

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Heidelberg.)

## ZUR KENNTNIS DES PROTOCHLOROPHYLLS.

Von

A. SEYBOLD.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. März 1937.)

Unsere Untersuchungen über den Zusammenhang der Blattpigmentausbildung in Abhängigkeit vom Lichtfeld (SEYBOLD und EGLE 1937; EGLE 1937) dehnten wir auch auf die in den Fruchtblättern heranreifenden Samenanlagen aus. Dabei unterwarfen wir u. a. das aus dem Samenhäutchen von Kürbisarten extrahierte Protochlorophyll der chromatographischen Adsorptionsanalyse. Über diesen Befund sei hier kurz berichtet.

NOACK und Mitarbeiter (1929, 1930, 1931) haben eine Reihe von chemischen und physiologischen Zusammenhängen zwischen dem Chlorophyll und seinen Vorstufen, vor allem dem Protochlorophyll, aufgefunden und die Vorstellung entwickelt, daß die letzte Stufe der Chlorophyllbildung in der Pflanze einen Oxydationsvorgang am Protochlorophyll darstellt. „Jedoch geht dieser Vorgang in zwei Richtungen gemäß der Bildung von Chlorophyll a und b, da nichts dafür spricht, daß schon das Protochlorophyll in zwei entsprechenden Modifikationen ausgebildet wird“ (NOACK und KISSLING 1929, S. 42). „Weder spektroskopisch noch auf anderem Wege konnte ein Anhaltspunkt dafür gewonnen werden, daß sich der Farbstoff (Protochlorophyll, der Verfasser) nach Art des Chlorophylls aus zwei Komponenten, entsprechend Chlorophyll a und b, zusammensetzt“ (NOACK und KISSLING 1929, S. 16). Die Einheitlichkeit des Protochlorophylls, dessen relative Extinktionskoeffizienten von RUDOLPH (1934) mitgeteilt wurden, konnte als gesichert gelten; nur LUBIMENKO und GORTIKOWA (1934) sprachen die Vermutung aus, daß zwei optisch verschiedene Formen von Protochlorophyll vorhanden sind, da sie bei einer fraktionierten Extraktion der Kürbissamenhäute zwei Fraktionen erhielten, deren Absorptionsspektren nicht ganz identisch waren (s. Abb. 2, S. 716, untere Spektren  $LG\alpha$  und  $\beta$ ). Die genannten Forscher sind wohl ihrer Sache nicht ganz sicher gewesen, weshalb sie eine besondere Untersuchung dieser Frage für notwendig erachteten. Was LUBIMENKO und GORTIKOWA irrtümlich für zwei spektroskopisch verschiedene Protochlorophyllkomponenten hielten, wird uns nachher beschäftigen (s. S. 717).

Die chromatographische Methode von TSWETT, die wir in unserem Institut für besondere Zwecke ausbauten (SPOHN 1935), ermöglicht eine

Trennung des aus „alten“, ausgereiften Kürbissamen gewonnenen „Rohprotochlorophylls“ in 4 Komponenten. Eine Kürbisart, die schalenlose Samen lieferte, diente als geeignetes Ausgangsmaterial. Mittels eines Messers ließen sich die grünen, inneren Samenhäutchen abschaben. Ihre Extraktion erfolgte in einem Gemisch Benzin-Methanol. Durch Zusatz von Wasser ist das gesamte Rohprotochlorophyll in Benzin übergeführt worden. Die Adsorption der benzinischen Lösung, welche im Stickstoffstrom stark eingengt wurde, erfolgte in Röhren mit Puderzucker.

