

Physikalisch-chemische Untersuchungen an wasserlöslichen Chlorophyllderivaten.

Von
Mona Spiegel-Adolf.

Department of Colloid Chemistry, Temple University, Medical School,
Philadelphia, Pennsylvania.

Mit 4 Abbildungen.

(Eingelangt am 10. Aug. 1949. Vorgelegt in der Sitzung am 13. Okt. 1949.)

Die Wasserlöslichkeit einiger Chlorophyllderivate (CD) bietet solche Vorteile für die physikalisch-chemische Untersuchung, daß demgegenüber ihre Inhomogenität weniger ins Gewicht fiel.

Zur Verfügung standen folgende Stoffe*:

1. Ein Handelsprodukt von Chloresium (Abkömmling von $C_{55}H_{72}N_4O_5Mg$), das aus 74% wasserlöslichen Abkömmlingen (CD_1) besteht.

2. „Rekristallisiertes“ Chloresium, das von *J. Chamelin*, M. Sc., und *Dr. Newman* aus dem ersten Stoff durch Entfernung der pflanzlichen Wachse und Fettsäuren erhalten wurde. Dabei wurden Wasser, Methanol, Benzol, Petroläther, Äthyläther, Adsorption an Talkum und Elution mit Wasser, sowie endlich Trocknung angewendet. Das Endprodukt besteht aus verseiften komplexen Na-Metall (Fe, Cu, Mg)-Derivaten des Chlorophylls. In dem letzteren ist das Verhältnis von Chlorophyll a zu Chlorophyll b 3 : 1, etwa das gleiche wie in gewöhnlichem Chlorophyll (2,9 : 1)⁹. Etwa 24 verschiedene Chlorophyllderivate wurden im rekristallisierten Chloresium (CD_2), das in Eisessig Fluoreszenz zeigt, identifiziert.

3. „Rekristallisiertes“ Chloresium enthält 10% NaCl. Der größte Teil davon konnte durch intensive Dialyse gegen fließendes dest. Wasser entfernt werden. Nach Erreichung einer Leitfähigkeit von $3,4 \times 10^{-5}$

* Die Präparate 1 bis 3 wurden freundlichst von der Rystan Corporation zur Verfügung gestellt.

wurde die ursprünglich 0,2%ige Lösung in einem Vakuumexsikkator über wasserfreier Phosphorsäure eingedampft (CD_3).

4. Zur Erzielung vergleichbarer Werte diente eine Probe chemisch reinen Chlorophylls, aus etwa 3 Teilen Chlorophyll a und einem Teil Chlorophyll b bestehend (C_4)**. Die Reinheit dieses Präparats wurde spektroskopisch und mittels Phasenmessungen geprüft.

Die Spektroskopie war die Hauptmethode bei der Untersuchung des Chlorophylls und seiner Derivate. Allerdings wurden die meisten dieser Messungen im sichtbaren Bereich durchgeführt⁷. Bezüglich des Verhaltens im ultravioletten Licht stimmen die meisten Autoren (*Fischer* und *Stern*, *Rothmund*) überein, daß Chlorophyll drei getrennte Absorptionsbanden im Kurzwellenbereich aufweist. Es schien von Interesse, die wasserlöslichen Chlorophyllderivate daraufhin zu untersuchen und den Einfluß der Reinigung auf die optische Wirksamkeit zu messen. Endlich wurden Versuche durchgeführt, um den Einfluß von Bestrahlung auf das optische Absorptionsvermögen der untersuchten Stoffe zu prüfen. Unsere ultraspektrophotometrischen Arbeiten wurden mit einem photoelektrischen Quarzspektrophotometer DU *Beckmann* über einen Bereich von 4200 bis 2200 Å in Stufen von 10 Å gemacht; Quarzzellen von 0,5 und 1,0 cm wurden verwendet, CD-Konzentrationen von 0,004% bis 0,024% untersucht. Die Extinktionskoeffizienten wurden in üblicher Weise berechnet. In einer ersten Versuchsreihe wurde sichergestellt, daß rekristallisiertes CD den Gesetzen von *Lambert* und *Beer* entspricht; dazu wurden Zellen von 0,5 und 1,0 cm und Lösungen von 0,005% und 0,01% verwendet. Die Übereinstimmung der *E*-Kurven war zufriedenstellend.

