

Spektrometrische Untersuchungen über den Zustand des Chlorophylls in der Pflanze, in Extrakten und Reinpräparaten

Autor(en): **Meyer, Klaus Peter**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Helvetica Physica Acta**

Band (Jahr): **12 (1939)**

Heft V

PDF erstellt am: **26.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-110944>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Spektrometrische Untersuchungen über den Zustand des Chlorophylls in der Pflanze, in Extrakten und Reinpräparaten

von Klaus Peter Meyer.

(13. VI. 39.)

I. Einleitung.

Die in der Literatur immer wieder aufgeworfene Frage, wie weit das aus Pflanzen extrahierte, gereinigte, nunmehr chemisch genau bekannte Chlorophyll¹⁾ (im folgenden mit Ch. bezeichnet) mit dem Ch. in der Pflanze identisch ist, soll in vorliegender Arbeit anhand quantitativer Absorptionsmessungen untersucht werden. Die Aussagen der Chemiker über den Molekülbau des Ch. beziehen sich auf die extrahierte Substanz, die ihren Untersuchungen zu Grunde gelegen hat. Ob aber diese während der vorangehenden Extraktion aus der Pflanze vollständig unverändert geblieben ist, lässt sich auf chemischem Wege allein nicht mit Sicherheit entscheiden. Deswegen wurde auch seit jeher das charakteristische Absorptionsspektrum des Ch. zur Entscheidung dieser Frage herangezogen. Leider begnügte man sich meistens mit der qualitativen Angabe, bei welchen Wellenlängen Absorptionsstreifen auftreten. Erst nachdem man dazu übergegangen ist, stets die ganze Absorptionskurve, d. h. den Extinktionskoeffizienten als Funktion der Wellenlänge zu messen und anzugeben, konnte das Spektrum auch als Indikator für die chemische Feinstruktur des Ch. verwendet werden.

Vergleicht man nun die Absorptionskurven, wie sie für Ch. A und Ch. B in der Literatur zu finden sind, so gibt es keine zwei Autoren, deren Kurven untereinander auch nur annähernd innerhalb der optischen Messgenauigkeit übereinstimmen.

Daraus muss geschlossen werden, dass die Ch.-Präparate weder einheitlich noch definiert sind. Es ist nun recht naheliegend anzunehmen, dass diese Unterschiede, abgesehen von der Reinheit der Präparate, davon herrühren, dass das Ch. bei den gewohnten Extraktionsverfahren bereits chemisch verändert wird.

Um diese Fragen abzuklären, wurden nun Versuche in folgenden Richtungen angestellt:

¹⁾ WILLSTÄTTER, STOLL, FISCHER, CONANT u. A.

1. Durch besonders *schonende* Extraktion wurden Ch.-Lösungen hergestellt, von denen man annehmen konnte, darin besonders unversehrtes Ch. zu finden.

2. Durch *quantitative* Messung der Ch.-Absorption in unverletzten Pflanzenblättern wurde das Spektrum des Ch. in natürlichem Zustand festgestellt, von dem man, abgesehen von den qualitativen Angaben über die Lage der Absorptionsstreifen, kaum¹⁾ etwas wusste.

Es gelang nun auch wirklich, durch schonende Extraktion Ch.-Lösungen zu gewinnen, in deren Spektren eine sonst stets vorhandene Absorptionsbande fehlte. Dieses Ch., das wir fortan als natives Ch. bezeichnen wollen, setzt sich mit der Zeit um. Dabei verändert sich unter gewissen Bedingungen seine Absorptionskurve derart, dass sie nach einiger Zeit quantitativ mit der Absorptionskurve von Ch.-Reinpräparaten übereinstimmt. Diese Reinpräparate wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. STOLL, Basel, zur Verfügung gestellt. Das Ch., wie es in den Reinpräparaten vorliegt, muss also ein Derivat des nativen Ch. sein.

Im weiteren wurde nun noch untersucht, ob dieses native Ch. mit dem Ch. in der Pflanze chemisch identisch ist. Da das Absorptionsspektrum des Ch. auch von seinem physikalischen Verteilungszustand abhängig ist, stellt sich die Frage folgendermassen:

Lässt sich für das native Ch. ein physikalischer Verteilungszustand angeben, in dem es dasselbe Spektrum zeigt, wie das Ch. im Blatt? Auch diese Frage konnte positiv beantwortet werden. Nachdem nun ein solcher Verteilungszustand gefunden war, konnten hieraus wieder interessante Rückschlüsse auf den Verteilungszustand des Ch. im Blatt gezogen werden.

Dass es noch nie gelungen ist, die Assimilation der Kohlensäure durch die grünen Pflanzen *in vitro* nachzuahmen, könnte möglicherweise auch durch die Veränderung des Ch. bei den bisherigen Extraktionsverfahren bedingt sein.

II. Experimentelles über die Absorptionsmessung, Genauigkeit und Darstellung der Resultate.

Die Messung des Extinktionskoeffizienten erfolgte nach dem Verfahren der photographischen Lösungsspektrophotometrie mit zentriertem rotierendem Sektor²⁾. Hierbei wird das Absorptionsspektrum von Lösung und Lösungsmittel unter identischen Be-

¹⁾ Siehe Kap. VI, letzter Absatz.

²⁾ G. M. POOL, Ztschr. f. Physik **29**, 311, 1924; H. v. HALBAN, G. KORTÜM und B. SZIGETI, Z. El. Chemie **42**, 628, 1936.

dingungen photographiert. Einzig die Lichtintensität für das Lösungsmittel wird auf einen bekannten Bruchteil $1/m$ herabgesetzt. Für gewisse Wellenlängen werden dann beide Spektren gleiche Schwärzung zeigen, hier ist also durch die Absorption des gelösten Stoffes die Lichtintensität auf den m -ten Teil herabgesetzt worden. Somit lässt sich für diese Wellenlänge der Extinktionskoeffizient nach dem Lambert-Beer'schen Gesetze berechnen, falls Schichtdicke, Konzentration (abgekürzt Konz.) und m bekannt sind. Variiert man eine dieser drei Grössen, so erhält man an anderen Stellen gleiche Schwärzungen, und damit den Extinktionskoeffizienten für weitere Wellenlängen.

Die wesentliche Verbesserung gegenüber der Methode von HENRI¹⁾ liegt darin, dass Lösung und Lösungsmittel gleich lang belichtet werden, die Intensität des Lichtes aber für das Lösungs-

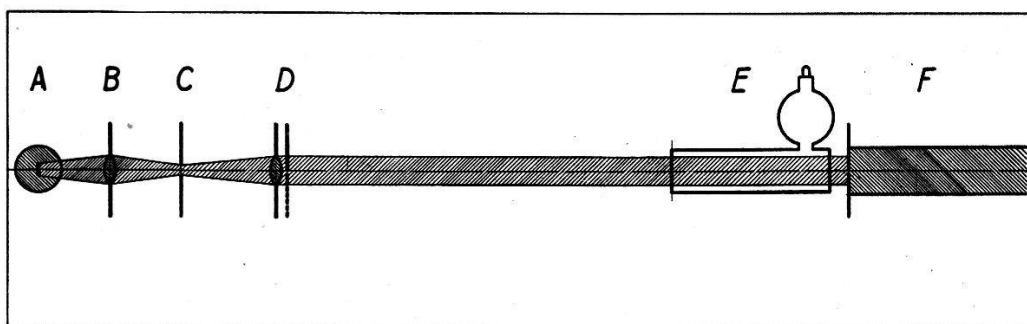


Fig. 1.

Strahlengang. A Bandlampe, B 1. Linse, C Blende, D 2. Linse und Sektor, E Absorptionsrohr nach BALY, F Spaltrohr des Spektrographen.

mittel mit Hilfe eines Sektors auf einen bekannten Bruchteil herabgesetzt wird. Es werden somit beim Ausmessen der photographischen Aufnahmen Stellen gleicher Schwärzung aufgesucht, die von der gleichen Intensität in der gleichen Zeit hervorgerufen wurden. Man wird auf diese Weise von den Schwärzungsgesetzen unabhängig. Da bei diesem Verfahren der Sektor in der Ebene der abbildenden Linse rotiert, wird auch nicht intermittierend belichtet. Der unwesentlich gegenüber v. HALBAN und Mitarbeitern abgeänderte Strahlengang ist in Fig. 1 dargestellt. Die Lichtquelle (eine Niedervolt-Bandlampe) wird auf eine 2 mm weite, kreisförmige Blende abgebildet. Eine zweite Linse bildet die Blende auf den Spektrometer-Spalt ab. Unmittelbar hinter dieser zweiten Linse befindet sich der zur messbaren Lichtschwächung dienende Sektor. Die Absorptionsrohre nach BALY mit Lösung, resp. Lösungsmittel, werden nacheinander in das sehr schwach konvergente Strahlenbündel direkt vor dem Spalte eingeschaltet.

¹⁾ V. HENRI, Etudes de Photochimie, Paris 1919, Gauthier-Villars & Cie.

Der Konvergenzwinkel beträgt $54'$. Auch bei langsamem Drehen des Sektors bleibt das Blendenbild auf dem Spalt frei von jedem wandernden Schatten. Von dem 13 mm grossen Blendenbild werden nur 4 mm verwendet, die auf die beiden, je 2 mm hohen, direkt übereinander liegenden Spaltblenden fallen. Es wurde ein Gitterspektrograph von Zeiss mit einer Dispersion von ca. 40 Å.E. pro mm verwendet. Die Spaltbreite von 0,06 mm entspricht im Spektrum einem Bereich von 2,4 Å.E. (Für die Blattspektren im Kap. VI waren die resp. Werte 0,3 mm und 12 Å.E.) Zur Messung der Dispersion und zur Festlegung der Wellenlängen auf den Aufnahmen wurde der Eisenbogen verwendet.

Die Bandlampe wurde mit einem Akkumulator betrieben und die Konstanz der angelegten Spannung mit einem Voltmeter kontrolliert. Die Belichtungszeit betrug für Lösungen in der Regel zwei, im Minimum eine Minute. Für die Blattaufnahmen (näheres siehe Kap. VI) lagen die Belichtungszeiten zwischen 2 Minuten und 300 Minuten. Die Bestimmung der Stellen gleicher Schwärzung erfolgte objektiv mit Photozellen (näheres hierüber siehe v. HALBAN und Mitarbeiter, loc. cit.). Das fehlerfreie Arbeiten der ganzen Anordnung wurde wie folgt kontrolliert:

a) Vergleich der Lichtwege für Lösung und Lösungsmittel.

Mit ein und demselben Balyrohr, das beliebig gefüllt und dessen Länge beliebig eingestellt war, wurde nacheinander durch die beiden Spaltblenden gleich lang belichtet. Dieses Spektrenpaar zeigt, wie es zu verlangen ist, für alle Wellenlängen innerhalb der Messgenauigkeit gleiche Schwärzung.

b) Kontrolle der Homogenität in vertikaler Richtung innerhalb eines einzelnen Spektrums.

Durch dieselbe Spaltblende wird durch Verschieben der Kassette das gleiche Spektrum zweimal aufgenommen. Im Photometer kann nun der untere Teil der ersten Aufnahme mit dem oberen der zweiten verglichen werden. Auch diese Fehler sind im Vergleich mit den sonst auftretenden belanglos.

c) Kontrolle der Balyrohre.

Vertauschung der Balyrohre in bezug auf Lösung und Lösungsmittel hat keinen Einfluss auf die Lage der Messpunkte. Der Fehler in der Schichtdicke wurde stets unter 1% gehalten. Die Balyrohre gestatten die Einstellung der Schichtdicke mit einem Fehler, der unter 0,1 mm bleibt.

d) Kontrolle der Sektoren.

Die Lichtschwächung durch die verschiedenen Sektoren wurde geprüft mittels Aufnahme des Spektrums von Methylorange unter Verwendung aller vorhandenen Sektoren. Da alle Messpunkte innerhalb der Messgenauigkeit (siehe unten) auf der gleichen Kurve liegen, sind die Sektoren relativ zueinander richtig. Wenn nun noch irgend ein Sektor in bezug auf den Absolutwert der von ihm verursachten Lichtschwächung richtig ist, sind alle Sektoren richtig. Das ist der Fall, da die grossen Sektoren mechanisch mit genügender Genauigkeit hergestellt werden konnten.

e) Vergleich der Resultate mit den Messungen anderer Autoren.

Um beim Vergleichen von allen Abweichungen abstrahieren zu können, die durch Fehler in der Konzentration der Lösungen (z. B. Kristallwasser) entstehen würden, tragen wir nicht den Extinktionskoeffizienten ϵ , sondern $\log \epsilon$ als Funktion der Wellenlänge auf. Bekanntlich wird in dieser Darstellung die Kurve ihrer Form nach durch die eben genannten Fehler nicht beeinflusst, sondern bloss parallel zur Ordinatenaxe ($\log \epsilon$) verschoben. Die Messungen mit Methylorange ergaben für die Kurvenform innerhalb der Messgenauigkeit Übereinstimmung mit A. THIEL¹⁾ und K. WIELAND (unveröffentlicht).

Die Messungen von THIEL sind mit dem König-Martens'schen Spektralphotometer ausgeführt worden, für diejenigen von WIELAND wurde eine Anordnung nach v. HALBAN (l. c.) mit einem Prismenspektrographen verwendet.

Um Vergleiche in bezug auf die Absolut-Werte der Ordinaten durchzuführen, wurde an Stelle von Methylorange, das sich wegen des schwer vollständig zu entfernenden Kristallwassers hierfür nicht eignet, Kaliumchromat verwendet. Als Anschlusspunkt wurde die gut bekannte Absorption von Kaliumchromat bei $\lambda = 4358$ zu $\epsilon = 312,5$ eingesetzt. Der Vergleich ergibt, dass alle unsere Werte für $\log \epsilon$ um 0,0125 zu klein sind, d. h. alle von uns gemessenen Werte für ϵ sind um 3,0% zu klein. Unsere sämtlichen Kurven müssten also als Ganzes noch um 0,0125 log. Einheiten gehoben werden. Diese kleine Korrektur ist aber an den Kurven nicht angebracht, da die Absolutwerte für vorliegende Arbeit nur von untergeordneter Bedeutung sind. Warum die Anordnung Werte für ϵ liefert, die unabhängig von der Wellenlänge 3% zu klein sind, ist nicht untersucht worden.