Wie bei der Adsorption von Rohchlorophyll aus Laubblättern haftet am oberen Ende der Zuckersäule das Protochlorophyll, während ein gelbes Pigment an Zucker nicht adsorbiert wird. Durch Nachwaschen mit Benzin läßt sich diese Komponente, die sicher ein Karotinoid darstellt, quantitativ entfernen. Ehe mit Benzol bzw. Benzol-Benzin gemischen an die Entwicklung des Chromatogramms herangegangen wurde, erfolgte ein gründliches Auswaschen der Zuckersäule mit Petroläther, um die das Chromatogramm störenden Fette nach Möglichkeit zu beseitigen. Nachdem die Waschung etwa 10mal erfolgt war, begann die Entwicklung des Chromatogramms mit Benzol bzw. Benzol-Benzin gemischen. Eine deutliche Zonierung des gefärbten Zuckers mit gelbgrüner (oben) und blaugrüner Tönung (weiter unterhalb), wie sie regelmäßig bei der Adsorption des Rohchlorophylls eintritt, ist nach einiger Zeit deutlich zu erkennen, besonders nachdem durch die Benzolzugaben die Wanderung einer weiteren gelben Farbstoffkomponente, die bislang noch in dem Rohprotochlorophyll stak, beschleunigt wurde. Das gleiche Verhalten zeigt im Chromatogramm das Xanthophyll der Rohchlorophylllösungen. Durch wiederholtes Waschen mit Benzin-Benzol läßt sich aus dem Chromatogramm das „Xanthophyll“ des Protochlorophylls entfernen, das sich bei der Saugung in der Saugflasche nach einiger Zeit quantitativ ansammelt. In der Röhre haben sich mittlerweile die beiden grünen Komponenten des Rohprotochlorophylls voneinander getrennt. Die gesonderte Eluierung (Methanol-Äther) der mit dem Spatel abgetrennten Zuckersäule liefert zwei grüne Farbstoffe, die in Äther (Methanol mit Wasser ausgewaschen) eine ebenso verschiedene Farbe haben wie die Chlorophylle a und b. Die in der oberen Hälfte der Zuckersäule adsorbierte Komponente ist subjektiv geurteilt gelbgrün, die in der unteren blaugrün.

Das Chromatogramm gibt uns einiges Recht, das gelbgrüne Pigment als Protochlorophyll b, das blaugrüne als Protochlorophyll a zu bezeichnen. Wenn die Auffassung von NOACK und Mitarbeitern zu Recht besteht, daß das Protochlorophyll eine Vorstufe des Chlorophylls ist, so können wir die Kenntnisse dieses Zusammenhanges durch den Nachweis von zwei Modifikationen des Protochlorophylls erweitern.

Die spektroskopische Prüfung der ätherischen Lösungen von Protochlorophyll a und b zeigt nun, daß der subjektiven Farbempfindung der

beiden Protochlorophyllmodifikationen charakteristische Absorptionsverhältnisse zugrunde liegen. In Abb. 1 sind die Absorptionsspektren unserer Protochlorophylle a und b bei verschiedener Konzentration eingezeichnet. Da mir bis jetzt die Kristallisation der Protochlorophylle nicht gelang, können zu den Absorptionsspektren keine quantitativen Unterlagen gegeben werden. Die Lage, Breite und Intensität der Bänder

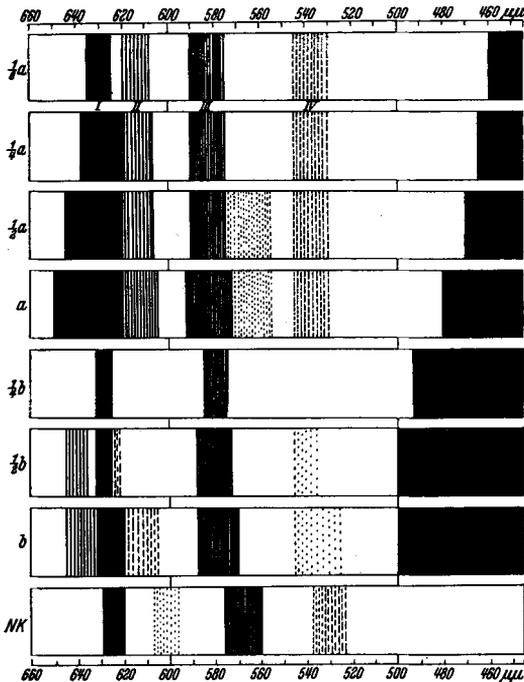


Abb. 1. Absorptionsspektren von Protochlorophyll a und b verschiedener Konzentrationen in Äthyläther. NK Spektrum von Protochlorophyll nach NOACK und KISSLING (1929).

ist aus der Abb. 1 und Tabelle 1 ersichtlich. Bei der Beurteilung der Bänderintensität ist die Endabsorption unberücksichtigt geblieben.

