

CHLOROPHYLL C*†

H. BUDZIKIEWICZ und K. TARAZ

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln

(Received in Germany 21 December 1970; Received in the UK for publication 11 January 1971)

Zusammenfassung—Aus *Fucus serratus* isoliertes Chlorophyll c ist, wie auf chemischem und spektroskopischem Wege gezeigt wird, ein 1:2-Gemisch der Mg-Komplexe von trans-7',7''-Dehydro-2-desäthyl-2-vinyl-phäoporphyrin a₅-10-methylester (Chlorophyll c₁, I) und trans-7',7''-Dehydro-2,4-bisdesäthyl-2,4-divinyl-phäoporphyrin a₅-10-methylester (Chlorophyll c₂, II).

Abstract—It is shown by chemical and spectroscopic methods that chlorophyll c isolated from *Fucus serratus* is a 1:2 mixture of the Mg complexes of trans-7',7''-dehydro-2-deethyl-2-vinyl-pheoporphyrin a₅-10-methyl ester (chlorophyll c₁, I) and trans-7',7''-dehydro-2,4-bisdeethyl-2,4-divinyl-pheoporphyrin a₅-10-methyl ester (chlorophyll c₂, II).

1. EINFÜHRUNG

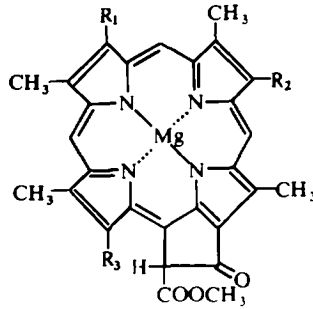
DIE ANWESENHEIT eines mit den Chlorophyllen höherer Pflanzen nicht identischen grünen Pigments in Braun- und Kieselalgen wurde bereits Mitte des vorigen Jahrhunderts festgestellt.¹ Willstätter² hielt diesen Farbstoff für ein post-mortem-Zersetzungsprodukt von Chlorophyll a, doch konnten eingehende Untersuchungen von Strain und Manning³ zeigen, dass er bereits in der lebenden Zelle vorhanden ist, und heute erscheint es gesichert, dass er an der Photosynthese teilnimmt und dabei wahrscheinlich das in Algen meist fehlende Chlorophyll b vertritt.^{4,5}

Die für dieses Pigment vorgeschlagenen Bezeichnungen sind keineswegs einheitlich und eindeutig. Der ursprüngliche Name Chlorofucin wurde später durch Chlorophyllin γ , Chlorophyll γ , Chlorophyll c und Chlorophyllit c ersetzt,⁶ wobei jedoch das Algen-Chlorophyll c nichts mit dem umstrittenen Chlorophyll c höherer Pflanzen (wahrscheinlich ein Gemisch von Chlorophyll a und Phäophytin a) zu tun hat.⁷ Nach einem Vorschlag von Dougherty *et al.*⁴ sollte für das natürliche Pigmentgemisch (s. unten) die Bezeichnung Chlorophyll c beibehalten werden, die einzelnen Komponenten als Chlorophyll c₁ (I) und c₂ (II) und deren magnesiumfreie Derivate als Phäophorbid c₁ (III) und c₂ (IV) (als Gemisch Phäophorbid c) bezeichnet werden. Diese Bezeichnungsweise soll auch in der vorliegenden Arbeit verwendet werden.

Chlorophyllc als typisches Algenchlorophyll findet sich hauptsächlich in Phäophyten (Braunalgen), Bacillariophyten (Kieselalgen), Chryseophyten und Dinoflagellaten, wo Angaben für eine ganze Reihe von Spezies vorliegen.^{3,4,8} Da jedoch in vielen Fällen zu wenig Material für eine eingehende Untersuchung vorhanden war, beschränkte man sich gewöhnlich auf eine Charakterisierung durch ein EA-Spektrum. Gerade diese Spektren sind jedoch sehr abhängig von den Aufnahmebedingungen⁹⁻¹¹

* 5. Mitteilung der Reihe "Zur Photosynthese grüner Pflanzen"; 4. Mitt.: H. Budzikiewicz und H. Eckau, *Z. Naturf.* 25b, 610 (1970).

† Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. H. H. Inhoffen zum 65. Geburtstag!



	R ₁	R ₂	R ₃
I	—CH=CH ₂	—C ₂ H ₅	—CH ^{II} —COOH
II	—CH=CH ₂	—CH=CH ₂	—CH ^{II} —COOH
III	—CH=CH ₂	—C ₂ H ₅	—CH ^{II} —COOH, 2 H statt Mg
IV	—CH=CH ₂	—CH=CH ₂	—CH ^{II} —COOH, 2 H statt Mg
V	—C ₂ H ₅	—C ₂ H ₅	—CH ₂ —CH ₂ —COOCH ₃ , 2 H statt Mg
VI	—CH—CH—COOC ₂ H ₅ CH ₂	—C ₂ H ₅	—CH ^{II} —COOCH ₃ , Cu statt Mg
VII	—C ₂ H ₅	—C ₂ H ₅	—CH ^{II} —COOCH ₃ , 2 H statt Mg
X	—CH=CH ₂	—C ₂ H ₅	—CH ₂ —CH ₂ —COOCH ₃ , 2 H statt Mg
XI	—CH—CH—COOC ₂ H ₅ CH ₂	—C ₂ H ₅	—CH ₂ —CH ₂ —COOCH ₃ , Cu statt Mg
XII	—C ₂ H ₅	—CH=CH ₂	—CH ^{II} —COOH

(vergl. auch Abschn. 4 und Tabelle 2), und so wird in manchen Fällen eine eindeutige Bestätigung noch notwendig sein.