Ein Vergleich der optischen Absorption von CD_1 und CD_2 ist in Abb. 1 gezeigt. Man sieht, daß beide Kurven sehr ähnlich geformt sind und ihre Maxima zwischen 4000 und 3900 Å haben. Die absolute Höhe wurde nicht bestimmt, aber nach *Albers* und *Knorr* beeinflussen verschiedene Herstellungsarten die Höhe der optischen Maxima, ohne ihre Lage zu verschieben. Andererseits scheinen zwei kleine Absorptionsmaxima bei 3300 und 3000 Å bei der Reinigung verschwunden zu sein. Zur Prüfung, inwieweit die Chloresiumpräparate spektrophotometrisch mit Chlorophyll übereinstimmen, wurden 0,01%ige Lösungen des letzteren in Äthylalkohol, Äther und Benzol gemacht. Im Bereiche der Wellenlängen von 380 bis 250 $m\mu$ zeigt die optische Absorptionskurve einer Äther-Chlorophylllösung eine ähnliche Form wie Chloresium, obwohl die absoluten Werte etwas höher sind (Abb. 1).

Bestrahlung mit der Quarzlampe (Hanovia), 220 V Gleichstrom, wurde bei beiden Proben CD_1 und CD_2 bei verschiedenen Konzentrationen

** Für dieses Präparat und die dazugehörige Information sind wir der Sandoz Chemical Company und Mr. C. H. Paul zu Dank verbunden.

vorgenommen. Die bestrahlten Proben befanden sich — mit einer einzigen Ausnahme — in 40 cm Entfernung von der Lichtquelle, was Kühlung überflüssig machte. Die Bestrahlung wurde durch 8 Stdn. vorgenommen. Die Proben befanden sich in Quarzreagenzgläsern, die Vergleichsversuche in Pyrexglasgefäßen ähnlichen Durchmessers. Es wurden endlich auch

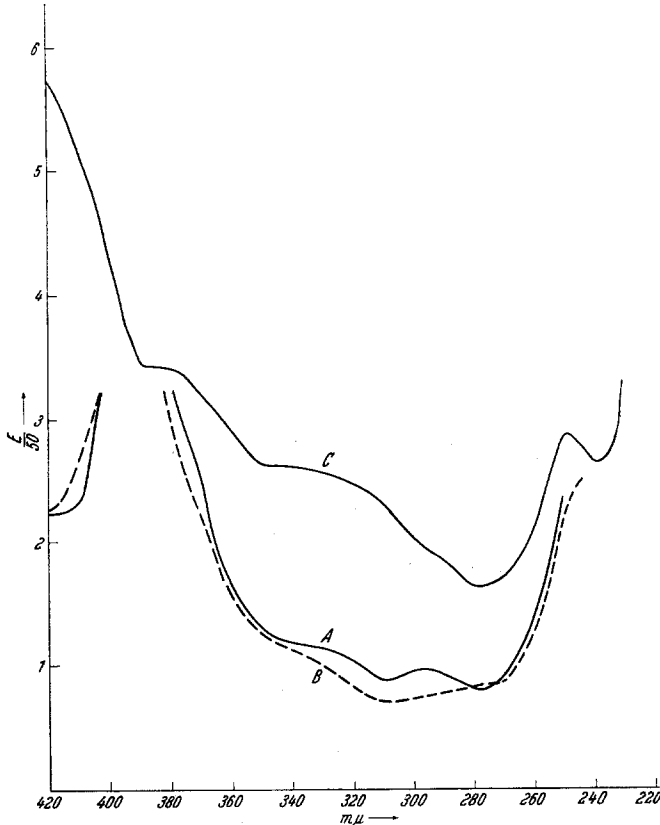


Abb. 1. Extinktionskurven von Chloroform vor und nach Reinigung.
 0,02% Chloroform.
 A Original.
 B „Rekristallisiert“.
 0,02% Chlorophyll.
 C Chlorophyll in Äther.