Die beiden Protochlorophyllkomponenten unterscheiden sich somit in der Lage und Intensität der Bänder deutlich. Vergleichen wir die Absorptionsspektren der Protochlorophylle mit denen der Chlorophyllkomponenten a und b (z. B. WILLSTÄTTER und STOLL 1913, 1918), so ist folgendes festzustellen:

1. Genau so wie das Chlorophyll b das II. Band am stärksten ausbildet (im Gegensatz zu Chlorophyll a, bei dem das I. Band das stärkste ist!), so ist auch bei Protochlorophyll b das II. Band am stärksten, während das I. Band wesentlich

schwächer ist. 2. Die Endabsorption setzt bei Chlorophyll b bei längeren Wellen als bei Chlorophyll a ein. Genau so verhalten sich die beiden Protochlorophylle. Daher ist der subjektive Eindruck (s. o.) bei Protochlorophyll a blautichig, bei b gelbstichig.

Die Fluoreszenz von Protochlorophyll a ist deutlich stärker als die von b. Das Fluoreszenzspektrum liegt für beide Protochlorophyllkomponenten bei 655—620  $\mu\mu$ , was mit den Angaben von NOACK und KISSLING (1929) übereinstimmt.

In dem Absorptionsspektrum von Chlorophyll b liegen bekanntlich die hauptsächlichen Bänder zwischen denen von Chlorophyll a, so daß in einem Gemisch beider Komponenten unter Umständen die Zugehörig-

Tabelle 1.

		Absorptionsbänder (Wellenlänge in $\mu\mu$ )					Endabsorption	Intensität der Bänder
		I	II	III	IV	V		
$\frac{1}{8}$	a	635—625	620—608	590—575	—	545—530	460	I > III > II > V > IV
$\frac{1}{4}$	a	638—620	620—607	590—575	—	545—530	465	
$\frac{1}{2}$	a	645—620	620—607	590—575	575—555	545—530	471	
	a	650—620	620—605	592—572	572—555	545—530	480	
$\frac{1}{4}$	b	—	632—625	—	585—575	—	494	
$\frac{1}{2}$	b	645—635	632—625	625—621	578—573	545—535	500	II > IV > I > III > V
	b	645—632	632—625	620—605	587—570	545—525	500	

keit der Bänder zu dem einen oder anderen Chlorophyll leicht „entziffert“ werden kann. Bei den beiden Protochlorophyllen unterscheidet sich die Lage der Bänder dagegen wenig, so daß in einem Gemisch beider Farbstoffe Protochlorophyll-a- bzw. -b-Bänder schwer nebeneinander zu erkennen sind. Aus diesem Grunde konnten andere Forscher aus spektroskopischen Prüfungen im Protochlorophyll die beiden Modifikationen nicht erkennen.

Vergleichen wir nunmehr das von NOACK und KISSLING (1929) angegebene Absorptionsspektrum einer ätherischen Protochlorophylllösung, das wir in unsere Abb. 1 mit eingezeichnet haben (Abb. 1, NK), mit den Spektren von Protochlorophyll a und b, so ist in der Lage, Breite und Intensität der Bänder im großen und ganzen eine Übereinstimmung. Die geringen Abweichungen in der Lage der Bänder dürften zum größten Teil auf Konzentrationsunterschiede und die Mischung beider Komponenten zurückzuführen sein. Nur in einem Band besteht zwischen den Angaben von NOACK und KISSLING und unseren Messungen keine Übereinstimmung: In ätherischer Lösung konnten NOACK und KISSLING ein schwaches Band von 607—596  $\mu\mu$  feststellen, das in Chloroform-Pyridin allerdings nur als Schatten angedeutet ist. LUBIMENKO und GORTIKOWA (1934) beobachteten das Band bei 610—580  $\mu\mu$  (s. Abb. 2, LG,  $\alpha$  und  $\beta$ ). Nur in den Spektren der gelben Pigmente unserer Analysen tritt ein Band im Bereich 615—580  $\mu\mu$  in Erscheinung. Das Band 607 bis 596  $\mu\mu$  bzw. 610—580  $\mu\mu$  gehört demnach nicht zu den Protochlorophyllen, mindestens nicht zu den durch die chromatographische Analyse isolierten grünen Farbstoffen.