¹⁾ A. THIEL, A. DASSLER und F. WÜLFKEN, Fortsch. d. chem. Physik u. phys. Chemie **18**, Nr. 3, 1924.

Genauigkeit des Verfahrens:

Der einzig wesentliche Fehler der Methode liegt bekanntlich in der Unregelmässigkeit der photographischen Schwärzung. Ohne die Genauigkeit der Methode aufs Äusserste auszunützen, streuen die Messpunkte bis maximal 3% in ϵ . Für den weitaus grössten Teil der Punkte bleiben die Abweichungen unter 1%, wie z. B. Fig. 3 zeigt. Auch lag die Reproduzierbarkeit der ganzen Absorptionsspektren, falls das Ch. sich nicht verändert hatte, innerhalb derselben Grenzen. Bei den Blattmessungen (Kap. VI) ist die Genauigkeit wesentlich kleiner.

Um für diejenigen Kurven, welche den Unterschied zweier Spektren, also $\log(\epsilon_m - \epsilon_n)$ darstellen (Fig. 5), etwas über die Streuung der Messpunkte aussagen zu können, werden ihre Abweichungen jeweils in den prozentualen Fehler von ϵ_m umgerechnet, der nötig wäre, um die Abweichungen hervorzurufen (Tab. 2). So kann leicht beurteilt werden, ob die Abweichungen reell sind, oder in den Grenzen der Messgenauigkeit liegen.

Veränderung der Lösungen und Blätter während der Aufnahme:

Das Ch. kann sich während den Aufnahmen, sei es durch die Lichteinwirkungen, sei es durch Altern, verändern. Um sich gegen derartige Fehler zu schützen, wurden am Schlusse der Aufnahmen jeweils die am Anfang gemessenen Punkte wiederholt, oder auch über das ganze Spektrum verteilt einige Kontrollpunkte aufgenommen. Nur dort, wo derartige Umsetzungen aufgetreten sind, werden sie im folgenden erwähnt.

Bei der Messung variierte Grössen:

Der dekadische molare Extinktionskoeffizient¹⁾ ergibt sich zu

$$\epsilon = \frac{\log J_0/J}{c \cdot d}$$

J_0 = auffallende Intensität, J = durchgelassene Intensität,
 d = Schichtdicke in cm, c = Konzentration in Mol pro Liter.

Um ϵ als Funktion der Wellenlänge zu erhalten, kann J_0/J , c , oder d variiert werden. Für alle Lösungsspektren war J_0/J konstant = 4. Die Schichtdicke war die eigentliche Variable, die zuerst meist in Stufen von 10% variiert wurde. Um den genauen Verlauf der Kurve in der Nähe der Maxima, der Minima, und der Stellen rasch veränderlicher Neigung zu erhalten, wurden Fein-

¹⁾ Das Lambert-Beer'sche Gesetz gilt für Ch., siehe z. B. B. HUBERT, Rec. d. trav. bot. néerlandais **32**, 323, 1935.

abstufungen bis zu 2% herunter ausgeführt¹⁾. Die Konz. wurde jeweils dann verringert, wenn die Einstellgenauigkeit der Balyrohre zu klein wurde. Bei der kleineren Konz. ist stets der letzte vorangehende Messpunkt durch entsprechende Erhöhung der Schichtdicke reproduziert worden. Für die Blattmessungen waren Konz. und Schichtdicke von vorneherein fest; dort wurde J_0/J (d. h. der Sektorauschnitt) variiert.

Überlagerung der Absorption der vier im Pflanzenextrakt enthaltenen Farbstoffe:

Nach O. WARBURG und E. NEGELEIN²⁾, sowie nach A. SPRECHER v. BERNEGG, E. HEIERLE und F. ALMASY³⁾ darf man annehmen, dass im Gemisch der 4 Blattfarbstoffe rein additiv die Summe der Einzel-Extinktionen der 4 Farbstoffe vorliegt.

Darstellung der Spektren, Absolutwerte von ϵ :

Für sämtliche Absorptionsspektren ist $\log \epsilon$ als Funktion von λ aufgetragen⁴⁾. Bei dieser Darstellung bedeutet eine bestimmte Vertikalabweichung von der Kurve für jeden beliebigen Absolutwert der Ordinaten dieselbe prozentuale Änderung von ϵ . Ein weiterer Vorteil liegt bekanntlich darin, dass Verschiedenheiten in der Konz. sich lediglich in einer Vertikalverschiebung der Kurven ausdrücken. Lösungen verschiedener unbekannter Konz. können so trotzdem miteinander verglichen werden. Bei den hier ausgeführten Messungen ist lediglich für die Spektren der Reinpräparate und ihrer Mischungen die Konz. und damit ϵ bekannt. Für alle andern Kurven folgt aus den Messungen direkt nur $(\log \epsilon) + \text{Konstante}$. Da aber in Kap. V der quantitative Anschluss der nativen Lösungen an die Reinpräparate erreicht wird, kann man nun rückwärts aus den Spektren die Konstante und damit ϵ und c für alle Kurven ermitteln. Auch für die Blattspektren wurde dies mit Hilfe von Kurve 17 (siehe Kap. VII) durchgeführt⁵⁾. Die Einwagen von Ch. A und Ch. B, an denen

¹⁾ Über den Verlauf der Kurve zwischen den Messpunkten erhält man weitgehende Auskunft aus dem Gang des Galvanometerauschlages bei der Ausmessung der photographischen Platten.

²⁾ O. WARBURG und E. NEGELEIN, Zeitschr. Phys. Chem. **106**, 195, 1923.

³⁾ A. SPRECHER v. BERNEGG, E. HEIERLE und F. ALMASY, Biochem. Zeitschr. **283**, 45, 1935.

⁴⁾ Darstellungsweise von F. WEIGERT, Ber. deutsch. chem. Ges. **49**, 1496, 1916.

⁵⁾ Der Fehler dieser indirekten ϵ - und c -Bestimmung ist von Fall zu Fall stark verschieden, dürfte aber auch in den ungünstigsten Fällen (Blattspektren) 10% nicht wesentlich überschreiten. Abgesehen von den Ch.-Gehaltsbestimmungen an unverletzten Blättern spielen diese Absolutwerte von ϵ und c in vorliegender Arbeit keine Rolle.

alle Absolutwerte hängen, betragen um die 20 mg und sind sicher auf 1% richtig. Eine Wiederholung der Einwage gab gute Übereinstimmung der Absolutwerte. Zur Aufnahme der Spektren von Ch. in molekular gelöstem Zustande wurden Konz. zwischen ca. $2 \cdot 10^{-6}$ und $1 \cdot 10^{-4}$ Mol pro Liter benützt.

Jede der wiedergegebenen Kurven ist einmal mit allen Messpunkten dargestellt. Die gefundenen Effekte liegen stets grössenordnungsmässig ausserhalb der Streuung der Messpunkte.

Auswirkung von Fehlern in J_0/J sowie der Streuung an Kolloidteilchen auf die Absorptionskurven:

Die in Rechnung gesetzte Lichtschwächung sei J_0/J , die wirkliche $k \cdot J_0/J$, ε^* sei der wirkliche, ε der berechnete Extinktionskoeffizient. k sei unabhängig von der Wellenlänge. Dann gilt:

$$\varepsilon^* = \frac{\log(k J_0/J)}{c \cdot d} = \frac{\log J_0/J + \log k}{c \cdot d} = \frac{\log J_0/J}{c \cdot d} \left(1 + \frac{\log k}{\log J_0/J} \right)$$

$$\log \varepsilon^* = \log \varepsilon + \log \left(1 + \frac{\log k}{\log J_0/J} \right)$$

Solange J_0/J konstant ist (was z. B. für die Lösungsspektren zutrifft), d. h. solange mit ein und demselben Sektor innerhalb einer Kurve gearbeitet wird, kommt keine Verzerrung der Kurve, sondern nur eine Vertikalverschiebung, d. h. ein Fehler in der Konz. zustande.

Ist aber J_0/J variabel, so wird die Kurve verzerrt. Hält man statt dessen das Produkt $c \cdot d$ konstant, so wird (was für die Blattspektren zutrifft):

$$\varepsilon^* = \frac{\log J_0/J}{c \cdot d} + \frac{\log k}{c \cdot d} = \varepsilon + \frac{\log k}{c \cdot d} = \varepsilon + r.$$

Jetzt äussert sich der Fehler in einer Vertikalverschiebung der Kurven, falls ε selbst aufgetragen wird. Dazu muss aber die Konz. bekannt sein. In log. Darstellung dagegen werden die Kurven verzerrt.

Einfluss einer Streuung: Nach B. LANGE¹⁾ gilt auch für Kolloide das Lambert-Beer'sche Gesetz. Abweichungen vom Beer'schen Gesetz liegen stets kolloidchemische Änderungen der Substanz beim Verdünnen zu Grunde. Demgemäss muss sich die Lichtschwächung im Kolloid darstellen lassen als $J = J_0 \cdot 10^{-c \cdot d (\varepsilon + s)}$ wo s für graue Streuung eine wellenlängenunabhängige Konstante

¹⁾ B. LANGE, Z. S. Phys. Chem. A **159**, 277, 1932.

ist. Da die untersuchten kolloidalen Lösungen mit wesentlicher Lichtstreuung aus Teilchen der Grössenordnung 1μ bestanden (siehe Kap. VII), darf in 1. Näherung im folgenden mit grauer Streuung gerechnet werden. Die Lichtstreuung im Kolloid hat somit eine Vertikalverschiebung der Kurve zur Folge, falls ϵ selbst aufgetragen wird. Die log. Kurven sind dagegen verzerrt.

Somit lassen sich die alten Absorptionsmessungen von IWANOWSKI¹⁾ zur Diskussion des Spektrums von kolloidalem Ch. nicht verwenden, wie in Kap. VII noch näher ausgeführt wird.

III. Extraktions- und Reinigungsverfahren, Lösungsmittel.

Der Grundgedanke für die Herstellung der Ch.-Lösungen besteht darin, Pflanzen und Extraktionsmittel nur so kurz wie möglich miteinander in Berührung zu lassen. Somit kommen nur Pflanzen in Frage, deren Oberfläche relativ gross ist verglichen mit der Ch.-Menge. Am günstigsten erwies sich ein Wassermoss mit sehr vielen kleinen dünnen Blättchen: „*Fontinalis antipyretica* L.“²⁾.

Ausser den Messungen an unverletzten Blättern, sind alle Versuche mit dieser Pflanze durchgeführt worden. Zur Extraktion und Reinigung wurden Methyl- und Äthylalkohol, Benzol und Petroläther (30° bis 50°) verwendet (im folgenden als P.Ä. bezeichnet). Für die Messungen war das Ch. stets in Äthylalkohol gelöst. Es handelt sich somit um mehr oder weniger allomerisiertes Ch.³⁾. Da das Spektrum im Sichtbaren bei der Allomerisation aber praktisch unverändert bleibt⁴⁾, spielt das keine Rolle. Zudem handelt es sich immer um Vergleichsmessungen der verschiedenen Präparate in Äthylalkohol, wodurch auch die geringfügige spektrale Änderung, die bei der Allomerisation auftritt, herausfällt (nach CONANT: Geringfügige Verschiebung nach Violett). In nächster Zukunft sollen die Messungen auch an nicht allomerisiertem Ch. ausgeführt werden.

Um das extrahierte Ch. möglichst schonend zu behandeln, wurde die Reinigung der Extrakte auf das notwendigste beschränkt.

1) D. IWANOWSKI, Ber. der deutsch. bot. Ges. **25**, 416, 1907.

2) Die Bestimmung aller in der Arbeit verwendeten Pflanzen wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Däniker, Institut für systematische Botanik, Universität Zürich, übernommen.

3) Allomerisation, siehe z. B. H. FISCHER, Mikrochemie, Molisch' Festschrift **67**, 1936, besteht in der Aufnahme eines Moles Sauerstoff am C₁₀ des isocyclischen Ringes.

4) A. STOLL und E. WIEDEMANN, Helv. Chim. Acta **15**, 1128, 1932; **16**, 183, 1933; H. FISCHER und Mitarbeiter, Lieb. Ann. d. Ch. **490**, 48, 1931; J. B. CONANT, J. Am. Chem. Soc. **53**, 1615, 1931.

Ch. A und B werden nicht voneinander getrennt. Es wurden lediglich Carotin und Xantophyll in dem Masse entfernt, dass für Wellenlängen grösser als 5100 Å.E. nur noch die Ch.-Absorption wirksam war. Unbehindert durch alle andern in diesem Gebiete farblosen Begleitstoffe, konnte nun die Ch.-Absorption im Gebiete zwischen 5100 und 6800 Å.E. als Indikator für den Zustand des Ch. dienen.

Das endgültige Extraktions- und Reinigungsverfahren ist folgendes:

1. Nach Einsammeln der Pflanzen am natürlichen Standort werden sie zwecks Säuberung ca. 24 Stunden in fliessendem Leitungswasser gehalten. Nach dieser Zeit leben die Pflanzen noch.

2. Oberflächliches Abtrocknen mit Filtrierpapier.

3. Auslesen der sauberen, frisch grün aussehenden Pflanzenteile.

4. Vorextraktion mit P.Ä. Dabei werden die Pflanzen in einer Porzellanreibschale dreimal je 2 Minuten mit 100—150 cm³ P.Ä. „gemörsert“. Es gehen nur die Carotinoide in Lösung.

5. Extraktion der so vorbehandelten Pflanzen mit Äthylalkohol (99,5%). Hierfür werden die Pflanzen während 2 Minuten mit 100—150 cm³ Äthylalkohol in dem Mörser behandelt.

6. Sofort anschliessend wird der Extrakt zweimal abfiltriert. Die erste Filtration ist für das ganze Extraktvolumen 10 Minuten nach Beginn von 5. beendet.

7. Bei Extraktion und Vorextraktion wird zur Abstumpfung der Pflanzensäuren reichlich reinstes alkalifreies CaCO₃ zugesetzt.

8. Mischung des Extraktes mit P.Ä. und darauf folgender Zusatz von Wasser im Volumenverhältnis 1,0:0,4:0,5. Die dabei entstehende P.Ä.-Schicht enthält das Ch. und wird abgetrennt. Durch weiteren zwei-, höchstens dreimaligen Zusatz von 0,5 Teilen P.Ä. (Volumen des ursprünglichen Extraktes = 1,0), lässt sich die alkoholig-wässrige Schicht vollständig vom Ch. befreien. Sie enthält nur noch die Carotinoide.