Proben in offenen Bechergläsern mit einer Flüssigkeitsschicht von 1 cm Dicke direkt unter dem Quarzbrenner bestrahlt. Abb. 2 gibt alle Ergebnisse der Spektrophotometrie von CD_1 bei einer Konzentration von 0,02% wieder. Sie zeigt, daß weder die Bestrahlung mit sichtbarem (Pyrex), noch mit sichtbarem und Kurzwellenlicht (Quarz) merkliche Änderungen der optischen Absorption von CD_1 verursacht.

Dafür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Nach der ersten wird das Versagen der Einwirkung von Kurzwellenlicht durch Mangel einer spezifischen Absorptionsbande in diesem Bereich verursacht. Die zweite würde eine Schirmwirkung des Chlorophyllderivats selbst voraussetzen, wodurch das kurzwellige Licht am Eindringen in die Flüssigkeitsschicht

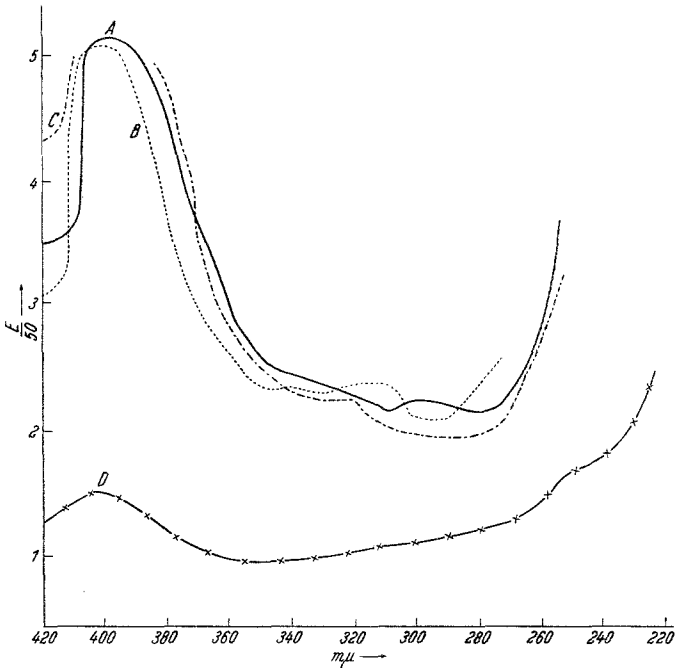


Abb. 2. Extinktionskurven von Chloresium vor und nach Bestrahlung.

- A 0,02% Chloresium.
- B 0,02% Chloresium in Quarz bestrahlt.
- C 0,02% Chloresium in Pyrexglas bestrahlt.
- D Bei 0,005% Konzentration bestrahlt und dann auf 0,02% eingengt.

verhindert wird. Diese zweite Annahme kann experimentell geprüft werden. Eine 0,02%ige CD_1 -Lösung wurde auf 0,004% verdünnt, wie vorher bestrahlt und in einem Vakuumexsikkator über wasserfreier Phosphorsäure auf die ursprüngliche Konzentration gebracht. Eine solche Lösung ist entschieden gelber und heller als die unbestrahlte Probe gleicher Konzentration. Die Kurve D der Abb. 2 zeigt das optische Verhalten einer solchen Lösung im Kurzwellenbereich. Obwohl das Maximum bei etwa 4000 Å und der allgemeine Verlauf der ganzen Kurve erhalten blieb, ist die Intensität der Absorptionsbande nur etwa ein Fünftel der ursprünglichen, also sehr stark herabgesetzt. Um zu prüfen, ob dies

auf das Chlorophyllderivat selbst oder auf irgendein Wachs oder eine harzähnliche Verunreinigung zurückgeführt werden muß, wurden die gleichen Versuche mit „rekristallisiertem“ Chloresium gemacht. Alle diese Versuche wurden mit 0,004%igen Lösungen wiederholt. Abb. 3 gibt eine Übersicht der Ergebnisse. Die optischen Absorptionskurven der unbestrahlten und der in Pyrexglas bestrahlten Probe waren praktisch gleich (Kurven A und B). Andererseits zeigt das im Quarzglas bestrahlte Produkt eine Absorptionskurve, die entschieden niedriger liegt, obwohl