Ehe wir die von LUBIMENKO und GORTIKOWA angegebenen Absorptionsspektren von Protochlorophyll a und b (dort Protochlorophyllin  $\alpha$  und  $\beta$  genannt) mit unseren Befunden vergleichend betrachten, seien die Spektren der gelben Pigmente unserer Analyse kurz dargestellt.

Oben erwähnten wir, daß ein gelbes Pigment an dem Rohrzucker nicht adsorbierte, sich also so verhielt wie Karotin bei der Analyse von Rohchlorophyll aus Blättern. In schwacher Konzentration war das Pigment in Benzol hellgelb, in sehr starker Konzentration rot. Die

Absorptionsspektren von verschiedenen Konzentrationen dieses Karotins, das wir „Protokarotin“ nennen wollen, sind in Abb. 2 dargestellt, desgleichen die des anderen gelben Pigments, das an Zucker gut adsorbierte. Wir wollen zunächst von „Protoxanthophyll“ sprechen. In schwacher benzolischer Lösung ist es ebenfalls gelb, in starker hingegen orangerot.

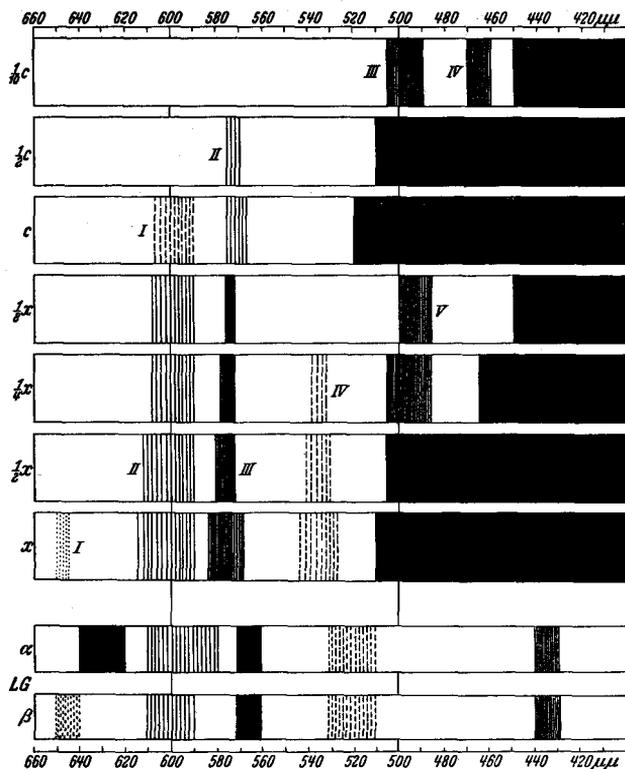


Abb. 2. Absorptionsspektren der gelben Pigmente verschiedener Konzentrationen in Benzol. Die Bänder I und II des Karotins (*c*) und die Bänder I, II und III (IV?) des Xanthophylls (*x*) rühren von Protochlorophyll- oder Chlorophyllderivaten her. Die Spektren der beiden von LUBIMENKO und GORTRIKOWA isolierten Protochlorophyllkomponenten (in Äther) sind miteingezeichnet (LG  $\alpha$  und  $\beta$ ).