9. Die P.Ä.-Fraktion wird im Dunklen mit N₂ durchströmt, bis der P.Ä. vollständig verdampft ist. Der N₂ ist Sauerstofffrei (O₂:N₂ kleiner als 1:10⁷)¹⁾. Die Temperatur liegt unter 10°.

10. Die verbleibende Trockensubstanz wird in Äthylalkohol gelöst, abfiltriert und stellt die Ch.-Lösung dar, welche nun spektrometrisch auszumessen ist.

¹⁾ Der Stickstoff wurde über glühendem Kupfer von Sauerstoff-Beimengungen befreit. Das so gereinigte N₂ wurde mit Hilfe von Leuchtbakterien auf seinen O₂-Gehalt geprüft. Eine Veröffentlichung des Verfahrens zur *quantitativen* Bestimmung von hochverdünntem O₂ mit Leuchtbakterien erfolgt demnächst.

Tabelle 1.

 Zusammensetzung des Zürcher Leitungswassers¹⁾:

I. Das Wasserreservoir enthielt:

Quellwasser	80—100%
Seewasser	16— 0%
Grundwasser	10— 0%

II. Wasseranalyse:

Quellwasser	Seewasser	Grundwasser	Substanz, resp. gemessene Grösse
9,2	5,9	13,0	Temperatur
24,25	12,75	17,25	Karbonathärte } in franz. ° (1° = 10 mg Gesamthärte } CaCO ₃ im Liter)
25,25	14,5	21,0	
7,7	7,8	7,7	pH
8,00	6,10	2,22	O ₂ in cm ³ /Liter
7,50	4,90	2,10	O ₂ in cm ³ /Liter nach 5 Tagen
15,0	4,0	8,2	freie Kohlensäure in mg/Liter
31,37	4,10	9,65	für das Karbonatgleichgewicht erforderliches freies CO ₂ mg/L.
0,0	0,0	0,0	agressive Kohlensäure mg/L.
270	158	244	Trockenrückstand in mg/Liter
265	154	231	Glührückstand in mg/Liter
0,6	2,1	0,7	Oxydierbarkeit, d. h. Verbrauch von KMnO ₄ , mg/Liter
0,000	0,003	0,000	freies Ammoniak, mg/L. } Methode Albuminoides Ammon., mg/L. } Schweiz. Lebensmittel B.
0,010	0,020	0,016	
0,056	0,130	0,088	Folin-Wert: Aminosäuren mg/Liter
0,005	0,010	0,007	entspricht NH ₂ -N mg/L.
0,004	0,091	0,006	„ N mg/L.
0,03	0,02	0,03	Fe··
0,0	0,0	0,0	Mn··
ca. 0,01	ca. 0,02	ca. 0,03	Al··
0,8	0,8	2,9	K·
3,6	1,1	1,5	SiO ₂
90,4	48,1	63,8	Ca··
14,2	7,5	12,5	Mg··
4,5	3,0	7,0	Cl'
4,6	1,8	5,1	NO ₃ '
4,0	1,6	4,4	entspricht N ₂ O ₅
0,0	0,0	0,0	Nitrition
0,37	0,29	0,37	PO ₄ '''
5,1	12,2	22,1	SO ₄ ''
0,0	0,0	0,0	Schwefelwasserstoff

¹⁾ Für diese Angaben über das Leitungswasser bin ich der städtischen Wasserversorgung Zürich zu Dank verpflichtet.

Die Extraktion ist nicht im entferntesten quantitativ. Die Pflanzenmenge ist festgelegt durch den ca. 150 cm³ fassenden Mörser. Als Wasser wurde bei der Herstellung der Präparate stets Leitungswasser verwendet. Bei Verwendung von gewöhnlichem destilliertem Wasser trat in den damit versetzten Ch.-Lösungen stets die charakteristische Phäophytinbande im Grün auf. Nur sehr sorgfältig, durch mehrfaches Ausfrieren hergestelltes Wasser liess das Ch. nahezu unverändert. Da das Zürcher Leitungswasser ($p_{\text{H}} = 7,7$ bis 7,8) gar keine Umsetzungen hervorrief, wurde dieses verwendet. Die Wasseranalyse (Tab. 1) zeigt die Unbedenklichkeit dieses Vorgehens.

IV. Diskussion des Spektrums der nach Kap. III hergestellten nativen Ch.-Lösung.

Als erstes und wichtigstes Argument für die Realität der Unterschiede zwischen nativem Ch. und den Reinpräparaten dient die Tatsache, dass sich das native Ch. in den Zustand der Reinpräparate überführen lässt, d. h. in diesem Zustande dann quantitativ das Spektrum der Reinpräparate zeigt, wie im Kap. V näher ausgeführt wird. Kurve 1 (Fig. 2) zeigt die Absorption einer Lösung von nativem Ch. Kurve 2 und 3 (Fig. 3) zeigen die Absorption der Stoll'schen Reinpräparate A und B, die auch chromatographisch rein sind.

Kurve 1 lässt sich nun nicht als Mischkurve von 2 und 3 darstellen, denn die Differenz in $\log \epsilon$ zwischen dem Maximum im Rot und dem Minimum im Grün beträgt für die native Ch.-Lösung 1,3 log. Einheiten, für Ch. A 1,15 und für Ch. B 0,6 log. Einheiten. Da also schon Ch. A eine kleinere Differenz als das native Ch.-Gemisch zeigt, kann ein Zusatz von Ch. B den Unterschied zwischen dem nativen Spektrum und dem der Reinpräparate nur noch vergrössern. Vergleicht man nun Kurve 1 mit Kurve 2 (d. h. Ch. A), so sieht man, dass das untersuchte native Ch.-Gemisch zur Hauptsache Ch. A. enthält. Für λ grösser 5600 Å.E. sind die Kurven recht ähnlich. Der Hauptunterschied gegen Kurve 2 besteht darin, dass beim nativen Ch. die Bande bei 5300 Å.E. fehlt, beziehungsweise nur noch durch eine leichte Inkliniation angedeutet ist. Ferner ist die Kurve 1 um 40 Å.E. nach Rot verschoben. Diese geringfügigen Verschiebungen werden nicht als wesentliche Unterschiede betrachtet, zumal da sie vielleicht von der Allomerisation herrühren, die im Reinpräparat ja schneller vor sich geht als im Roh-Ch.¹⁾

¹⁾ R. WILLSTÄTTER und A. STOLL, Untersuchungen über Chlorophyll, bei J. Springer, Berlin 1913, Seite 149.

Die Unterschiede bei λ kleiner als 5000 Å.E. können nicht diskutiert werden, da die Carotinoide nicht quantitativ entfernt sind und in diesem Gebiet sehr stark zu absorbieren beginnen. Für λ kleiner als 5000 Å.E. zeigen die nativen Extrakte daher

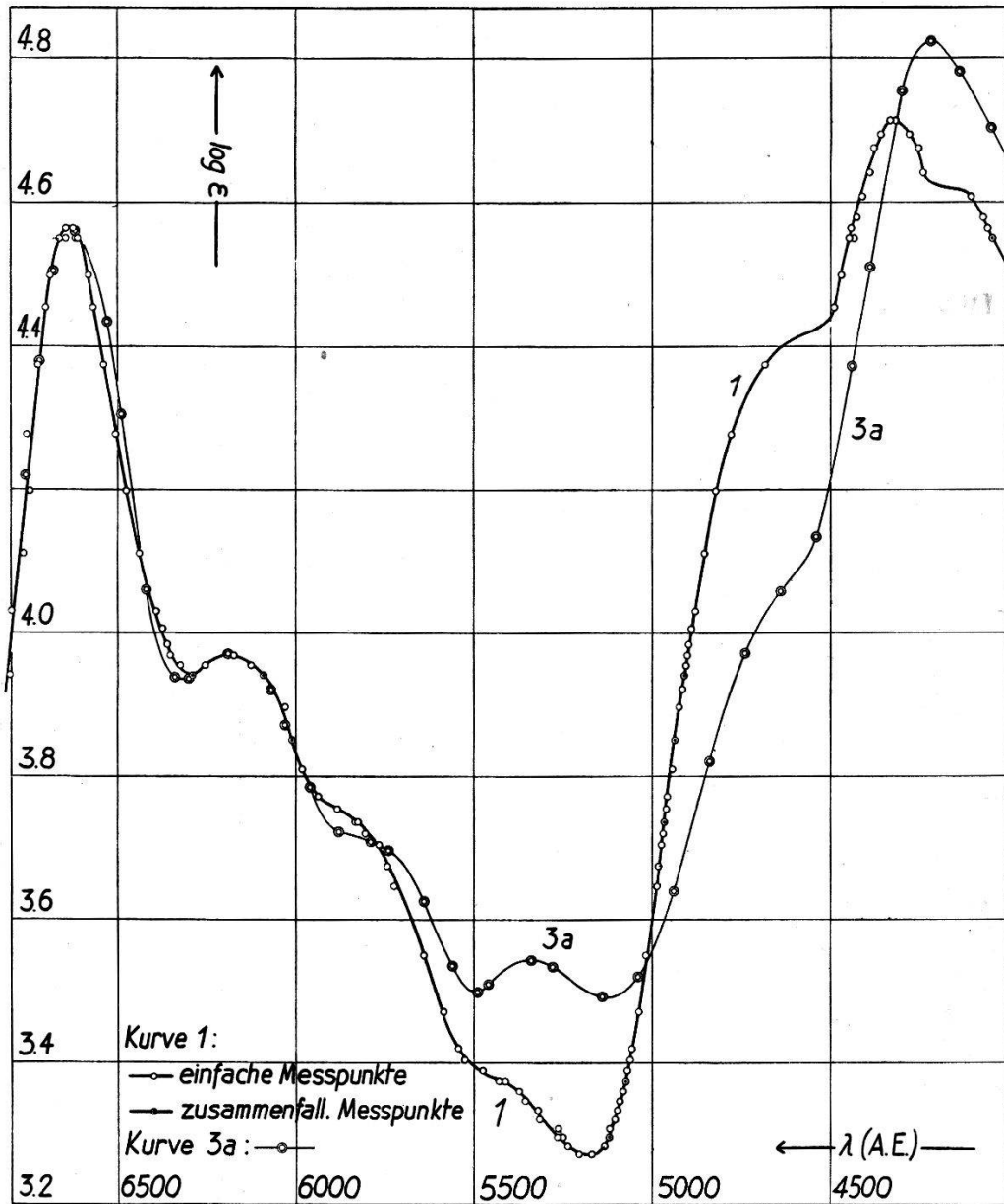


Fig. 2.

Kurve 1: Absorption des nativen Chlorophylls. Kurve 3a: Absorption der Stoll'schen Reinpräparate im Mischungsverhältnis A : B = 9 : 1.

von vorneherein grössere Absorption als die Reinpräparate. Für zukünftige Untersuchungen in diesem Gebiet (λ kleiner 5000 Å.E.) muss deswegen die quantitative Entfernung der Carotinoide ohne Schädigung des nativen Ch. der Ausgangspunkt sein.

Im folgenden sollen nun alle Möglichkeiten diskutiert werden, die das besondere Spektrum des nativen Ch. vortäuschen könnten.

1. Absorption der Carotinoide: Carotin und Xantophyll zeigen einen ausserordentlich steilen, in der log. Darstellung ungefähr geradlinigen Anstieg der Absorption bei ca. 5000 Å.E.¹⁾ Bei grösseren Wellenlängen zeigen sie in echter Lösung²⁾ keine merkliche Absorption. Da das Ch. A resp. Ch. B im fraglichen Gebiet

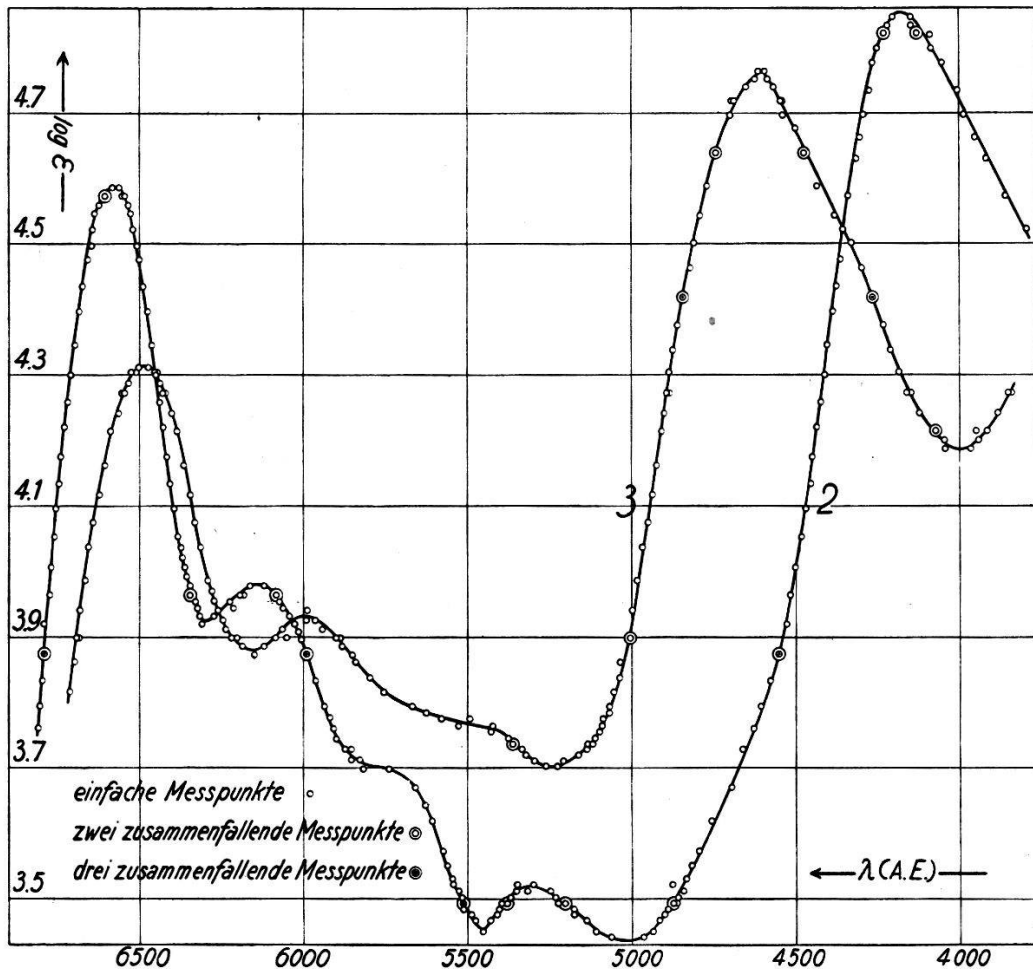


Fig. 3.