Ältere chemische Untersuchungen an Chlorophyll c (für eine eingehende Diskussion siehe¹²) sind z.T. nicht eindeutig oder sogar einander widersprechend. Als gesichert geht daraus nur hervor, dass Chlorophyll c ein Mg-Komplex^{13, 14} eines Porphyrins, wahrscheinlich Phäoporphyrins mit freier Carboxylgruppe ist.¹³

Die vollständigsten Angaben liegen über Untersuchungen an Chlorophyll c aus der Kieselalge *Nitzschia closterium* vor, die parallel zu unseren Arbeiten durchgeführt worden sind und die auf Grund der HJ-Reduktion zu Phäoporphyrin a₅ (V), massenspektroskopischer Untersuchungen eines Umwandlungsprodukts nicht gesicherter Struktur sowie einer eingehenden Analyse des NMR-Spektrums zu dem Schluss führten, dass ein Gemisch von I und II im Verhältnis 1:1 bis 2:1 vorliegt. Für die Lokalisierung der Vinylgruppe in I wurden jedoch nur biogenetische Überlegungen herangezogen.^{4, 15}

2. Isolierung von Chlorophyll c

Bei unseren Untersuchungen gingen wir von *Fucus serratus* (gesammelt vor der Küste von Helgoland) aus. Zur Isolierung grösserer Mengen von Chlorophyll c erwies sich das folgende Verfahren am geeignetsten: Die von anhaftendem Schleim befreiten und mechanisch zerkleinerten Algen werden sofort in Aceton eingebracht, um eine enzymatische Verseifung von Chlorophyll a möglichst zu vermeiden, da sich Chlorophyll c von grösseren Mengen Phäophorbida oder Chlorophyllida nur schlecht

abtrennen lässt. Aus dem gleichen Grund ist auch eine möglichst rasche Aufarbeitung bzw. Einfrieren des Pflanzenmaterials notwendig. Weiters ist zu beachten, dass Chlorophyll c während des gesamten Aufarbeitungsprozesses gelöst bleibt, da einmal ausgefällte oder ausgefallene Präparate—wahrscheinlich infolge Assoziatbildung—nur schwer wieder in Lösung zu bringen sind. Abtrennung des grössten Teils von Chlorophyll a, Carotinoiden und Fetten erfolgt durch Extraktion mit Petroläther, der Rest wird durch Chromatographie an Kieselgel entfernt. Gegebenenfalls noch vorhandenes Phäophorbid a kann durch Chromatographie der Methylester abgetrennt werden. Da die Veresterung mit Diazomethan leicht zu komplexen Gemischen führt,⁴ ist es notwendig, das Reagenz in kleinen Portionen zuzusetzen, den Verlauf der Reaktion ständig chromatographisch zu verfolgen und die Reaktion nach Beendigung der Veresterung sofort abzubrechen. Auf diese Weise kann eine praktisch quantitative Veresterung erreicht werden.

3. Strukturermittlung

Um eine übersichtlichere Darstellung der Untersuchungen zu ermöglichen, sei das Ergebnis vorweggenommen: Chlorophyll c aus *Fucus serratus* ist ein 1:2-Gemisch der Mg-Komplexe von trans-7',7''-Dehydro-2-desäthyl-2-vinyl-phäoporphyrin a₅-10-methylester (I) und trans-7',7''-Dehydro-2,4-bisdesäthyl-2,4-divinyl-phäoporphyrin a₅-10-methylester (II).

3.1. *Struktur des Porphyrinskelettes*. Wie bereits in der Literatur berichtet, weisen die EA-Spektren (für Lit. siehe^{4, 8, 12}) sowie der positive Phasentest¹³ auf ein Phäoporphyrinskelett hin, dessen Struktur durch Hydrierung von Phäophorbid-c-methylester mit Pd-Kohle und Reoxydation der entstandenen Leuko-Verbindung zu Phäoporphyrin-a₅-dimethylester (V) gesichert werden konnte. Die Identifizierung mit einem authentischen Präparat erfolgte durch Vergleich der EA-, IR-, NMR- und Massenspektren sowie der R_f-Werte.

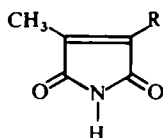
3.2. *Molekulargewichtsbestimmung und Feststellung des Gemischcharakters*. Da bisher keine eindeutige Molekulargewichtsbestimmung von Chlorophyll c vorlag (frühere massenspektroskopische Untersuchungen erfolgten an einem Derivat ungesicherter Konstitution^{4, 15}), versuchten wir vorrangig diese Frage zu klären. Das Massenspektrum von Phäophorbid c-methylester zeigt zwei Molekül-Ionen bei *m/e* 600 und 602, die auf ein Gemisch hinweisen, dessen Komponenten sich nach den Ergebnissen von Abschn. 3.1. von V durch zwei bzw. drei zusätzliche Unättigungsgrade in den Seitenketten unterscheiden sollten. Einen eindeutigen Schluss bezüglich des Vorhandenseins der Komponente *m/e* 602 lässt das Ergebnis jedoch nicht zu, da bei Porphin-Derivaten Hydrierung von Vinylgruppen im Massenspektrometer beobachtet worden ist¹⁶ (vergl. jedoch auch Abschn. 4).

Eine unabhängige Bestätigung für das Vorhandensein der schwereren Komponente konnte auf folgendem Weg erbracht werden: Porphin-Vinyl-Gruppen lassen sich durch Umsetzung mit Diazoessigester in die entsprechenden Cyclopropan-Derivate überführen, wobei die Ausbeute durch Einsetzen der Kupferkomplexe und Katalyse mit Cu^{II}-Acetat erheblich verbessert werden kann.¹⁷ Aus dem Reaktionsgemisch des Cu-Komplexes von Phäophorbid c-methylester mit Diazoessigsäureäthylester liess sich chromatographisch eine Komponente abtrennen, deren Massenspektrum ein Molekulargewicht von 749 (bezogen auf ⁶³Cu) ergibt und die somit nur durch

Addition von $:\text{CHCOOC}_2\text{H}_5$ an den Cu-Komplex von *m/e* 602 entstanden sein kann.