Die Absorptionsspektren der beiden gelben Farbstoffe sind im langwelligeren und mittleren Spektralbereich wenig voneinander verschieden, nur hat das Protoxanthophyll selbst in schwacher Konzentration viel kräftigere Bänder als Protokarotin in starker Konzentration. Außerdem besitzt das Protoxanthophyll ein, wenn auch schwaches Band bei 650 bis 645  $\mu\mu$ . Im Wellenbereich 500—400  $\mu\mu$  sind zwischen den beiden gelben Pigmenten deutliche Unterschiede vorhanden, wie sie auch bei Karotin und Xanthophyll aus Blättern stets deutlich auftreten. Da die Karotinoide im Rot und Orange keine Absorptionsbänder haben, so liegt der

Gedanke nahe, die Bänder unseres „Protokarotins“ und „Protoxanthophylls“ als Beimengungen von Protochlorophyll oder eines seiner Abbauprodukte anzusehen. Durch eine weitere chromatographische Adsorptionsanalyse vermochte ich weder das Protokarotin noch das Protoxanthophyll in weitere Komponenten zu zerlegen. Eine Fluoreszenz konnte bei beiden gelben Pigmenten weder in schwacher noch in starker Konzentration nachgewiesen werden, so daß zunächst für die Uneinheitlichkeit unseres Protokarotins bzw. Protoxanthophylls keine Anhaltspunkte gegeben sind. LUBIMENKO und GORTIKOWA erörterten bereits die Frage der „Xanthophylloide“, die Vorstufen von Karotin bzw. Xanthophyll sein sollen. Vielleicht liegen hier die hypothetisch angenommenen Stoffe vor. Diese Frage bedarf einer weiteren Untersuchung, vor allem auch von seiten des Chemikers.

Tabelle 2.

	Absorptionsbänder (Wellenlänge in $\mu\mu$ )					Endabsorption	Intensität der Bänder
	I	II	III	IV	V		
Proto- karotin	$\left\{ \begin{array}{l} 1/10 \\ 1/2 \\ 1 \end{array} \right.$	—	—	505—490	470—460	450	IV = III > II < I
		—	575—570	—	—	510	
		607—590	575—567	—	—	520	
Proto- xantho- phyll	$\left\{ \begin{array}{l} 1/8 \\ 1/4 \\ 1/2 \\ 1 \end{array} \right.$	—	608—590	576—572	—	500—486	III = V > II > IV > I
		—	608—590	578—572	538—532	505—486	
		—	612—590	580—572	540—430	505	
		650—645	615—590	583—568	543—527	510	

Die Absorptionsbänder, die wir bei Protokarotin und Protoxanthophyll fanden, haben LUBIMENKO und GORTIKOWA für die Absorptionsspektren der Protochlorophylle angegeben, wovon die Abb. 2 ( $LG \alpha$  und  $\beta$ ) überzeugen kann. Dabei ist zu beachten, daß in Benzol die Bänder um etwa 5—10  $\mu\mu$  in den langwelligen Spektralbereich gegenüber ätherischen Lösungen verschoben sind. Vermutlich ging bei dem Entmischungsverfahren bei den Versuchen von LUBIMENKO und GORTIKOWA eine relativ verschiedene Menge an gelben Pigmenten in die beiden Fraktionen. Was diese selbst darstellen, läßt sich an Hand der Absorptionsspektren schwer sagen. Ich vermute, daß das vermeintliche Protochlorophyll b (Protochlorophyllin  $\beta$ ) vornehmlich nur aus gelben Pigmenten bestand (das charakteristische Protochlorophyllband um 630  $\mu\mu$  fehlt; das Band 650—640  $\mu\mu$  tritt ebenfalls bei unserem Protoxanthophyll auf), das Protochlorophyll a in Wirklichkeit jedoch ein Gemisch beider Protochlorophylle unter Beimengung von gelben Pigmenten war (vgl. die Bänderlage und die Reihenfolge der Bandintensität von LUBIMENKO und GORTIKOWA mit unseren Befunden). Demnach konnten LUBIMENKO und GORTIKOWA den Unterschied zwischen den beiden Komponenten des Protochlorophylls nicht so deutlich sehen, wie er in Wirklichkeit ist. LUBIMENKO und GORTIKOWA isolierten durch die Fraktion demnach

nicht die beiden Komponenten des Protochlorophylls, sondern trennten nur die gelben von den grünen Pigmenten.