Absorption der Stoll'schen Reinpräparate.

Kurve 2: Chlorophyll A; Kurve 3: Chlorophyll B.

von ca. 5000—5500 Å.E. eine bis zu 40% resp. 150% grössere Absorption zeigt als das native Ch., kann der Unterschied unmöglich durch eine zusätzliche Absorption von noch im nativen Ch. vorhandenen Carotinoiden verursacht werden. Im Gegenteil

¹⁾ A. SPRECHER v. BERNEGG, E. HEIERLE, F. ALMASY, loc. cit.; A. SMAKULA, Zeitschr. angewandte Ch. **47**, 657, 1934; E. S. MILLER, Plant Physiology **12**, 667, 1937; E. S. MILLER, Bot. Gaz. **96**, 447, 1935; MC. NICHOLAS, Bureau of Standards, Journal of Research **7**, 171, 1931.

²⁾ Nach P. KARRER und W. STRAUS, Helv. Chim. Acta **21**, 1624, 1938, kann die Absorption kolloidaler wässriger Carotinlösungen bis zu wesentlich längeren Wellen reichen.

könnte eine bessere Reinigung des nativen Ch. den Unterschied nur noch vergrössern.

2. Aus den gleichen Gründen können auch keine anderen absorbierenden Verunreinigungen des nativen Ch. eine *Abnahme* seiner Absorption erklären.

3. Es muss nachgewiesen werden, dass im nativen Ch. nicht etwa ganz, oder zum Teil eines der ersten Derivate des Ch. vorliegt. Phäophytin, Methylphäophorbid, oder Phäophorbid können schon deswegen nicht vorliegen, weil diese Derivate sowohl in der A-, als der B-Reihe eine Absorptionsbande bei 5300 Å.E. haben, und daher, ganz im Gegenteil zum nativen Ch., eine Vergrösserung der Absorption in diesem Gebiete bewirken müssten. Zudem ist beim Herstellungsverfahren nirgends eine Einwirkung von Säure möglich.

Auch die Entstehung der Chlorophyllide ist nicht möglich. Da der Extrakt mit den Pflanzen selbst ja nur zwei Minuten in Berührung ist, kommt ein Umsatz unter der Wirkung der Chlorophyllase nicht in Frage. Dieses Enzym ist bekanntlich in Alkohol unlöslich, und geht somit nicht in den filtrierten Extrakt über. Ferner sind die Chlorophyllide unlöslich in P.Ä. (auch in alkoholhaltigem P.Ä.)¹⁾. Da beim Reinigungsverfahren des nativen Ch. dieses quantitativ von P.Ä. aufgenommen wurde, ist die Anwesenheit von Chlorophylliden ausgeschlossen.

4. Es muss die Möglichkeit ins Auge gefasst werden, dass die Stoll'schen Reinpräparate verdorben waren. Da der Unterschied gegenüber dem nativen Ch. im wesentlichen durch die Bande bei 5300 Å.E. bedingt ist, kommt auch das nicht in Frage, denn sämtliche Spektren der Literatur zeigen, so wie unsere Messungen, eine Bande bei ca. 5300 Å.E.²⁾. Die Stoll'schen Präparate wurden auch auf ihre Beständigkeit geprüft. Für Ch. A wurde nach 8, für Ch. B nach 7 Monaten nochmals eine neue Lösung hergestellt. Ch. B zeigte sich vollkommen unverändert, während Ch. A einige Abweichungen ergab. Die ganze Kurve ist 50 Å.E. nach Violett verschoben. Das Maximum im Rot ist sonst unverändert, während das Maximum im Violett um 35% in ϵ erniedrigt ist. Im Gebiet dazwischen treten unregelmässige Abweichungen auf, die sich von -6 bis +15% in ϵ bewegen. Es sind aber noch alle Banden

¹⁾ A. WILLSTÄTTER und A. STOLL, loc. cit., Seite 177.

²⁾ A. SPRECHER v. BERNEGG, E. HEIERLE, F. ALMASY, loc. cit.; A. HAGENBACH, F. AUERBACHER, E. WIEDEMANN, Helv. Phys. Acta **9**, 3, 1936; F. P. ZSCHEILE jun., Bot. Gaz. **95**, 529, 1934; A. WINTERSTEIN, Handbuch der Pflanzenanalyse, herausgegeben von G. KLEIN, Wien, J. Springer, 1932, Band **4**, Teil **2**, Seite 1426; E. RABINOWITSCH und I. WEISS, Proc. of Roy. Soc. A. **126**, 251, 1937.

und Inklinationen der ursprünglichen Kurve vorhanden, und es sind keine neuen dazu gekommen. Diese Veränderungen bewirken aber nicht im mindesten ein Verschwinden der Unterschiede gegenüber dem nativen Ch.

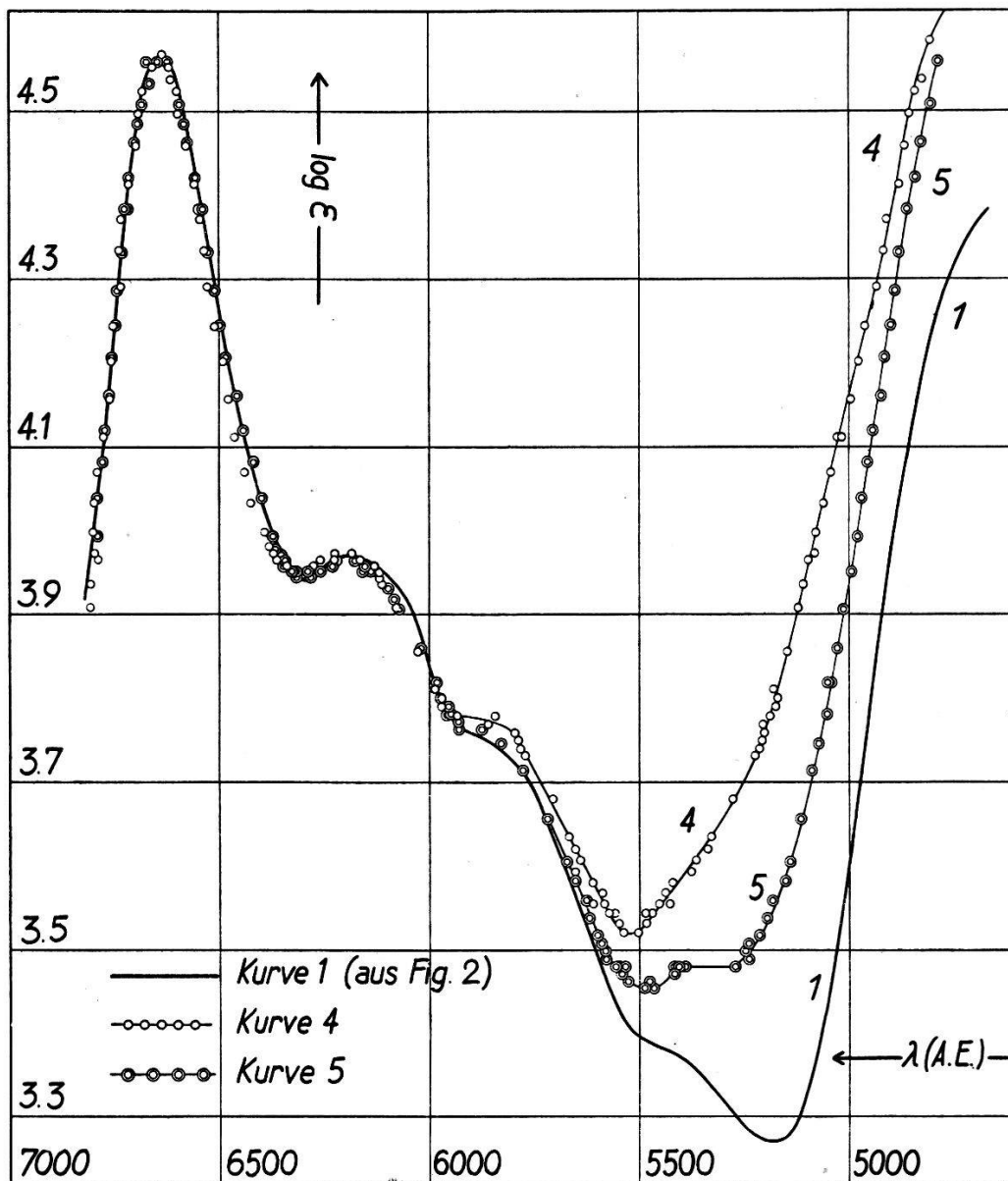


Fig. 4.

Betrachtet man z. B. die Kurven aus der Arbeit von SPRECHER v. BERNEGG, HEIERLE und ALMASY (loc. cit.), die vor 3 bis 4 Jahren auch mit Stoll'schen Reinpräparaten in C_2H_5OH aufgenommen wurden, so ergeben sich wesentliche Unterschiede gegen die von uns ausgemessenen Reinpräparate. Unter anderem ist dort bei 5000 Å.E. für Ch. A an Stelle eines Minimums noch eine zusätzliche Absorptionsbande vorhanden. Hieraus darf man wohl schliessen, dass auch in allerletzter Zeit Fortschritte in der korrekten Her-

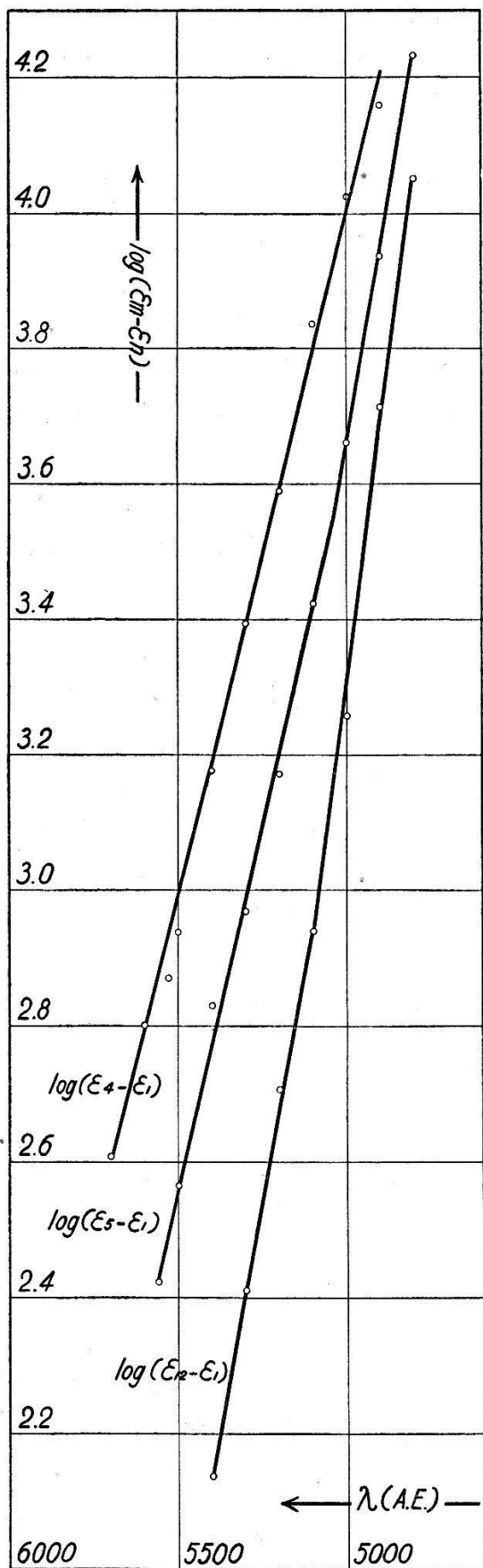


Fig. 5.

Tabelle 2.

Abweichungen der Ordinaten der Messpunkte von den Kurven in Fig. 5, umgerechnet in den prozentualen Fehler von ϵ_m , der nötig wäre, um diese Abweichungen hervorzurufen.

λ	Bezeichnung der zugehörigen Kurve in Fig. 5		
	$\log(\epsilon_4 - \epsilon_1)$	$\log(\epsilon_5 - \epsilon_1)$	$\log(\epsilon_{12} - \epsilon_1)$
	Prozent von ϵ_m		
4800		-0,6	-0,7
4900	-6,1	-1,4	+1,2
5000	+3,8	0,0	-4,5
5100	+6,9	0,0	0,0
5200	-0,3	-3,4	+1,3
5300	0,0	-1,4	0,0
5400	-0,8	+3,2	0,0
5500	-3,6	+0,3	
5530	-3,8		
5560		-0,1	
5600	+0,1		
5700	+0,2		

*

stellung der Reinpräparate gemacht wurden, was zeigt, wie sehr die Behauptungen der vorliegenden Arbeit im Bereiche des Möglichen liegen.

5. Das Extraktions- und Reinigungsverfahren muss für jede seiner Phasen in seiner Wirkung auf das Spektrum untersucht werden. Die allereinfachste Extraktion der frischen, oberflächlich abgetrockneten Pflanzen mit Äthylalkohol gibt Kurve 4 (Fig. 4). Weder Vorextraktion, noch Kalziumcarbonat, noch die Überführung in P.Ä. wurden verwendet. Wie weit das native Ch. in dieser Ausgangslösung bereits gegenüber dem Ch. im Blatt verändert sein kann, wird im Kap. VII näher diskutiert. Kurve 5 (Fig. 4) zeigt einen Extrakt, der mit CaCO_3 und Vorextraktion hergestellt wurde. Der Unterschied in der Herstellung zwischen 5 und 1 besteht nur noch in der Reinigung durch Überführen in P.Ä. Die Differenzkurven (Fig. 5) $\log(\epsilon_4 - \epsilon_1)$ und $\log(\epsilon_5 - \epsilon_1)$ sind innerhalb der Messgenauigkeit¹⁾ (Tab. 2) gerade Linien (resp. schwach geknickt), was nach Kap. IV, 1 zeigt, dass es sich bei den Unterschieden zwischen 1 und 4, resp. 5 lediglich um sukzessive Entfernung der Carotinoide handelt.