Zur Struktur dieses Additionsproduktes (VI) ist unter Vorwegnahme der Struktur von Chlorophyll c_1 (I) zu sagen, dass Anlagerung an die Vinylgruppe und nicht an die Acrylester-Seitenkette erfolgt ist, wie eine Analyse der EA-Spektren ergibt. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, führt Reduktion der Vinylgruppen (VII) zu einer hypsochromen Verschiebung aller Banden um etwa 5 nm, was auch den Literaturwerten entspricht, während Entfernung der Acrylsäure-Seitenkette die Lage der Banden stärker beeinflusst (z.B. Δ für Bande I 12 nm). Analoge Verschiebungen werden auch bei den Cu-Komplexen beobachtet (Tabelle 2). Bildung eines Cyclopropanringes hat auf die Bandenlagen ähnlichen Einfluss wie Hydrierung (vergl. Tabelle 2).¹⁷ Die geringen Verschiebungen beim Übergang von Cu-III nach VI sowie ein Vergleich von VI mit Cu-VII in Gegensatz zu Cu-V sowie von Cu-V mit XI schliessen daher eine Addition an die Acrylester-Seitenkette aus.

3.3. *Oxidativer Abbau.* Phäophorbid c wurde nach der Methode von Rüdiger¹⁸ mit Dichromat abgebaut. Im Reaktionsprodukt konnten chromatographisch Methyl-äthyl- (VIII) und Methyl-vinyl-maleinimid (IX) nachgewiesen werden, was das Vorliegen von entsprechend substituierten Ringen im Gemisch beweist.



VIII: R = $-\text{C}_2\text{H}_5$

IX: R = $-\text{CH}=\text{CH}_2$

3.4. Diskussion der NMR-Spektren.

Die Zuordnung der einzelnen Signale erfolgt durch Vergleich der Spektren von Chlorophyll c_1 (I) und c_2 (II), Phäophorbid-c-methylester, 7',7''-Dehydrophäoporphyrin- a_3 -dimethylester (VII), 2-desäthyl-2-vinyl-phäoporphyrin- a_3 -dimethylester (X) und Phäoporphyrin- a_3 -dimethylester (V). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst (vergl. hierzu^{4, 15}). Die einzelnen Signale sollen hier nur diskutiert werden, soweit sie die Eintragungen in der Tabelle näher erläutern.

Dubletts bei 7,21 und 9,24 ppm, $J = 17$ Hz bei I sowie die analogen Signale bei II, III + IV und VII. Diese Signale entsprechen den Protonen an einer *trans*-disubstituierten Äthylen-Doppelbindung. Die chemische Verschiebung gegenüber den Vinyl-Signalen (s.u.) spricht für die Anwesenheit eines stark elektronegativen Substituenten. In Zusammenhang mit den Ergebnissen von Abschn. 3.1., 3.2. (Tabelle 1) und 3.5. ist damit die Anwesenheit der *trans*-Acrylsäure-Seitenkette gesichert.

Vinylsignale. Im Spektrum von Chlorophyll c_1 findet sich das für eine Vinylgruppe typische ABX-Muster, das die gleichen chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten wie X aufweist (Abb. 3). Im Spektrum von Chlorophyll c_2 sowie in dem von Phäophorbid-c-methylester ist dieses ABX-Muster von einem zweiten überlagert (Abb. 2 und 3). Die Analyse des AB-Teils für beide Spektren ist in Abb. 4 und 5

TABELLE 1. EA-SPEKTREN VON PHÄOPHORBIID-C-DERIVATEN*

Verbindung	Lsg.-M.	I	II	III	IV	Soret	Intensitätsverhältnis
Phäophorbid-c-methylester IV-Methylester	CH ₂ Cl ₂	650	592	579	532	433	0, 18: 1:1, 05:0, 82: 13, 90
	CH ₂ Cl ₂	654	598	580	536	434	0, 60: 1:1, 01:1, 06:9, 40
	Äther	665	595	573	530	428	0, 19: 1:0, 96:0, 68: 11, 42
III-Methylester	CH ₂ Cl ₂	651	592	582	533	434	0, 84: 1:1, 04: 1, 07:8, 15
	Äther	666	590	570	525	424	0, 19: 1:0, 89:0, 68:8, 68
VII	CH ₂ Cl ₂	645	587	575	527	430	0, 14: 1:1, 08:0, 54: 10, 5
V	CH ₂ Cl ₂	633	584	565	522	420	0, 16: 1:1, 18:0, 48:9, 50
X	CH ₂ Cl ₂	637	588	568	524	419	

* Da infolge der schlechten Löslichkeit von Chlorophyll c und seinen Derivaten (s. o.) sich die Absolutwerte der Extinktionen nur äusserst ungenau bestimmen lassen, sind hier nur die Intensitätsverhältnisse der einzelnen Banden angegeben.

TABELLE 2. EA-SPEKTREN VON CHLOROPHYLL C UND DERIVATEN*

Verbindung	Lsg.-M.	α	β	Schulter	Soret	Intensitätsverhältnis
I	Aceton	629	580		444	1:0, 66: 6, 88
	Äther	626	576		444	1:0, 80: 8, 50
	Methanol	633	584		445	1:0, 71: 7, 72
II	DMFO	628	579	535	446	1:0, 67: 7, 00
	Aceton	628	580		447	1:1, 00:9, 40
	Äther	627	578		448	1:1, 08: 12, 04
	Methanol	636	588		452	1:0, 90:9, 66
	DMFO	631	583	543	449	1:0, 99:7, 90
Cu-III	CH ₂ Cl ₂	608	560	540	425	1:0, 81:5, 18
Cu-VII	CH ₂ Cl ₂	602	558	535	422	1:0, 66:5, 46
	CH ₂ Cl ₂	606	558	535	422	1:0, 71:4, 38
Cu-V	CH ₂ Cl ₂	601	551	528	415	1:0, 37:5, 73
Cu-X	CH ₂ Cl ₂	608	556	531	419	1:0, 25:4, 95
	CH ₂ Cl ₂	601	550	527	414	1:0, 37:5, 56

* Siehe Anm. Tab. 1. DMFO ist Dimethylformamid.

