuche werden zeigen, ob sich das Gemisch von Protochlorophyll und Chlorophyll a ebenso auftrennen lässt.

**Experimentelles.** – *Zusammensetzung der Phasen:* 5 l Petroläther (Siedebereich 50–70°), 4,75 l über Mg-Spänen entwässertes Methanol, 0,25 l dest. H<sub>2</sub>O und 50 mg Oxalsäure wurden gründlich durchmischt. Nach mehrtägigem Stehen bei Raumtemperatur wurden die Phasen bis auf einen geringen jeweiligen Anteil der Gegenphase getrennt und vor der Verwendung mit reinstem Stickstoff gespült.

Die *Blattextrakte* wurden möglichst rasch und schonend aufgearbeitet. 300 g frische Brennesselblätter wurden in der Reibschale portionsweise mit Methanol befeuchtet, mit Sand zerrieben und mehrmals mit Aceton extrahiert. Die Extrakte (ca. 1 l) wurden durch Zentrifugation von Feststoffen befreit und die Pigmente durch Zusatz von konzentrierter NaCl-Lösung in Petroläther übergeführt, welcher anschliessend mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und in der Kälte im Vakuum auf 40 ml eingengt wurde. Diese Lösung wurde vor der Einführung in die Trennapparatur mit einigen Tropfen der methanolischen Phase gesättigt.

Das *Petroläther-Eluat* wurde in Fraktionen zu 25 ml aufgefangen. Zur Ermittlung der Verteilungskurve wurden Proben der einzelnen Fraktionen im Verhältnis 1:5 bis 1:125 verdünnt. Die Absorptionsspektren dieser Lösungen, gemessen bei 1 cm Schichtdicke auf dem BECKMAN DK-2A Spektrophotometer, ergaben qualitativ und quantitativ die Gehalte an den verschiedenen Pigmenten. Als Absorptionskoeffizienten setzten wir die in ätherischer Lösung geltenden Werte ein [9]. Für die unbekannt Chlorophyllkomponente nahmen wir die Koeffizienten von Chlorophyll a an.

Diese Arbeit wurde vom SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG unterstützt.

#### SUMMARY

The chlorophylls a and b from nettle leaves have been separated from each other and from the carotenoids by counter-current distribution in a new apparatus, which will be described in detail in a subsequent paper. The solvent system used was methanol-water 95:5 (with addition of 10<sup>-3</sup>% of oxalic acid to prevent allomerization) and petroleum ether (b.p. 50–70°C).

Protochlorophyll from etiolated barley leaves has been isolated by the same method.

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Bern

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] M. HOLDEN, «Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments», Ed. T. W. GOODWIN, Academic Press, London 1965, p. 475 ff.
- [2] A. STOLL & E. WIEDEMANN, *Helv.* 42, 679 (1959).
- [3] A. F. H. ANDERSON & M. CALVIN, *Nature* 184, 285 (1962).
- [4] R. WILLSTÄTTER & M. ISLER, *Liebigs Ann. Chem.* 390, 269 (1912).
- [5] J. G. CONIGLIO & F. T. WOLF, *Phyton* 17, 189 (1961).
- [6] H. METZNER & S. STRUSS, *Z. Naturforsch.* 18b, 707 (1963).
- [7] R. SIGNER, K. ALLEMANN, E. KÖHLI, W. LEHMANN, H. MEYER & W. RITSCHARD, *Dechema-Monographien* 27, 32 (1956).
- [8] H. FISCHER & A. STERN, «Die Chemie des Pyrrols» II/2, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig 1940, p. 331.
- [9] J. H. C. SMITH & A. BENITEZ, «Moderne Methoden der Pflanzenanalyse» IV, Herausg. K. PAECH & M. V. TRACEY, Springer, Berlin 1955, p. 149.

## 98. Calorimètre pour la mesure des chaleurs de mélange des liquides

par J. G. Fernández García et C. G. Boissonnas

(17 XII 65)

Les calorimètres utilisés jusqu'à présent pour la mesure des chaleurs de mélange des liquides, notamment ceux qui ont été décrits par CARROLL & MATHEWS [1], BOISSONNAS & CRUCHAUD [2], VAN DER WAALS & HERMANS [3], MCGLASHAN [4] et HOLLEMAN [5], présentent des inconvénients auxquels nous avons cherché à remédier. En effet, les uns comportent une phase vapeur, ce qui nécessite une correction et diminue de ce fait la précision, les autres, évitant ce défaut, sont en revanche de construction et d'utilisation difficiles.

Le calorimètre que nous décrivons ici, et qui nous a permis de mesurer les chaleurs de mélange de couples d'alcanes, est facile à construire. Il permet des mesures à des températures comprises entre 0° et 70°. Les quantités de liquide sont de 0,5 à 2 g. La phase vapeur est entièrement éliminée par remplissage du calorimètre avec du mercure, ce qui a pour effet secondaire de rendre très rapide l'homogénéisation du mélange. De plus, lorsque le mélange est accompagné d'une absorption de chaleur [6], celle-ci est compensée par un apport d'énergie électrique. Dans ces conditions, l'appareil permet d'évaluer des effets thermiques de l'ordre de 0,005 joule, ce qui, pour une capacité calorifique de 50 joules/degré, correspond à des différences de température de 10<sup>-4</sup> degré.

*Description du calorimètre* (voir fig. 1). Le calorimètre, fait de pyrex, comprend un corps central rempli de mercure et deux tubes latéraux dans la partie supérieure desquels sont introduits les deux liquides à mélanger. Deux thermistances Th, en série, sont fixées dans deux ouvertures pratiquées dans la cuve, et protégées contre l'action du mercure par de l'Araldite CIBA (type 103, durcisseur type 951). Une résistance de chauffe R<sub>c</sub>, est faite d'un fil de manganine (diamètre 0,3 mm, longueur 24 cm, résistance environ 30 ohms) enroulé autour d'un tube de Pyrex, qui est glissé dans deux ouvertures du calorimètre, fixé et protégé aussi par de l'Araldite. Un tube capillaire, se terminant par un petit ballon, permet de maintenir la pression approximativement constante, malgré les changements de volume des liquides lors du mélange, ou ceux qui accompagnent l'introduction du calorimètre dans le thermostat.