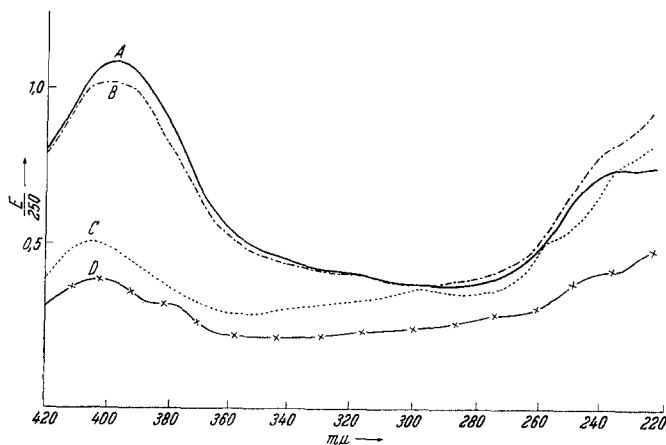


Abb. 3. Extinktionskurven von „rekristallisiertem“ Chloresium vor und nach Bestrahlung.
 A 0,004% „rekristallisiertes“ Chloresium.
 B 0,004% „rekristallisiertes“ Chloresium, 8 Stunden in Pyrexglas bestrahlt.
 C 0,004% „rekristallisiertes“ Chloresium, 8 Stunden in Quarzglas bestrahlt.
 D 0,004% „rekristallisiertes“ Chloresium mit etwa doppelter Intensität bestrahlt.

die Form der Kurve zu einem gewissen Grad erhalten scheint (Kurve C). Mit noch intensiverer Bestrahlung kann ein noch deutlicherer Effekt erzielt werden (Kurve D). Nach neueren Arbeiten über Lichtbleichung reinen Chlorophylls (*Mc Brady* und *Livingston*) schien es interessant, einige unserer Kurzwellenbestrahlungsversuche mit reinem Chlorophyll zu wiederholen. Entgegen den Beobachtungen von *Mc Brady* und *Livingston* wurde vollkommene Bleichung auch in Gegenwart von O_2 erzielt. Ähnlich wie bei CD_2 erstreckten sich die Änderungen auch in den Kurzwellenbereich des Spektrums. Das gebleichte reine Chlorophyll hat den größten Teil seiner ursprünglichen Absorptionswirkung verloren (Abb. 4).

Es scheint deshalb, daß entgegen der vorherrschenden Auffassung⁹ Kurzwellenlicht nicht nur die CD im sichtbaren Bereich (Farbänderung), sondern auch das optische Absorptionsvermögen im Kurzwellenbereich merklich beeinflußt, vorausgesetzt, daß die Schirmwirkung konzentrierterer Lösungen ausgeschaltet wird. Dieses letztere Verhalten ähnelt sehr

jenem anderer Biokolloide, z. B. der Proteine (*Spiegel-Adolf*¹¹). Andererseits wurde Chlorophyll kürzlich von *Roffo* als Mittel zur Filtration langer ultravioletter Strahlen für die Prophylaxe von Hautkrebs vorgeschlagen. Im Lichte dieser Ergebnisse müßte die Konzentration des angewendeten Chlorophylls beachtet werden.