V. Überführung des nativen Ch. in das bekannte Ch.

Beschreibung des Umwandlungsverfahrens: Es wird ein Extrakt nach Kap. III unter Weglassung der Punkte 8, 9, 10 mit CH_3OH hergestellt (die Verwendung von CH_3OH statt $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ hat, wie weiter unten gezeigt wird, keinen Einfluss); seine Absorption gibt somit Kurve 5 (Fig. 4) wieder. Von Kurve 1 unterscheidet sich Kurve 5, wie gesagt, nur durch den vermehrten Gehalt an Carotinoiden. Nun wird der Extrakt mit Benzol gemischt und hierauf mit Wasser versetzt im Volumenverhältnis 1,0 : 0,15 : 0,8. Dabei entsteht eine grüne Emulsion, in der das Ch. kolloidal vorliegt. Die sich abscheidende Benzolschicht enthält hauptsächlich die Carotinoide und wird verworfen. Durch mehrmaligen weiteren Zusatz von 0,2 Volumenteilen (vom ursprünglichen Extraktvolumen) Benzol wird weiteres Carotinoid entfernt. Etwa bei der 4. Wiederholung beginnt die Benzolschicht wesentliche Ch.-Mengen aufzunehmen, und das Reinigungsverfahren wird abgebrochen. Der kolloidale Extrakt wird nun in eine vertikale Glasröhre (Durchmesser ca. 3,5 cm, Länge ca. 110 cm) gebracht, in die von unten her im Dunkeln ein Luftstrom von ca. 10—15 Liter pro Minute geblasen wird (der Luftsauerstoff spielt dabei keine

¹⁾ Siehe Kap. II, Abschnitt: Genauigkeit des Verfahrens.

Rolle, wie weiter unten gezeigt wird). Auf diese Weise wird das Benzol und der Methylalkohol bei 10–15° C ausgetrieben. Nach ca. 6–7 Stunden hat sich ein wesentlicher Teil des Ch. als Ring an der Wandung der Röhre niedergeschlagen. Die Flüssigkeit ist klar, aber noch stark grün und wird verworfen. Der Niederschlag

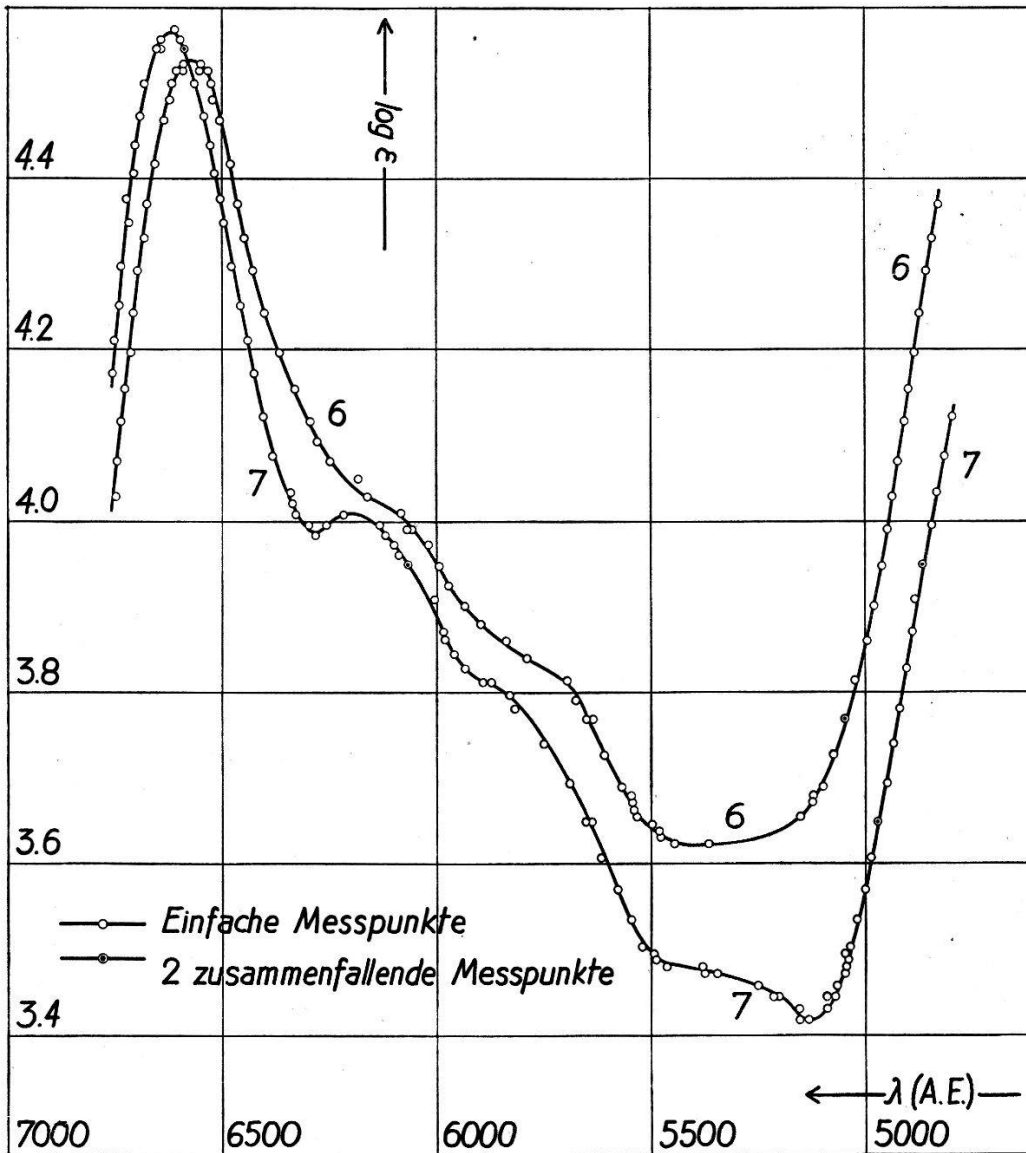


Fig. 6.

Kurve 6: Kolloidales Chlorophyll.

Kurve 7: Echt gelöstes Chlorophyll; gegenüber Kurve 6 verminderter Carotinoidgehalt.

wird in Äthylalkohol aufgelöst und abfiltriert. Sein Spektrum zeigt Kurve 6 (Fig. 6). Es handelt sich hier um die Absorption von kolloidalem Ch., wie in Kap. VII gezeigt wird. Führt man mit dieser Lösung das Extraktionsverfahren (siehe Kap. III) auch noch in den Punkten 8, 9, 10 durch, so geht neben der Ent-

fernung der Carotinoide das Ch. wieder in den echt gelösten Zustand über, Kurve 7 (Fig. 6). 7 stimmt nämlich mit 1 (natives Ch.) weitgehend überein. Einzig im Gebiet zwischen 5100 und 5500 Å. E. zeigt 7 eine vermehrte Absorption. 7 hat sich also durch die langdauernde Behandlung an der massgebenden Stelle des Spektrums bereits in Richtung der Reinpräparate verändert. Lässt man die

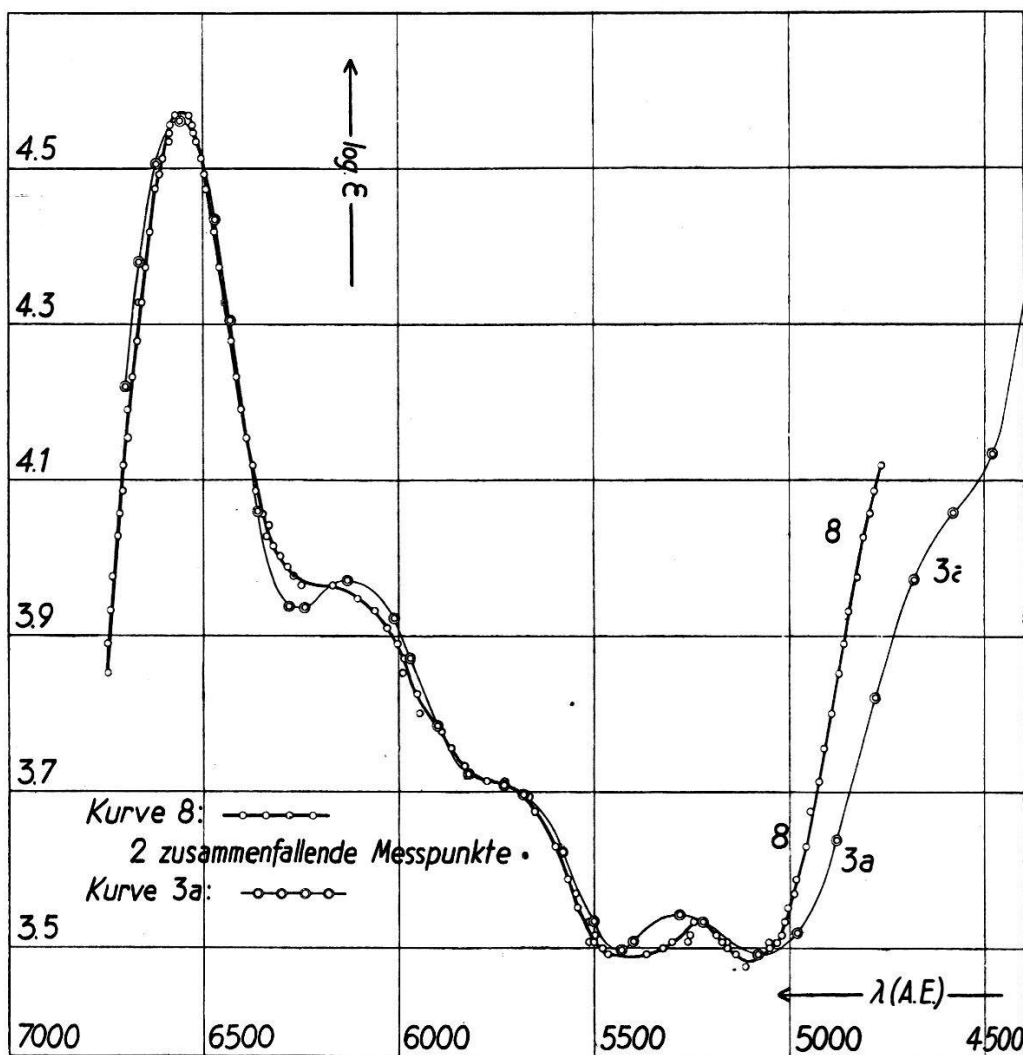


Fig. 7.

Kurve 8: Natives Chlorophyll nach der Umwandlung.

Kurve 3a: Mischung der Stoll'schen Reinpräparate A : B = 9 : 1.

Lösung 7 etwa 14 Tage altern, so ergibt sich Kurve 8 (Fig. 7). Die Kurve 3a in Fig. 7 stellt die Absorption (um 20 Å. E. nach Violett verschoben) einer Mischung der Reinpräparate im molaren Verhältnis A : B = 9 : 1 dar. Da die Kurve 3a praktisch mit der Kurve 8 zusammenfällt, ist die Umwandlung des nativen Ch. in das bisher bekannte Ch. gelungen. Damit ist der Beweis erbracht, dass Letzteres ein Derivat des nativen Ch. ist. Die Unterschiede für λ kleiner

5000 Å.E. beruhen auf der Absorption der Carotinoide, von denen die nativen Lösungen ja nicht vollständig befreit sind¹⁾.

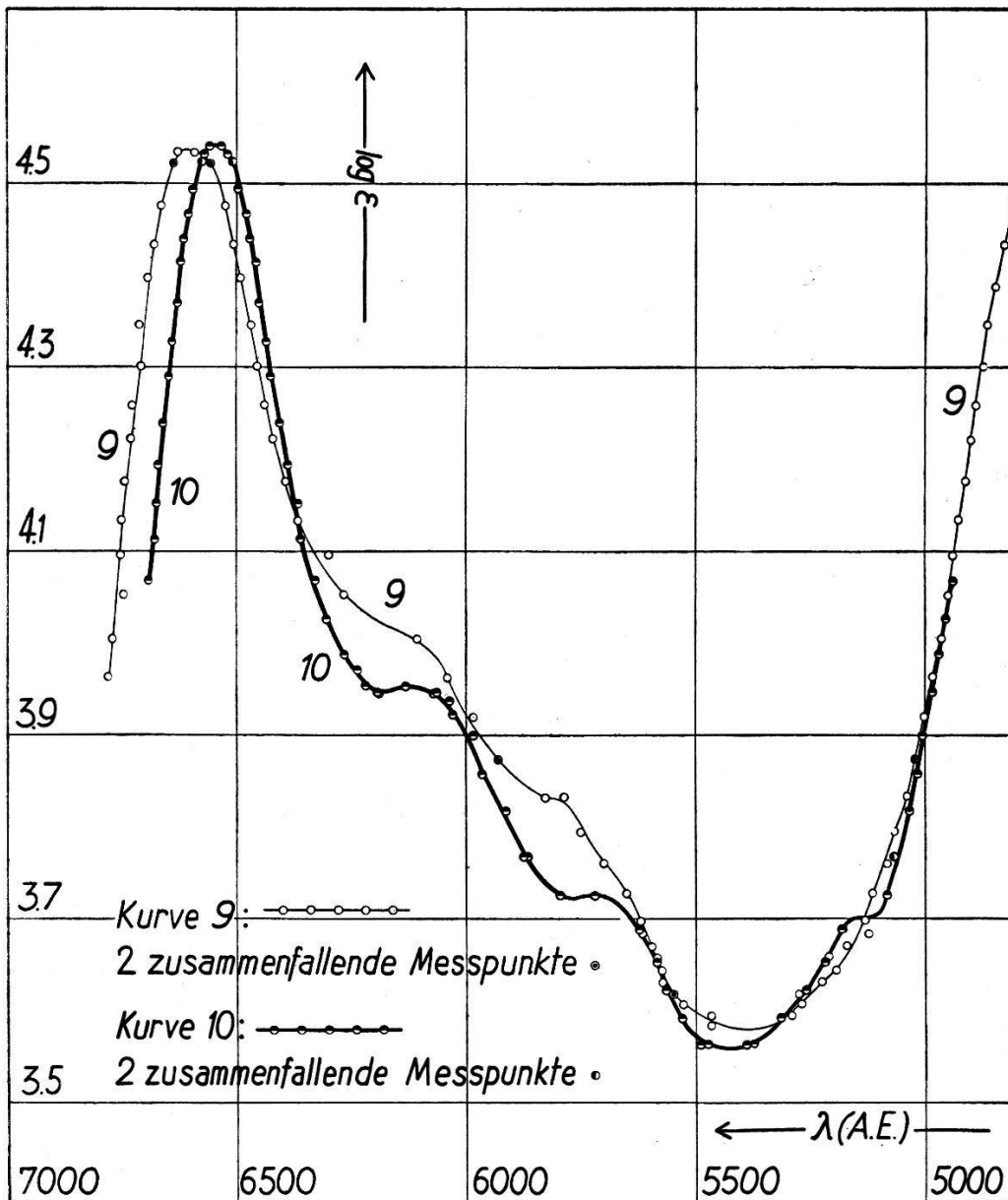


Fig. 8.