TABELLE 3. NMR-SPEKTREN VON CHLOROPHYLL C UND DERIVATEN. LÖSUNGSMITTEL TRIFLUORESSIGSÄURE (TFE)—D: CHEMISCHE VERSCHIEBUNGEN IN δ -WERTEN; ANGABEN IN KLAMMERN: KOPPLUNGSKONSTANTE, MULTIPLIZITÄT UND INTEGRALWERT

Protonenart	I ^a	II ^b	Phäophorbid-c-methylester ^c	VII	X	V
4-CH ₂ -CH ₃	1.84 (7 Hz, T, 3)	—	1.84 (7 Hz, T, 1)	1.86 (7 Hz, T, 3)	1.84 (7 Hz, T, 3)	1.86 (7 Hz, T, 3)
2-CH ₂ -CH ₃	—	—	—	1.80 (7 Hz, T, 3)	—	1.79 (7 Hz, T, 3)
4-CH ₂ -CH ₃	~4.2	—	~4.2 ^d	~4.2	~4.2	~4.2
2-CH ₂ -CH ₃	—	—	—	~4.2	—	~4.2
Ring- u. Ester —CH ₃	3.72 (3) 3.80 (3) 3.92 (6) 3.99 (3)	3.78 (6) 3.89 (3) 3.92 (3) 3.95 (3)	3.80 3.92 3.98	3.77 (9) 3.91 (6)	3.72 (3) 3.77 (9) 3.90 (3) 4.02 (3)	3.72 (3) 3.77 (9) 3.90 (3) 4.02 (3)
—CH=CH—COOCH ₃	—	—	4.22 (3)	4.01 (3) (?)	—	—
—CH=CH—COOR	7.21 (17 Hz, D, 1)	7.24 (17 Hz, D, 1)	7.23 (17 Hz, D, 1)	7.24 (16 Hz, D, 1)	—	—
C-10-H	9.24 (17 Hz, D, 1)	9.24 (17 Hz, D, 1)	9.17 (17 Hz, D, 1) 7.59 (1)	9.18 (16 Hz, D, 1)	—	—
C-2-Vinyl ^e	6.36 (1)	6.36 (1)	6.37	—	6.36 (1)	—
H _{A1} , H _{B1}	6.58 (1)	6.60 (1)	6.59	—	6.58 (1)	—
H _{A1} , H _{A1}	8.19 (1)	8.19 (1)	8.19	—	8.19 (1)	—
H _{A1} , H _{X1}	—	—	—	—	—	—
C-4-Vinyl ^e	—	6.46 (1)	6.46	—	—	—
H _{B2}	—	6.59 (1)	6.59	—	—	—
H _{A2}	—	8.24 (1)	8.23	—	—	—
H _{X2}	—	—	—	—	—	—
Methinprotonen	—	—	11.02 (2) 11.10 (1)	10.99 (2) 11.12 (1)	10.93 (1) 10.96 (1) 11.09 (1)	10.85 (1) 10.91 (1) 10.96 (1)

^a Zur Messung wurde I bzw. II eingesetzt; nach Abziehen von TFE, zweimaliger Aufnahme in Benzol und Abziehen des Lösungsmittels ergab eine Aufnahme des EA-Spektrums in Aceton, dass es sich um III bzw. um IV handelt. Überdies weist das EA-Spektrum von I und II in TFE auf Protonierung hin (vergl. J. E. Falk, "Porphyrins and Metalloporphyrins", Elsevier, Amsterdam, 1964, S. 74 ff). Es handelt somit um die NMR-Spektren von protoniertem III und IV.

^b Messung in TFE.

^c Verdeckt von den C-7-Esterprotonen.

^d Bei Messung in TFE-d wegen Austausch mit D nicht sichtbar.

^e Wegen der Bezeichnung der Protonen sowie der Kopplungskonstanten siehe Abb. 4 bis 6.

^f Nicht gemessen.

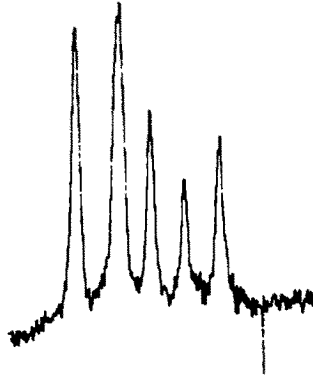


ABB 1. 100-MHz-NMR-Spektrum (Vinylbereich) von Phäophorbid-c-methylester

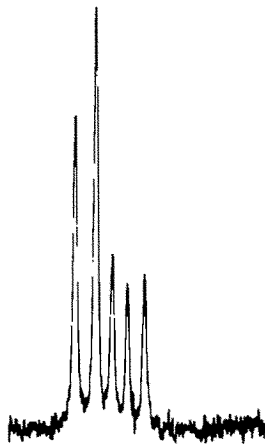


ABB 2. 100-MHz-NMR-Spektrum (Vinylbereich) von Chlorophyll c₂

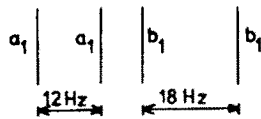


ABB 3. 100-MHz-NMR-Spektrum (Strichspektrum, Vinylbereich) von Chlorophyll c₁

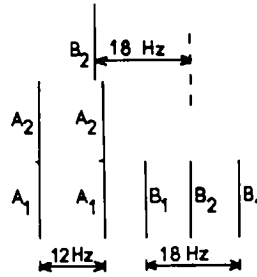


ABB 4. 100-MHz-NMR-Spektrum (Strichspektrum, Vinylbereich) von Chlorophyll c_2

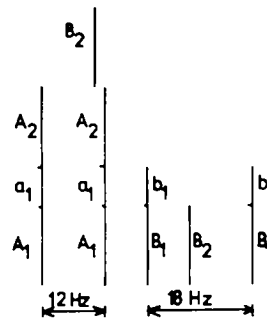


ABB 5. 100-MHz-NMR-Spektrum (Strichspektrum, Vinylbereich) von Phäophorbid-c-methylester