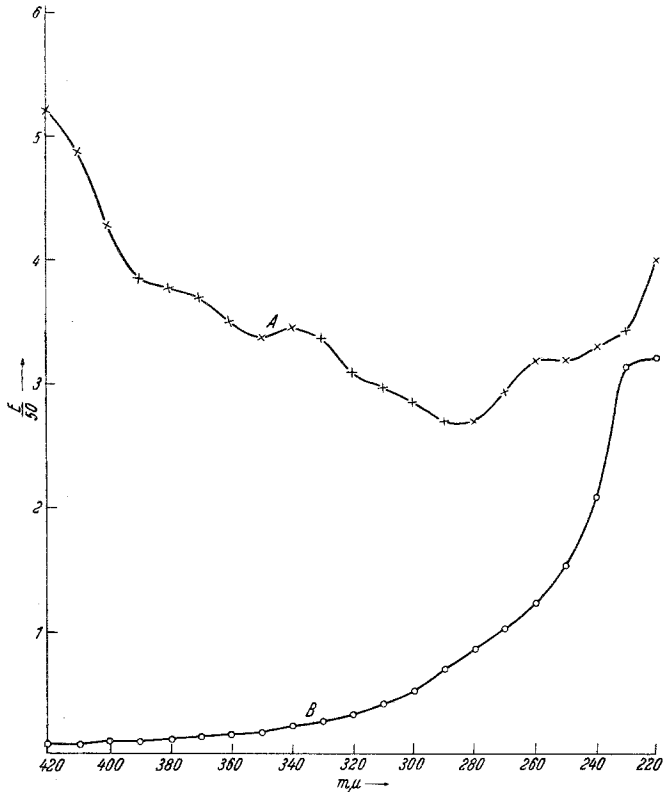


Abb. 4. 0,01% Chlorophyll in Äthylalkohol.
A Nicht bestrahlt.
B Bei 0,004% Konzentration bestrahlt.

Eine Reihe anderer physikochemischer und biophysikalischer Wege zur Charakterisierung der CD-Produkte wurde beschränkt. Da einige der Ergebnisse negativ waren, sollen sie hier kurz besprochen werden.

Röntgeninterferenz. Von allen drei Präparaten wurden Röntgenbeugungsaufnahmen gemacht. Der Apparat und die Technik sind schon beschrieben worden^{11, 12}. Belichtungszeiten von 4 Stdn. wurden angewendet. CD₁ und CD₂ gaben nach 2 Stdn. wie erwartet ein Beugungsbild, das praktisch gleich dem des Kochsalzes war. Trotzdem waren einige schwache diffuse Ringe mit größeren Abständen als jenen des Kochsalzes

anscheinend vorhanden. Um ein klares Bild zu erhalten, wurde von einer Probe CD_3 eine Aufnahme über 4 Stdn. gemacht. Außer einer Anzahl sehr schwacher Linien, die als $NaCl$ -Beugungslinien identifizierbar sind, können deutlich zwei diffuse Ringe mit den Abständen 4,12 und 10,5 Å gesehen werden. Obwohl mikroskopisch keine Kristalle sichtbar waren, scheint das Röntgenbild irgendeine Art struktureller Anordnung anzudeuten¹².

Elektrophorese. Bei einer ersten Versuchsreihe wurde die Wanderung von CD im elektrischen Strom untersucht. Dazu wurde der Apparat von *Landsteiner-Pauli*⁵ angewendet. Er besteht hauptsächlich aus einem U-förmigen Rohr, dessen unterer Teil, der die zu untersuchende Flüssigkeit enthält, mit Schliffhähnen abgesperrt werden kann. Der übrige Teil des Apparates ist so konstruiert, daß die Platinelektroden nicht direkt in den oberen Teil des U-förmigen Gefäßes tauchen, der mit einer KCl -Lösung von etwa der gleichen Leitfähigkeit wie die untersuchte Flüssigkeit gefüllt ist. Wie aus der Konstitution des CD als komplexes Na -Salz zu erwarten war, wandert der gefärbte Komplex zum positiven Pol. Bei einem Gefälle von 93/75 Volt pro cm erreicht die Wanderungsgeschwindigkeit $3,3 \times 10^{-5}$ cm/Sek. (vgl. *Adolf*¹). Ein Vorversuch wurde gemacht, um sicherzustellen, ob eine Fraktionierung von CD durch Elektrophorese Aussichten bietet. Dazu wurde die folgende Methode angewendet, die die besprochene Apparatur von *Landsteiner-Pauli* und ein elektrisches Kolorimeter von *Klett-Summerson* benützt. Die Elektrophorese wurde in üblicher Weise durchgeführt, bis die scharfe Grenzschicht eine gewisse Marke über dem Schliffhahn erreichte, dann wurden die Schliffhähne geschlossen, die gefärbte Schicht sorgfältig mit einer Kapillarpipette abgenommen und das Volumen vom Schliffhahn bis zur Marke (v) wie auch das Volumen zwischen den Schliffhähnen (V) durch Füllung mit Quecksilber genau gemessen. Kolorimetrische Messungen wurden unter Verwendung eines passenden Filters mit der ursprünglichen Lösung (A) von CD , der Lösung nach der Elektrophorese (B) und der elektrophoretisch transportierten Lösung (C) vorgenommen. Die Menge gewandelter Chlorophyllderivate (Cv) wird von der ursprünglichen Lösung AV abgezogen. Der Unterschied wird verglichen mit der Lösung BV , die zwischen den Schliffhähnen geblieben ist und mit einer Menge überstehender KCl -Lösung verdünnt wurde, die den elektrophoretisch entfernten Chlorophyllderivaten entspricht. In einem Versuch dieser Art stimmten die Ergebnisse bis auf 5% überein. Dementsprechend scheint eine elektrophoretische Fraktionierung von Chlorophyllderivaten sehr unwahrscheinlich und praktisch nicht anwendbar.