Dasselbe Resultat lässt sich auch auf einem etwas anderen Wege erreichen. Eine gleich wie 6 hergestellte kolloidale Ch.-Lösung gibt Kurve 9 (Fig. 8), die, wie es sein muss, praktisch identisch

¹⁾ Die Menge der in der Lösung noch enthaltenen Carotinoide lässt sich folgendermassen abschätzen: Nach Kurve 8 ist bei 4800 Å.E. der Extinktionskoeffizient unserer Lösung rund 80% grösser als derjenige des analogen Gemisches der Reinpräparate. Der Extinktionskoeffizient einer reinen Carotinoidlösung (für $\lambda = 4800$ Å.E. gilt: $\lg \epsilon_{\text{Carotin}} \cong \lg \epsilon_{\text{Xanthophyll}} \cong 5,0$) dagegen, sollte rund 1600% grösser sein, d. h. in unserer Lösung kommt auf ca. 20 Ch.-Moleküle 1 Carotinoidmolekül. Da das natürliche molare Mischungsverhältnis von Ch. zu Carotinoid etwa 2 ist, haben wir in unseren Lösungen den Carotinoidgehalt auf ca. $\frac{1}{10}$ des natürlichen herabgesetzt.

mit 6 ist. Nun lässt man zuerst die kolloidale Lösung 14 Tage altern. Dabei geht diese von selbst in den echt gelösten Zustand über und verwandelt sich gleichzeitig in den Zustand der Reinpräparate, wie Kurve 10 (Fig. 8) zeigt. Entfernt man nämlich aus 10 durch Anwendung der Punkte 8, 9, 10 des Extraktionsverfahrens die Carotinoide, so ergibt sich die Kurve 11 (Fig. 9).

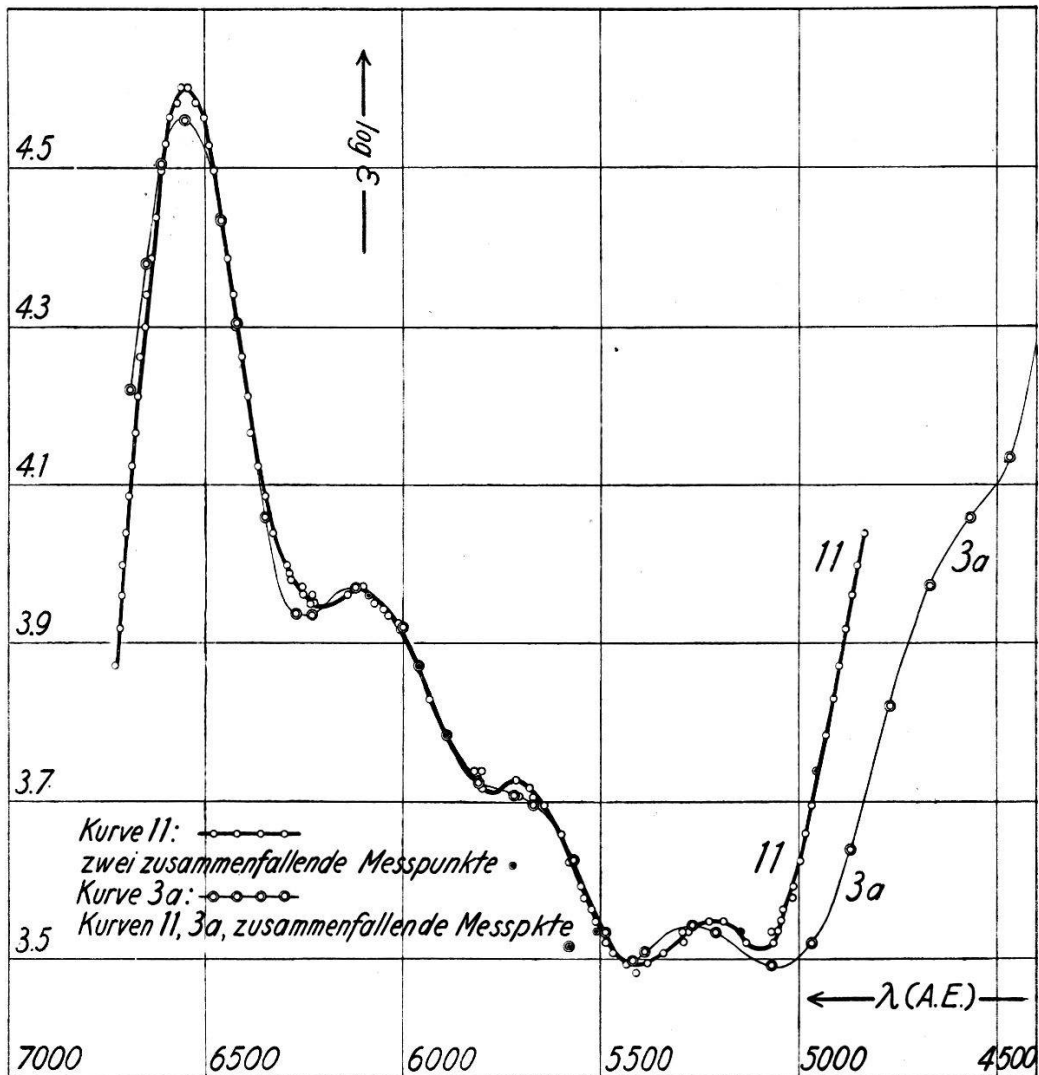


Fig. 9.

Kurve 11: Natives Chlorophyll nach der Umwandlung.

Kurve 3a: Mischung der Stoll'schen Reinpräparate A : B = 9 : 1.

Die Kurve 3a in Fig. 9 aber stellt wiederum die Absorption des Gemisches der Reinpräparate (um 30 Å.E. nach Violett verschoben) im molaren Verhältnis A : B = 9 : 1 dar. Da die Kurve 3a praktisch mit Kurve 11 zusammenfällt, ist auch in diesem Falle die Umwandlung des nativen Ch. in das bisher bekannte Ch. gelungen.

Dass sich die Kurven 10 und 11 nur durch verschiedenen Carotinoidgehalt voneinander unterscheiden, ergibt sich, wenn

man $\log(\epsilon_{10} - \epsilon_{11})$ berechnet; denn diese Grösse zeigt bei λ um 5000 Å.E. den linearen Anstieg der Carotinoid-Absorption mit abnehmender Wellenlänge. Die beschriebene Umwandlung des nativen Ch. in die Stoll'schen Präparate gelang immer nur dann,

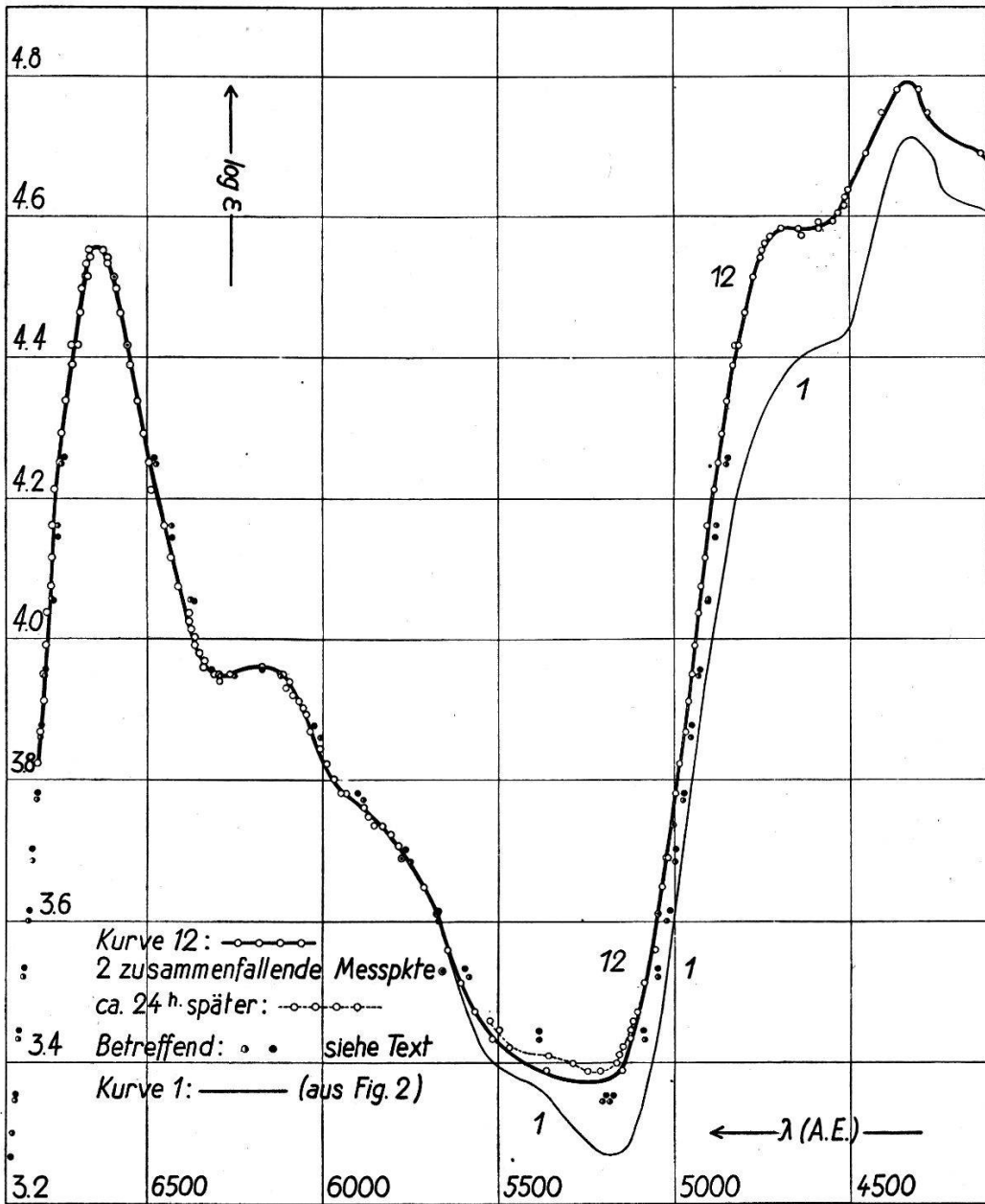


Fig. 10.

Kurve 1: Natives Chlorophyll.

wenn, wie bei Kurve 6 und 9 beim Auflösen des Niederschlages in der Blase-Röhre, dieser kolloidal in Lösung ging, was nicht im mindesten immer der Fall ist. Dieses verschiedene Verhalten muss mit geringen Schwankungen in der Zusammensetzung der Pflanzenextrakte (farblose Begleitstoffe!), oder kleinen Verschiedenheiten bei der Herstellung der Alkohol-Benzol-Wasser-Emulsion zu-

sammenhängen. Dass weder der Luftsauerstoff, noch die Gasgeschwindigkeit beim Durchblasen der Emulsion eine Rolle spielt, zeigen folgende Versuche: Kurve 12 (Fig. 10) gibt die Absorption einer Lösung wieder, die gleich wie 6, resp. 9 hergestellt wurde mit dem einzigen Unterschiede, dass zum Durchblasen der Emulsion sauerstoff-freier Stickstoff ($O_2:N_2$ kleiner als $1:10^7$) verwendet wurde, mit einer Gasgeschwindigkeit von ca. 400 cm^3 pro Minute. In 12 liegt echt gelöstes Ch. vor. 12 stimmt mit 1, dem nativen Ch., für λ grösser 5500 Å.E. überein. Die Unterschiede für λ kleiner als 5500 Å.E. bestehen bloss in einem etwas grösseren Gehalt an Carotinoiden von Lösung 12, wie die Berechnung der Differenzkurve zeigt. Diese ergibt nämlich einen geradlinigen Verlauf, dessen Steilheit unterhalb 5100 Å.E. noch etwas zunimmt (Fig. 5). Die halb und ganz gefüllten Kreise in Fig. 10 stellen die Absorption von zwei weiteren Lösungen dar, die wiederum durch Blasen mit Luft hergestellt wurden, bei denen sich der Ch.-Niederschlag aber auch echt auflöste. Für die ganz gefüllten Kreise wurde mit ca. 10—15 Liter pro Minute, für die halb gefüllten Kreise mit 0,4 Liter pro Minute, geblasen. Da alle diese Messpunkte mit der Kurve 12 zusammenfallen¹⁾, und diese wieder, abgesehen vom Carotinoidgehalt, identisch mit 1 ist, können folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Das Durchblasen mit Luft verändert das Ch. genau so wenig wie das Durchblasen mit sauerstofffreiem Stickstoff.

2. Ob Luft oder Stickstoff, grosse oder kleine Gasgeschwindigkeit verwendet wurde, ist nicht entscheidend für die Erzeugung eines sich kolloidal wieder auflösenden Niederschlages.

3. Für die Gewinnung des unverletzten nativen Ch., sowie für das Mengenverhältnis der A- zur B-Komponente ist es gleichgültig, ob für die Pflanzenextraktion Äthylalkohol (Kurve 1), oder Methylalkohol (Kurve 12) verwendet wird.