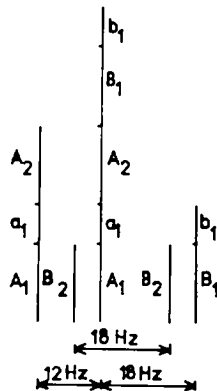


ABB 6. 60-MHz-NMR-Spektrum (Strichspektrum, Vinylbereich) von Phäophorbid-c-methylester

wiedergegeben. Eine Bestätigung der Zuordnungen ist entweder durch Signalverschiebung durch Zusatz von Benzol oder durch Messung mit einem 60-MHz-Gerät möglich (Abb. 6). Es soll hier noch darauf hingewiesen werden, dass bei Messung in Trifluoressigsäure von den Protonen des AB-Teils A bei tieferem und B bei höherem Feld liegt, bei Messung in $CDCl_3$,¹⁹ die relative Lage dieser beiden Signale jedoch umgekehrt ist.

Äthylsignale fehlen bei Chlorophyll c_2 . Die Fläche unter dem Signal bei Phäophorbid-c-methylester im Verhältnis zu denen von 1-Protonensignalen erlaubt den Schluss, dass das Gemisch von c_1 zu c_2 1:2 ausmacht. Dieses Ergebnis zeigt, dass die relativen Mengen der beiden Komponenten von Pflanze zu Pflanze variieren können, da sich z.B. für *Nitzschia closterium* eine Zusammensetzung von 1:1 bis 2:1 ergeben hat.^{4, 15}

Aus der chemischen Verschiebung der Äthyl- wie der Vinyl-Signale von I und II im Vergleich mit V und X lässt sich weiterhin ableiten, dass Chlorophyll c_1 tatsächlich die Struktur I und nicht die isomere XII besitzt.

Methinprotonen. Dougherty *et al.*⁴ stellten bei den Methinprotonen ihres Chlorophyll c sowie von dessen Derivaten (nicht aufgelöste) Satelliten etwa halber Intensität der Hauptsignale zu höherem Feld verschoben fest. Eine ähnliche unsymmetrische Signalverbreiterung in etwa gleichem Intensitätsverhältnis zeigt sich auch bei unserem Phäophorbid-c-methylester. Zwei Erklärungen sind angeboten worden,⁴ nämlich einmal der 2:1-Gemischcharakter und zweitens Diastereomerie an C-10. Beide Erklärungen sind jedoch nicht haltbar, da im ersten Fall bei uns das Intensitätsverhältnis umgekehrt wäre und im zweiten beide Signale gleich intensiv sein müssen, da Chlorophyll c (und damit seine Derivate), wie ORD-Messungen gezeigt haben, racemisch sind. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Satelliten um Signale, die durch Assoziatbildung zustande kommen.¹¹

3.5. Diskussion der Massenspektren

Die Hauptfragmente der hier interessierenden Verbindungen sind in Tabelle 4 zusammengestellt. M-32 und M-59 (Verlust von CH_3OH bzw. COOCH_3) sind typisch für Verbindungen mit isocyclischem Ring und C-10-Carboxymethyl-Gruppe,^{20, 21} wobei Methanolabspaltung z. T. thermisch erfolgt.²¹ M-73 ($\text{CH}_2\text{COOCH}_3$) tritt bei Porphyrin-Derivaten mit C-7-Propionsäure-methylester auf (a) und fehlt erwartungsgemäss bei den Verbindungen, die eine Acrylesterseitenkette besitzen. Die Entstehung von M-87 lässt sich, wie für b angegeben, deuten. Das Ion b ist bei 7',7''-gesättigten Verbindungen wegen der fehlenden Doppelbindung weniger gut stabilisiert und kann zu M-147 (c) weiter zerfallen (Bildung von c ist bei 7',7''-ungesättigten Verbindungen nicht möglich). Verlust von 60 u ($\text{COOCH}_3 + \text{H}$) statt einfacher Abspaltung der Estergruppe steht mit der allgemeinen Bevorzugung der Bildung geradelektronischer Ionen bei Porphin-Derivaten im Einklang.²² Über die Genese von M-120, für das auch eine multiple Abspaltung verantwortlich ist, soll ohne Markierungsversuche kein Mechanismus postuliert werden.

TABELLE 4. PARTIELLE MASSENSPEKTREN VON DERIVATEN DES CHLOROPHYLL C (% REL. INT.)

Verbindung	M ⁺	M - 32	M - 59	M - 73	M - 87	M - 120	M - 147
III-Methylester	100	58	30	—	25	25	—
VII	100	130	50	—	30	80	—
V	100	50	85	6	7	—	2
X	100	7	40	2	3	—	2