Sauerstoffmetabolismus. Nach den Arbeiten *Bürglis* schien es interessant zu prüfen, ob Chlorophyllderivate den Sauerstoffmetabolismus beein-

flussen können. Die Sauerstoffaufnahme von Hefezellen, Rattenleber, gestreiftem Muskel (Diaphragma) und Hirngewebe wurde nach der Technik von *Warburg* geprüft*. In keiner der vorerwähnten Zellen und Gewebe konnte selbst bei Ausdehnung der Versuchszeit auf 5 Stdn. ein Anzeichen dafür gefunden werden, daß Chloresium in Konzentrationen von 0,2 und 1,0% irgendeinen Einfluß auf die Sauerstoffaufnahme hat.

Zusammenfassung.

Ultraspektrophotometrische Untersuchungen von wasserlöslichen Chlorophyllderivaten (CD) wurden vor und nach Bestrahlung mit kurzwelligem Licht vorgenommen. Die Wirkung hängt von der Konzentration der CD und von der Intensität der Bestrahlung ab. Kontrollversuche wurden mit reinem Chlorophyll durchgeführt. Röntgenbeugungsbilder der CD zeigten zwei diffuse Ringe mit Abständen entsprechend 4,12 und 10,5 Å. Elektrophoretische Messungen zeigten, daß CD mit einer Geschwindigkeit von $2,7 \times 10^{-5}$ cm/Sek. und Volt wandern. Kombinierte elektrophoretische und kolorimetrische Messungen geben praktisch keinen Hinweis auf eine Fraktionierung durch den elektrischen Strom. Nach Versuchen mit der Technik von *Warburg* beeinflussen CDs den Sauerstoffmetabolismus verschiedener tierischer und pflanzlicher Gewebe nicht**.

Literaturhinweise.

- ¹ *M. Adolf*, Kolloidchem. Beih. **19**, 363 (1924).
- ² *V. M. Albers* und *H. V. Knorr*, Science (New York) **85**, 51 (1937).
- ³ *E. Bürgi*, Das Chlorophyll als Pharmakon. Leipzig: G. Thieme. 1932.
- ⁴ *H. Fischer* und *A. Stern*: Die Chemie des Pyrrols, II. Ann. Arbor. Mich. Edwards Bros. 1943.
- ⁵ *K. Landsteiner* und *W. Pauli*, Proc. Congress Int. Med. Vienna. 1908.
- ⁶ *J. J. McBrady* und *R. Livingston*, J. Phys. Coll. Chem. **52**, 662 (1948).
- ⁷ *E. Rabinowitch*, Rev. mod. Physics **16**, 226 (1944).
- ⁸ *A. E. Roffo jr.*, Bol. Inst. Med. exp. Estud. Tratamiento Cancer **21**, 589 (1944).
- ⁹ *P. Rothmund*, Chlorophyll. Med. Physics. e. O. Glasser Year Book Publ., S. 154. Chicago, Ill. 1944.
- ¹⁰ *L. W. Smith*, Amer. J. med. Sci. **207**, 647 (1944).
- ¹¹ *M. Spiegel-Adolf*, Biochemic. J. **28**, 372 (1934).
- ¹² *M. Spiegel-Adolf* und *G. C. Henny*, J. Amer. chem. Soc. **61**, 2178 (1939).
- ¹³ *M. Spiegel-Adolf* und *G. C. Henny*, X-Ray Diffraction Studies in Biology and Medicine. New York: Grune and Stratton. 1947.

* Diese Messungen wurden von Herrn *Gene Blumfield* durchgeführt.

** Ermöglicht durch eine Spende der Rystan Corporation.