Zum Schlusse sei noch auf das in allen Versuchen als unveränderlich gefundene Mengenverhältnis $A : B = 9 : 1$ aufmerksam gemacht. In der Pflanze beträgt dieses Verhältnis in der Regel ca. 3. Da Ch. A bekanntlich leichter löslich ist als Ch. B, ist die Zunahme des Quotienten bei nicht quantitativer Extraktion verständlich; dagegen ist die Konstanz dieses Verhältnisses in unseren Extrakten merkwürdig. Weder die Modifikation des

¹⁾ Die besonders empfindliche Stelle der Absorptionskurve zwischen ca. 5300 und 5400 Å.E. macht sich auch hier bemerkbar; denn dort zeigen die durch halb und ganz gefüllte Kreise dargestellten Messpunkte eine etwas grössere Absorption als Kurve 12. Ca. 24 Std. später aber zeigt auch die Absorption von Lösung 12 im selben Bereich der Wellenlänge eine ähnliche Veränderung.

Extraktionsverfahrens (z. B. Weglassen der Vorextraktion, Verwendung von Äthyl- oder Methylalkohol), noch irgendeine der andern Manipulationen ergab eine Abänderung des Quotienten. Es muss auf jeden Fall in Betracht gezogen werden, dass diese Konstanz, falls sie durch weitere Versuche erhärtet wird, etwas mit der chemischen Natur des nativen Ch. zu tun haben könnte, die hiernach beispielsweise in einer Bindung der A- mit der B-Komponente bestehen könnte. Um das Spektrum des nativen Ch. direkt mit dem einer Mischung der Reinpräparate im gleichen molaren Mischungsverhältnis 9 : 1 vergleichen zu können, ist in Fig. 2 eine solche Kurve (3a) eingezeichnet (um 40 Å.E. nach Rot verschoben).

VI. Ch. Absorptionsmessungen in unverletzten Blättern.

I. Einleitung.

Um die nativen Ch.-Lösungen mit dem Ch. in der Pflanze vergleichen zu können, wurde die Ch.-Absorption im Blatt direkt gemessen. Dazu wurde folgender Kunstgriff verwendet. Eine ganze Reihe von Pflanzen zeigt Abarten, deren Blätter helle, d. h. Ch.-freie Flecken zeigen. Unter der Voraussetzung, dass diese gelben Flecken das Licht in der gleichen Weise reflektieren und streuen wie die grünen Gebiete, muss sich durch Vergleichsmessungen die Ch.-Absorption quantitativ bestimmen lassen. Der gelbe Fleck entspricht dem Balyrohr mit dem Lösungsmittel, der grüne Fleck dem mit der Lösung. Wie exakt obige Voraussetzungen erfüllt werden können, können erst zukünftige Untersuchungen zeigen, für die von botanischer Seite möglichst günstige Pflanzen so ausgesucht oder gezüchtet werden müssten, dass die gelben und die grünen Stellen möglichst identische Zellstrukturen zeigen. Auch die Bildung von Stärke in den grünen Partien müsste verhindert werden, worauf mich in dankenswerter Weise Prof. GÄUMANN aufmerksam machte. In erster Näherung aber werden obige Voraussetzungen im allgemeinen zutreffen, womit wir uns für die folgenden Blattaufnahmen vorderhand begnügen wollen. Dies ist besonders deshalb angezeigt, weil sich die Blattspektren von den Ch.-Spektren in echter Lösung ausserordentlich stark unterscheiden, so dass die Unterschiede auf keinen Fall durch die oben genannten, prozentual stets kleinen Fehler verursacht werden können. Seine Bestätigung findet dieses Vorgehen weiter unten beim Vergleich der Blattspektren verschiedener Blätter einer Pflanze miteinander, sowie beim Vergleich der Spektren verschiedener Pflanzenarten.

Die Carotin- und Xantophyllabsorption fällt quantitativ heraus, sofern die gelben und grünen Stellen gleiche Konz. der gelben Farbstoffe enthalten, was durch Extraktion und Messung zu kontrollieren wäre. Da dies noch nicht gemacht wurde, dürfen die Blattspektren vorderhand nur in dem Bereich diskutiert werden, in dem die Carotinoidabsorption unwesentlich ist.

2. Experimentelles.

Die Messungen wurden an *Aucuba japonica* var. *variegata* und *Fatsia japonica*, *variegata* Form (auch *Aralia japonica* genannt) ausgeführt. Als gelbe und grüne Stellen wurden stets nur solche Partien desselben Blattes verwendet, welche wenige mm nebeneinander lagen. Versuche mit *Cladescantia* und Hafer (Lichtkeimlinge gegen Schattenkeimlinge) fielen negativ aus, da in diesen Pflanzen das Ch. so stark granuliert ist, dass die Ch.-haltigen Partien in der Durchsicht gar nicht grün, sondern quasi als Sieb mit weissen und schwarzen Stellen erscheinen.

Die in Kap. II besprochene Versuchsanordnung wurde zur Messung der Blattspektren wie folgt abgeändert. Mit der Lichtintensität muss sparsam umgegangen werden, da die Bestrahlung des Blattes nicht über die Intensität gehen darf, die das Ch. verändern würde, andererseits die Belichtungsdauer auch nicht ins Ungeheure gesteigert werden kann. Um die Verluste durch Streuung so niedrig wie möglich zu halten, wird die Lichtquelle auf das Blatt abgebildet, denn dann dürfen die austretenden Strahlen, wie bei einem Selbstleuchter, kontinuierlich über einen gewissen Winkelbereich verteilt sein, ohne dass sie wie z. B. bei einem parallelen Bündel für den Strahlengang verloren gehen. Vor dem Blatt befindet sich ein 7 cm dicker Absorptionstrog für die Wärmestrahlung, um Erhitzung des Blattes zu verhindern, die zur Bildung von Phäophytin Anlass gibt. Dieses erkennt man im Spektroskop auch visuell ohne weiteres an der im Grün sukzessiv neu entstehenden Absorptionsbande. Als sehr wirksames Wärmefilter wurde eine Lösung von 600 cm³ H₂O, 6 cm³ H₂SO₄, 150 g Mohr'sches Salz und 15 g NaHSO₄ verwendet, die unter Luftabschluss zu halten ist¹⁾. Nach dem Blatt folgt die Linse mit dem Sektor. Diese bildet zusammen mit einer zweiten Linse das Blatt scharf auf den Spalt ab. Die zweite Linse hat den Zweck, die Konvergenz der Strahlen zu erhöhen, um so eine bessere

¹⁾ Für die Angabe dieser Wärmefilterlösung bin ich Herrn Prof. E. Rüst zu Dank verpflichtet.

Ausnützung der Apertur des Spektrographen zu ermöglichen. Auch bei dieser Anordnung schwächt der Sektor wirklich die Intensität und verringert nicht etwa die Belichtungszeit durch Intermittenzen, denn bei langsamer Drehung des Sektors ist auf dem Spektrographenspalt kein wandernder Schatten, sondern nur ein unveränderlicher Lichtfleck sichtbar. Da bei dieser Anordnung das Blatt scharf auf den Spalt und die photographische Platte abgebildet wird, würden die Blattstrukturen als bei der Ausmessung störende Horizontalstreifen in den Spektren erscheinen. Um dies zu verhindern, wird das Blatt während der Aufnahme bewegt. Gehaltert zwischen zwei Glasplatten, wird es in einem Vertikalschlitten durch einen Exzenter etwa 60 mal in der Minute auf und ab bewegt. Die Hubhöhe war einstellbar und betrug ca. 1—4 mm. Vor den Aufnahmen wurde das Spektrum stets visuell kontrolliert, um durch Verschiebungen des Blattes und Veränderungen der Hubhöhe möglichst homogene Spektren zu erzielen. In der gleichen Weise wie für die Lösungen (siehe Kap. II) wurde auch hier die Homogenität der Blattspektren, sowie des freien Strahlenganges kontrolliert und als genügend befunden. So gelingt es mit Blattflecken von 2 mm Grösse schon gut zu arbeiten. Der Blatthalter war auf einen Horizontalschlitten mit Mikrometerschraube montiert. Abwechslungsweise wurde durch eine grüne, resp. gelbe Stelle des Blattes exponiert. Für die verschiedenen Punkte einer Kurve müssen natürlich immer wieder genau dieselben Partien des Blattes eingestellt werden, was mit Hilfe der Mikrometerschraube auf 0,001 mm möglich war. Da für ein Blatt die Schichtdicke und Konz. fest ist, wurde J_0/J variiert durch Verwendung eines Sektorensatzes ($\frac{1}{2}$, $\frac{3}{8}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{3}{16}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{3}{32}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$). Für die grössten Werte von ε , das heisst die kleinsten Sektoren, ergaben sich derart grosse Belichtungszeiten (mehrere Stunden), dass, um Zeit zu ersparen, die Methode von HENRI angewendet wurde. Um hierfür den Schwarzschild-Exponenten (p) zu ermitteln, wurden mit der Henri-Methode auch Punkte in dem Gebiet bestimmt, das bereits mit den Sektoren ausgemessen war. So konnte in einfacher Weise die Vertikalverschiebung ($\log p$) ermittelt werden, die nötig war, um „Sektor“- und „Henri“-Punkte im gemeinsamen Gebiet auf die gleiche Kurve zu bringen. Eine Wellenlängenabhängigkeit von p war nicht festzustellen. Für die verwendeten Platten (Ilford Hypersensitive Panchromatic) ergab sich $\log p = 0,150$ (besser geeignet wegen ihrer höheren Empfindlichkeit im Rot waren Agfa Spektral-Rot Rapid-Platten, die aber wegen der langen Lieferfristen nicht mehr zur eigentlichen Verwendung gelangten).

Durch Verwendung von Sektoren, sowohl bei der Aufnahme der „Lösung“, als auch des „Lösungsmittels“, wurden die Abstufungen noch verfeinert. Um die Messpunkte noch dichter aneinander legen zu können, wurden 3 Grauplatten mit den Extinktionen (Absorption plus Reflektion) 0,043, 0,079 und 0,100 hergestellt. Diese konnten einzeln oder aber auch je zwei zusammen, eingeschaltet werden, so dass im ungünstigsten Fall noch Abstufung des ε von 10 zu 10% möglich war. Die Lichtabschwächung dieser Platten wurde mit dem lichtelektrischen Verfahren¹⁾ gemessen. Sie war innerhalb der Messgenauigkeit wellenlängenunabhängig. Platte Nummer 1 war sauberes Glas, Nummer 2 eine unbelichtete, ausfixierte, photographische Platte, Nummer 3 war eine sehr schwach geschwärzte photographische Platte. Die Fehler in den Extinktionsmessungen (Nummer 1: 6%, Nummer 2: 3%, Nummer 3: 4%) machen nichts aus, da die Extinktion der Sektoren immer noch additiv dazu kommt. Diese betrug im Minimum 0,2.

3. Resultate.

Kurve 13 (Fig. 11a) stellt die Absorption von Aucuba dar. Zwei verschiedene Blätter (siehe Fig. 11a) ergeben innerhalb der

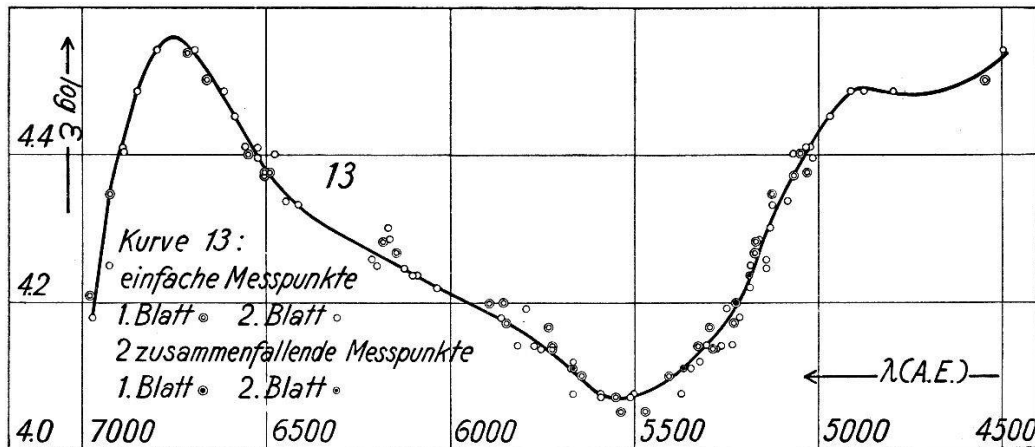


Fig. 11a.

Chlorophyll-Absorption im unverletzten Laubblatt von Aucuba.

Messfehler dieselbe Kurve. Mit jedem Blatt wurde 3 Tage lang nach dem Abschneiden von der Pflanze gearbeitet. Aufnahmen von gleichen Messpunkten zu Anfang und Ende dieser Zeit zeigten, dass sich das Ch. während der Messungen nicht verändert hat.

Kurve 14 (Fig. 11b) und Kurve 15 (Fig. 11c) stellen die Absorptionskurven für Fatsia dar. Bei den grünen Zonen lassen

¹⁾ G. KORTÜM und H. v. HALBAN, Z. Phys. Ch. A **170**, 212, 1934.

sich hier halb- und voll-grüne Parteien unterscheiden. Die Absorption der ersteren wird durch Kurve 14, der letzteren durch

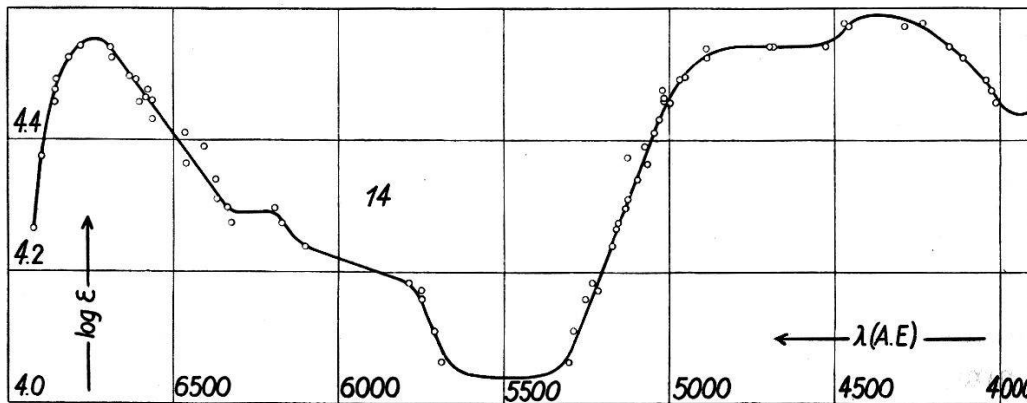


Fig. 11b.