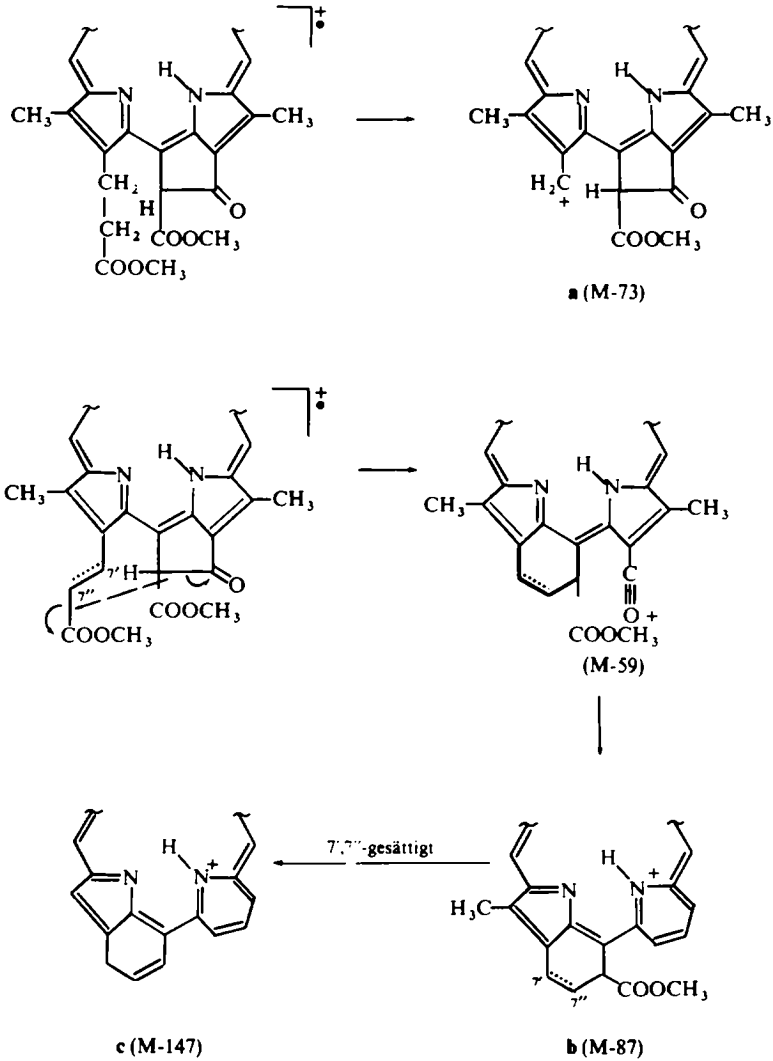


TABELLE 4.

Fasst man zusammen, so weisen auch die Massenspektren auf das Vorliegen des isocyclischen Ringes, das Fehlen einer Propionsäure- und die Anwesenheit einer Acrylsäure-Seitenkette hin.

4. Auftrennung von Chlorophyll c in die beiden Komponenten

Auftrennung von Chlorophyll c in zwei oder mehr Fraktionen an verschiedenen Adsorbentien ist in der Literatur mehrmals beschrieben worden, doch sind mit einer Ausnahme die einzelnen Komponenten nur EA-spektroskopisch charakterisiert worden (für eine Lit.-Zusammenstellung siehe¹²). So kann man z.B. bei Chromato-

graphie an Kieselgel mit CH_3OH -haltigen Solventien (vergl. auch³) zwei schlecht voneinander getrennte Zonen erhalten, deren EA-Spektren sich im wesentlichen durch das Intensitätsverhältnis der β - zur α -Bande unterscheiden (0,9 bei der schneller, 1,2 bei der langsamer laufenden Fraktion). Bei der zweiten Fraktion lässt sich auch das Mg leichter entfernen. Beide Fraktionen geben Phäophytin c mit gleichem EA-Spektrum und R_f -Wert auf Kieselgel-Platten. Da einerseits Erwärmen von Chlorophyll c (α -Bande intensiver als β -Bande) mit CH_3OH auf 50° zu einem Produkt mit umgekehrtem Intensitätsverhältnis der beiden Banden und andererseits Chromatographie mit CH_3OH -freien Solventien zu keiner Zonenbildung führt, kann man die beobachtete "Auftrennung" wohl einer Assoziatbildung¹¹ zuschreiben.

Auftrennung der beiden Komponenten kann jedoch erreicht werden entweder durch chromatographische Trennung der Cyclopropan-Derivate (vergl. Abschn. 3.2.) oder direkt durch Chromatographie von Chlorophyll c an Polyäthylenpulver^{4, 10} (Laufmittel 75% Aceton, 25% Wasser). Die so erhaltenen Chlorophylle c_1 (I, R_f -Wert 0,45) und c_2 (II, R_f -Wert 0,60) sind durch ihre EA- (Tabelle 2), NMR- (Tabelle 3) und Massenspektren (Tabelle 4) charakterisiert worden.

5. Zusammenfassung.

Die auf die einzelnen Strukturelemente von I und II hinweisenden Ergebnisse sind in Tab. 5 zusammengefasst.

TABELLE 5

Strukturelement	Nachweismethode	Abschn.
Molgew.	Massenspektrum	3.2
	Ums. m. Diazoessigester	3.2
	Oxid. Abbau	3.3
Gemischcharakter	Massenspektrum	3.2
	NMR-Spektrum	3.4
	Trennung	4
Mg Porphyrinskelett	Quant. Bestimmung	Lit. ^{13, 14}
	EA-Spektrum	Tabelle 1
	Massenspektren	3.5
	Hydrierung zu V	3.1
Nachw. u. Stellg. d. Methyl-Gruppen Vinyl-Gruppen u. Äthyl-Gruppe	Hydrierung zu V	3.1
	Hydrierung zu V	3.1
	NMR-Spektren	3.4
C-7-trans-Acrylsäure	Oxid. Abbau	3.3
	Ums. m. Diazoessigester	3.2
	HCl-Zahl	Lit. ¹³
	Veresterung	2
	NMR-Spektrum	3.4
Isocycl. Ring u. C-10 COOCH_3	Massenspektren	3.5
	EA-Spektren	Tabelle 1; 3.2
	Phasentest	Lit. ¹³
	EA-Spektren	Tabelle 1
	Hydrierung zu V	3.1
	Massenspektren	3.5