Wenn durch die chromatographische Adsorptionsanalyse sich das Protochlorophyll analog dem Chlorophyll in zwei Komponenten zerlegen ließ und ihre charakteristischen Absorptionsspektren aufgezeigt werden konnten, so ist damit erst der Anfang für weitere Untersuchungen gemacht. Für die Vorstellungen der Chlorophyllbildung ergibt dieser Befund grundsätzlich neue Gesichtspunkte: Die Vorstufen der beiden Chlorophyllkomponenten sind nicht identisch; worin sie sich chemisch und physiologisch unterscheiden, müssen weitere Untersuchungen aufklären. Die Frage, ob in den gelben Pigmenten unserer chromatographischen Analyse Vorstufen, Abbauprodukte oder Pigmentmischungen vorliegen, vermochte ich nicht entscheidend zu beantworten; der Chemiker wird sich auch dieses Problems annehmen müssen.

*Anmerkung bei der Korrektur.* Inzwischen ist es mir doch noch gelungen, die gelben Pigmente chromatographisch weiter zu zerlegen, wobei sich die oben ausgesprochene Vermutung bestätigte, daß die Bänder im roten und grünen Spektralbereich nicht den Karotinoiden, sondern einer anderen Farbkomponente angehören. Diese dürfte ein Derivat des Protochlorophylls oder Chlorophylls sein. In Äther weist der Farbstoff, der in schwacher Konzentration schmutzig grün, in starker lachsrötlich ist und eine blutrote Fluoreszenz hat, die folgende Bänderlage und -intensität auf:

I	II	III	IV	Endabs.	Intensität der Bänder
645—640	608—583	574—562	535—522	485 $\mu\mu$	III > II > IV > I

Bei sehr starker Konzentration sind noch schwache Schatten bei 670—665 und 655—650  $\mu\mu$  sichtbar. Darüber kann nun kein Zweifel mehr bestehen, daß in den Absorptionsspektren von NOACK und Mitarbeitern und LUBIMENKO und GORTIKOWA sich die 3. grüne Komponente mehr oder weniger deutlich durch die eben angegebenen Bänder verriet. In dem Chromatogramm adsorbiert die 3. Komponente mit einem graugrünen Saum und zeigt somit eine Ähnlichkeit in der Adsorption mit den Chlorophyllabbauprodukten, die bisweilen bei Analysen mit Laubblättern auftreten. Welche Beziehung zwischen diesem Pigment und den beiden Protochlorophyllen besteht, läßt sich nur durch Analysen von Kürbissamenhäutchen während der Entwicklung aufdecken. Über die Ergebnisse soll im Herbst berichtet werden.

#### Literaturverzeichnis.

- Egle, K.: Zur Kenntnis des Lichtfeldes der Pflanze und der Blattfarbstoffe. *Planta* (Berl.) **26**, 546 (1937). — Lubimenko, W. N. u. N. N. Gortikowa: Über die Rolle des Sauerstoffs im Ergrünungsprozeß. *Beitr. Biol. Pflanz.* **22**, 235 (1934). — Noack, K. u. W. Kissling: Zur Entstehung des Chlorophylls und seiner Beziehung zum Blutfarbstoff. *Hoppe-Seylers Z.* **182**, 13 (1929). — Zur Entstehung des Chlorophylls und seiner Beziehung zum Blutfarbstoff. II. *Mitt. Hoppe-Seylers Z.* **193**, 97 (1930). — Zur Kenntnis der Chlorophyllbildung. *Z. angew. Chem.* **44**, 93 (1931). — Rudolph, H.: Über die Einwirkung des farbigen Lichtes auf die Entstehung der Chloroplastenfarbstoffe. *Planta* **21**, 104 (1934). — Scharfnagel, W.: Biologische Untersuchungen zur Chlorophyllbildung. *Planta* **13**, 716 (1931). — Seybold, A. u. K. Egle: Lichtfeld und Blattfarbstoffe. *Planta* **26**, 491 (1937). — Spohn, H.: Eine einfache Methode zur Trennung der Blattfarbstoffe. *Planta* **23**, 657 (1935). — Willstätter, R. u. A. Stoll: Untersuchungen über Chlorophyll. Berlin 1913. — Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin 1918.