Die Untersuchungen sind dankenswerterweise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie vom Land Niedersachsen (Aufkommen aus der Konzessionsabgabe für das Zahlenlotto) gefördert worden. Bestens danken möchten wir gleichfalls Herrn Dr. P. Kornmann (Meeresbiologisches Institut, Helgoland) für seine Unterstützung bei der Beschaffung von Fucus, den Herren Dozenten Dr. H. Brockmann jr. und W. Rüdiger für wertvolle Anregungen und nicht zuletzt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. H. H. Inhoffen für die Überlassung zahlreicher Vergleichssubstanzen sowie für sein stetes Interesse an dieser Arbeit. Der Gesellschaft für Molekularbiologische Forschung mbH, Stöckheim, in deren Institut der grösste Teil der experimentellen Arbeit durchgeführt worden ist, möchten wir in gleicher Weise für die gewährten Arbeitsmöglichkeiten unseren Dank aussprechen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die EA-Spektren wurden mit einem CARY-14-Spektralphotometer der Applied Physic Corporation, die IR-Spektren mit dem Gerät 521 der Firma Perkin-Elmer (KBr), die NMR-Spektren mit einem HA-100-Gerät der Firma Varian, die Massenspektren mit dem Gerät MS-9 der Firma AEI (70eV, Quelltemperatur zwischen 270 und 310°) gemessen. Für analytische und präparative Dünnschichtchromatographie (DSC) wurden lufttrockene Platten (Schichtdicke 250 bzw. 500 μ) mit Kieselgel H bzw. Kieselgel (Korngrösse unter 0.08 mm) der Firma Merck verwendet. Da die physikalischen Daten der hier besprochenen Verbindungen bereits im theoretischen Teil aufgeführt sind, werden sie hier nicht mehr wiederholt.

Chlorophyll c. Das verwendete Algenmaterial wurde entweder spätestens 12 Stdn. nach dem Sammeln aufgearbeitet oder innerhalb dieser Zeit bei -20 bis -30° eingefroren und dann zur Weiterverarbeitung unter fliessendem Wasser aufgetaut. 20 kg Fucus serratus wurden bei Raumtemperatur unter fliessendem Wasser gewaschen, bis aller Schleim entfernt war (ca. 2 Stdn.; nicht vollständige Entfernung des Schleimes führt zur Emulsionsbildung bei der weiteren Aufarbeitung), mit einem Fleischwolf zerkleinert, mit 20 Ltr. Aceton übergossen und 2 Stdn. digeriert. Weitere dreimalige Extraktion des abgetrennten Pflanzenmaterials wie angegeben mit jeweils 20 Ltr. Aceton führte schliesslich zu nurmehr schwach strohgelb gefärbten Pflanzenresten. Die zusammengefassten Acetonextrakte wurden danach mit 15 Ltr. Petroläther (40 bis 80°) und so viel Wasser versetzt, dass sich zwei Schichten bildeten. Nach kräftigem Ausschütteln, Absitzenlassen und Entfernen der Petrolätherphase erfolgte noch zweimalige Extraktion mit je 15 Ltr. Petroläther, Sättigung der wässrigen Lösung mit NaCl und Extraktion des Chlorophyll c mit 10×5 Ltr. Äther (Farbe der wässrigen Phase schliesslich rötlich gelb). Die Ätherfraktionen wurden zusammengefasst, zweimal mit je 5 Ltr. eines mit NaCl gesättigten Aceton/Wasser-Gemisches (1:1) ausgeschüttelt, mit Na_2SO_4 über Nacht getrocknet und schliesslich i. Vak. eingeeengt. Das so erhaltene zähflüssige Substanzgemisch nahm man in wenig Aceton auf und brachte es auf eine mit Kieselgel beschickte Säule (Korngrösse unter 0.08 mm, aufgeschlämmt mit CCl_4 , Gewichtsverhältnis Substanz zu Kieselgel 1:300). Elution mit $\text{CCl}_4/\text{Aceton}$ (1:4) führt zur Abscheidung (in der angegebenen Reihenfolge) von β -Carotin, Phäophytin a, Chlorophyll a, Fucoxanthin sowie der Hauptmenge an Phäophorbid a, während sich Chlorophyll c durch ein Gemisch von Aceton, MeOH und CCl_4 (1:5:14) oder Aceton, Wasser und CH_2Cl_2 (9:4:6) von der Säule entfernen lässt. Ausbeute 100 mg Chlorophyll c.

Chlorophyll c_1 und c_2 konnte durch Säulenchromatographie von Chlorophyll c an Polyäthylenpulver der Firma Polysciences Inc. (keine nähere Bezeichnung) (Laufmittel Aceton/Wasser 3:1) erhalten werden.

Chlorophyll c-methylester. Zu einer ca. 0.01 molaren methanolischen Lösung von Chlorophyll c wurde eine ätherische Lösung von Diazomethan unter dünnschichtchromatographischer Kontrolle (Kieselgelplatten, Laufmittel: Aceton/ CCl_4 3:17) in kleinen Portionen zugesetzt, bis kein Chlorophyll c mehr nachzuweisen war (grüner Fleck auf der Startlinie). Aufarbeitung erfolgte durch Abdampfen der Lösungsmittel am Rotationsverdampfer, Reinigung (gegebenenfalls Abtrennung von noch vorhandenem Methylphäophorbid a) durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Aceton/ CCl_4 3:17) und Kristallisation aus $\text{CCl}_4/\text{Petroläther}$. Ausbeute quantitativ. Methylierung von reinem Chlorophyll c_1 bzw. c_2 erfolgte in analoger Weise.

Phäophorbid-c-methylester. 5 mg Chlorophyll-c-methylester wurden in 50 ml Aceton gelöst, mit 50 ml n/1 HCl im Scheidetrichter kurz geschüttelt, 5 Min. stengelassen und nach Zusatz von 200 ml H_2O mit 100 ml CCl_4 extrahiert. Nach Waschen der CCl_4 -Phase bis zur vollständigen Entfernung der HCl und

Abdestillieren des Lösungsmittels i. Vak. erhielten wir in quantitativer Ausbeute Phäophorbid-c-methylester.

Phäoophorphyrin-a₃-dimethylester (V) aus Phäophorbid-c-methylester. 25 mg Phäophytin-c-methylester in 30 ml CH₂Cl₂ wurden unter Zusatz von Pd-Kohle (10%ig) 3·5 Stdn. hydriert, nach Abfiltrieren des Katalysators und Abziehen des Lösungsmittels in Aceton aufgenommen, zur Rückoxidation der entstandenen Leuko-Verbindung 4 Stdn. bei Tageslicht an der Luft stehengelassen (bei künstlichem Licht ist bis zu 2 Tagen Röhren an der Luft notwendig) und schliesslich an Kieselgel (Aceton/CCl₄ 1:19) chromatographiert. Ausbeute an V nach Kristallisation an CH₂Cl₂/Äther 8 mg (= 30% d. Th.).

trans-7',7''-Dehydro-phäoophorphyrin-a₃-dimethylester (VII) aus Phäophorbid-c-methylester. Die Hydrierung erfolgte wie oben angegeben (eingesetzte Menge 10 mg), wurde jedoch nach 30 Min. abgebrochen. Ausbeute an VII nach Kristallisation aus CH₂Cl₂/Äther 4 mg (= 40% d. Th.).

Cu-phäophorbid-c-methylester. Die Darstellung erfolgte durch Versetzen einer Lösung von Phäophytin-c-methylester mit einer heissen gesättigten Lösung von Cu^{II}-Acetat (etwa 25facher Überschuss) in MeOH unter N₂ und Erwärmen auf 40°C. Nach vollständiger Umsetzung (Kontrolle durch DSC) wurde nach Zusatz von Methylenchlorid das überschüssige Cu-Acetat durch Ausschütteln mit Wasser entfernt, das Lösungsmittel abdestilliert und der Cu-Komplex aus Äther umkristallisiert. Ausbeute quantitativ.

Cu-2-desvinyl-2-(2-carbäthoxy-cyclopropyl)-phäophorbid-c₁-methylester (VI). Die Darstellung erfolgte nach der in ¹⁷ angegebenen Vorschrift, die Reinigung durch Chromatographie an Kieselgel (Aceton/CHCl₃ 1:11·5) und Kristallisation aus Äther.

Cu-2-desvinyl-2-(2-carbäthoxy-cyclopropyl)-phäoophorphyrin a₃-methylester (XI). Die Darstellung erfolgte wie für VI angegeben.

Oxidativer Abbau von Phäophorbid-c-methylester. Eine Lösung von 0·1 mg Phäophorbid-c-methylester in 0·3 ml Aceton wurde mit 0·2 ml Oxidationslösung (1 g KHSO₄ + 1 g Na₂Cr₂O₇ in 100 ml Wasser) versetzt und 3 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Reaktionsprodukte wurden mit 0·2 ml Äther extrahiert und auf eine Dünnschichtplatte (Kieselgel) aufgetragen (Laufmittel: Petroläther/Essigsäure-äthylester/Isopropanol 44:5:1 oder 50:20:1). Nach der Chromatographie liessen sich die Imide dadurch anfärben, dass man die Platte 5 Min. in eine Chloratmosphäre stellte, das überschüssige Chlor im Luftstrom entfernte und das Chromatogramm mit einer Benzidinlösung (300 mg Benzidin + 5 mg KJ in 100 ml MeOH) besprühte (dunkelblaue Flecke auf farblosem Untergrund). Die Identifizierung von Methyl-Äthylmaleinimid (VIII) und Methyl-vinylmaleinimid (IX) erfolgte durch Vergleich der R_f-Werte mit authentischem Material.

LITERATUR

- ¹ G. G. Stokes, *Proc. Roy. Soc.* **13**, 144 (1864); H. C. Sorby, *Ibid.* **21**, 442 (1873)
- ² R. Willstätter und H. J. Page, *Ann. Chem.* **404**, 237 (1914)
- ³ H. H. Strain und W. M. Manning, *J. Biol. Chem.* **144**, 625 (1942); H. H. Strain, W. M. Manning und G. Hardin, *Ibid.* **148**, 655 (1943)
- ⁴ R. C. Dougherty, H. H. Strain, W. A. Svec, R. A. Uphaus und J. J. Katz, *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 2826 (1970)
- ⁵ J. C. Goedheer, *Photosynthetica* **4**, 97 (1970)
- ⁶ Für eine Zusammenstellung älterer Lit. siehe³, vergl. auch⁴
- ⁷ F. P. Zscheile Jr., *Bot. Gaz.* **103**, 401 (1941)
- ⁸ S. S. Mel'nikov und V. B. Yevstigneyev, *Biofizika* **9**, 414 (1964)
- ⁹ A. H. Corwin, A. B. Chivvis, R. W. Poor, D. G. Whitten und E. W. Baker, *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 6577 (1968)
- ¹⁰ S. W. Jeffrey, *Biochim. Biophys. Acta* **177**, 456 (1969)
- ¹¹ S. W. Jeffrey und K. Shibata, *Biol. Bull.* **136**, 54 (1969)
- ¹² K. Taraz, Dissertation TU Braunschweig, 1970
- ¹³ S. Granick, *J. Biol. Chem.* **179**, 505 (1949)
- ¹⁴ S. W. Jeffrey, *Biochem. J.* **86**, 313 (1963)
- ¹⁵ R. C. Dougherty, H. H. Strain, W. A. Svec, R. A. Uphaus und J. J. Katz, *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 5037 (1966)

- ¹⁶ H. Budzikiewicz und S. E. Drewes, *Liebigs Ann. Chem.* **716**, 222 (1968)
- ¹⁷ H. Budzikiewicz und K. Taraz, *Liebigs Ann. Chem.* **737**, 128 (1970)
- ¹⁸ W. Rüdiger, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **350**, 1291 (1969)
- ¹⁹ G. Jeckel, Dissertation TU Braunschweig, 1967
- ²⁰ A. H. Jackson, G. W. Kenner, K. M. Smith, R. T. Aplin, H. Budzikiewicz und C. Djerassi, *Tetrahedron* **21**, 2913 (1965)
- ²¹ G. F. von der Haar, Dissertation TH Braunschweig, 1966
- ²² H. Budzikiewicz, *Adv. in Mass Spectrometry* **4**, 313 (1968)