Chlorophyll-Absorption im unverletzten Laubblatt von Fatsia; halbgrüne Parteien.

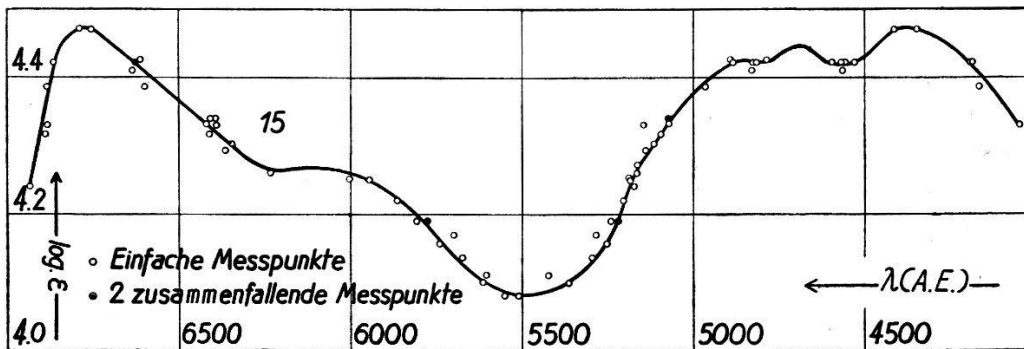


Fig. 11c.

Chlorophyll-Absorption im unverletzten Laubblatt von Fatsia; vollgrüne Parteien.

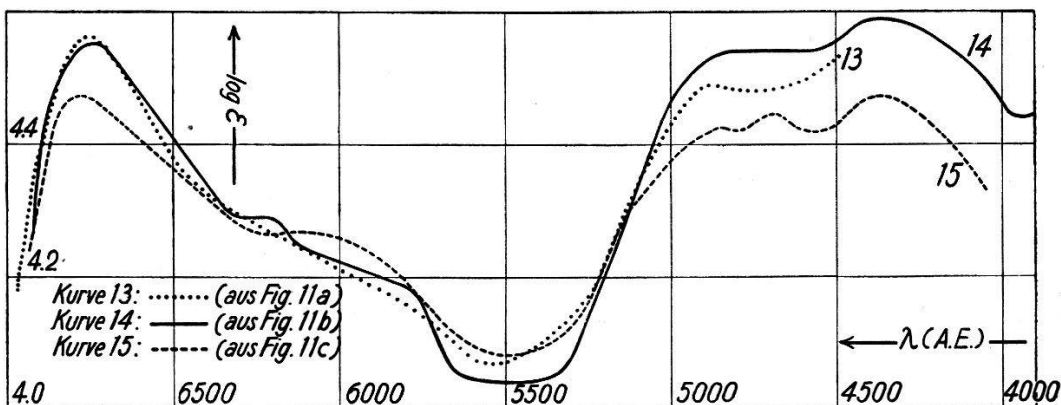


Fig. 11d.

Chlorophyll-Absorption in unverletzten Laubblättern: Kurve 13 Aucuba; Kurve 14 Fatsia, halbgrüne Parteien; Kurve 15 Fatsia, vollgrüne Parteien.

Kurve 15 dargestellt. Beide Blätter wurden je zwei Tage benützt und die Unversehrtheit des Ch. wie oben geprüft. In Fig. 11d

sind die drei Kurven zugleich ohne Angabe der Messpunkte dargestellt. 13 und 14 weichen maximal 15% voneinander ab. Zwischen allen dreien sind die grössten Unterschiede 25% in ϵ . Von einer mittleren Kurve betragen die maximalen Abweichungen 15%. Da die drei Kurven herunter bis zu 5000 Å.E. einander recht ähnlich sind, scheint sich die Carotinoid-Absorption so ziemlich herausgehoben zu haben, das heisst die Konz. der gelben Farbstoffe ist in den gelben und grünen Partien ungefähr dieselbe. Es wäre in der Tat etwas unwahrscheinlich, annehmen zu wollen, für alle drei Kurven habe sich der Carotinoidgehalt der gelben und grünen Stellen gerade um den gleichen Faktor unterschieden.

Wie zu erwarten war, streuen die Messpunkte bei den Blattspektren ganz wesentlich mehr, als bei den Lösungen. Denkt man nun auch noch an die in der Einleitung dieses Kap. gemachten Voraussetzungen, so wird man den Abweichungen, die die Blattspektren untereinander zeigen, kein grosses Gewicht beilegen. Erst auf Grund wesentlich verbesserter Messungen dürfte man hier weitergehende Schlüsse ziehen. Dagegen ist der grosse Unterschied gegenüber dem echt gelösten, nativen Ch. sicher reell. Das Maximum im Rot zeigt im Blattspektrum nur einen dreimal grösseren Extinktionskoeffizienten als das Minimum im Grün. Für das native, echt gelöste Ch. beträgt dieser Faktor dagegen 20. Ausserdem ist sein Maximum im Rot um 120 Å.E., sein Minimum im Grün um 350 Å.E. gegenüber dem Blattspektrum nach Violett verschoben. Ob diese Unterschiede im Spektrum chemischen, oder nur physikalischen Zustandsänderungen entsprechen, soll das nächste Kap. zeigen.

V. M. ALBERS und H. V. KNORR¹⁾ haben Absorptionsspektren von einzelnen Chloroplasten gemessen, allerdings nur im Bereich von 6640—7040 Å.E. Die Konz. ist nicht bekannt. Aus ihren Kurven lässt sich daher nur $(\log \epsilon)$ plus Konstante errechnen. Da zudem die veröffentlichten Kurven grosse Verschiedenheiten zeigen, und sich nur über ein Gebiet von ca. 400 Å.E. erstrecken, führt der Vergleich mit unserem Blattspektrum zu keinem Resultat. Jede der Kurven enthält in ihren Ordinaten eine spezielle, unbekannt additive Konstante, so dass schon erheblich längere Kurvenstücke notwendig wären, um mit Sicherheit von einer wesentlichen Übereinstimmung oder Verschiedenheit gegenüber unseren Kurven sprechen zu können.

¹⁾ V. M. ALBERS und H. V. KNORR, *Plant Physiology* **12**, 833, 1937.

VII. Kolloidale, native Ch.-Lösungen und ihr Vergleich mit den Blattspektren.

Untersuchungen in dieser Richtung finden sich schon in älteren Arbeiten (IWANOWSKI¹), HERLITZKA²). Auch WILLSTÄTTER und STOLL (loc. cit.), B. HUBERT (loc. cit.) und WAKKIE³) beschäftigten sich damit. Es handelt sich aber nirgends um quantitative Messungen der Absorption, sondern im wesentlichen nur um die Bestimmung der Wellenlängen maximaler Absorption. IWANOWSKI, der zwar $\log J_0/J$ in Funktion von λ für Blätter gemessen hat, berücksichtigt in keiner Weise Streuung und Reflexion an den Blättern (siehe Kap. II), so dass seine Messungen unbrauchbar sind. Nicht berücksichtigte Reflexion entspricht einem Fehler von J_0/J . Streuung und Reflexion würden seine Blattspektren in der logarithmischen Darstellung verzerren. Er trägt daher ganz richtig die Extinktion selbst auf, vergleicht sie mit der Extinktion von Ch.-Suspensionen und findet eine Parallelkurve. Da aber bei seinen beiden Spektren sowohl die Maxima als auch die Minima je bei derselben Wellenlänge liegen, und er das Konzentrationsverhältnis nicht kennt, so lässt sich stets eine derartige Konzentration der Suspension aussuchen, für die die beiden Kurven parallel laufen. Aus diesem nach Wunsch herstellbaren Parallelverlauf darf man natürlich keine Schlüsse ziehen. Dass eine gewaltige Streuung und Reflexion überlagert ist, sieht man aus folgenden Zahlen. Der Quotient aus der Extinktion im Maximum und Minimum der Blattkurve beträgt bei uns 3,1 (Kurve 13), bei IWANOWSKI aber nur 1,36. Stellt man diesen Unterschied als Einfluss von Reflexion und Streuung dar, so muss bei IWANOWSKI $r + s$ (siehe Kap. II) im Minimum der Absorption 4,9, im Maximum der Absorption noch 1,6mal grösser als ε gewesen sein.

Setzt man einer alkoholischen, nativen Ch.-Lösung (Kurve 1) Wasser zu, so wird sie bekanntlich kolloidal⁴). Damit ist aber noch nichts über die Teilchenstruktur dieser sogenannten „kolloidalen“ Ch.-Lösungen ausgesagt. Man muss sich davor hüten, nun von vornherein kompakte Ch.-Körperchen im Sinne der Teilchen z. B. eines Goldkolloides anzunehmen. Viel eher müsste man in Betracht ziehen, dass die Kolloidteilchen eine innere

¹) D. IWANOWSKI, loc. cit.; sowie Biochem. Zeitschr. **48**, 328, 1913.

²) A. HERLITZKA, Biochem. Zeitschr. **38**, 321, 1912.

³) J. G. WAKKIE, Proceedings Amsterdam **38**, 1082, 1935.

⁴) Nach P. KARRER und W. STRAUS (loc. cit.) ist es möglich, dass hierbei auch das mitgeführte Carotin kolloidal wird, und sich dessen Absorptionsmaximum bei ca. 4800 Å.E. bis zu maximal 500 Å.E. gegen längere Wellen verschiebt. Diese Verschiebung ist umso grösser, je grösser dispers das Carotin ist.

Struktur zeigen, etwa im Sinne der Vorstellungen, wie sie FREY-WYSSLING für den Aufbau der Ch.-Körner in den Pflanzen vertritt¹⁾. Der Dispersionsgrad solcher durch Wasserzusatz hergestellter Kolloide hängt bei konstanter Ch.-Konzentration der Ausgangslösung von der Wassermenge und der Art des Hinzufügens ab. Folgende zwei Kolloide liessen sich reproduzierbar herstellen: 3 Volumenteile Wasser, rasch zu einem Volumenteil

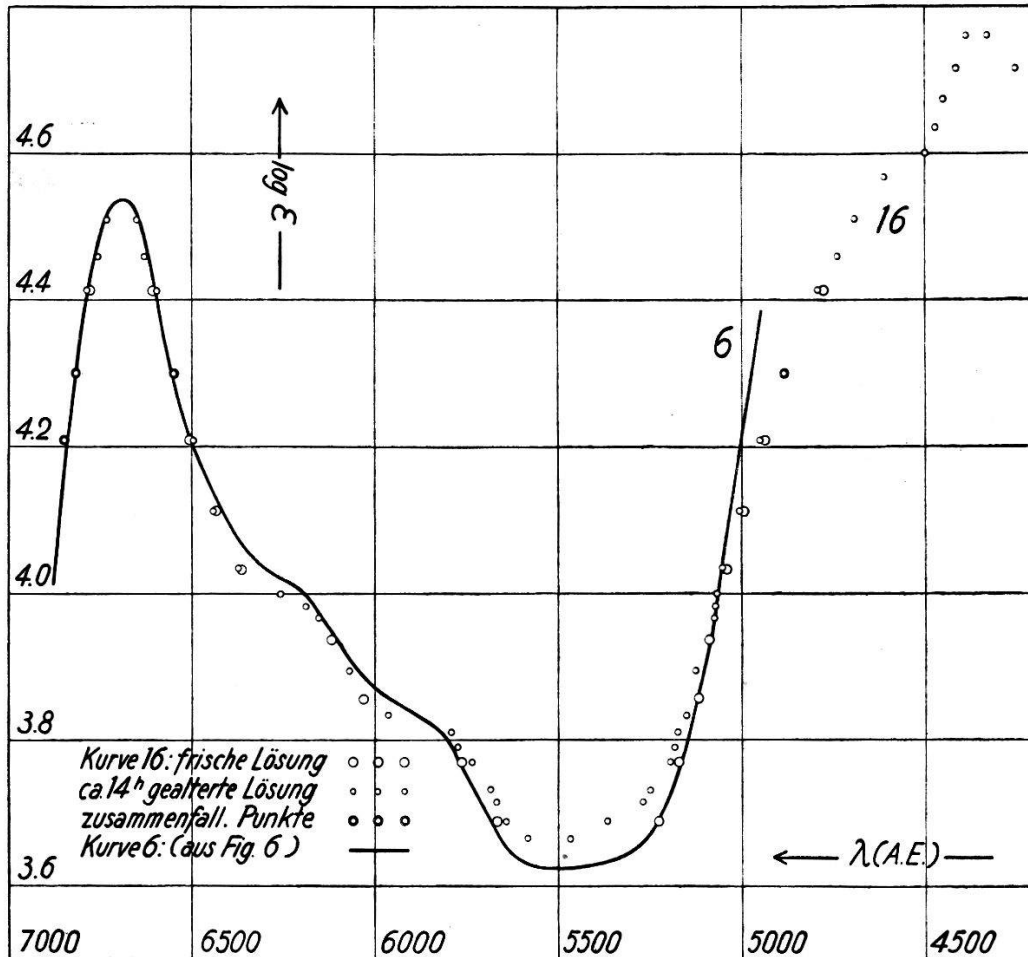


Fig. 12.

Absorption kolloidaler Chlorophyllösungen: Kurve 16 wässrige Lösung; Kurve 6 alkoholische Lösung.

Lösung gegossen, geben eine kolloidale Lösung, die von Auge klar durchsichtig, ohne jede Trübung, erscheint und nicht absetzt. Sie fluoresziert nicht mehr, zeigt aber starkes, vollständig polarisiertes Tyndall-Licht. Mit Hilfe von Membran- und Cella-Filtern geeichter Porenweite ergeben sich Teilchengrößen von 0,5 bis 3μ Durchmesser²⁾. So grosse Teilchen ohne Trübung sind nur verständlich

¹⁾ A. FREY-WYSSLING, Der Aufbau der Chlorophyllkörner, Sammelreferat; *Protoplasma* **29**, 279, 1938.

²⁾ Die Filtrationen wurden mit freundlicher Erlaubnis von Herrn Prof. PALLMANN und Unterstützung von Herrn Dr. SCHINDLER im Agrikulturchem. Institut der Eidgen. Techn. Hochschule Zürich ausgeführt.

unter der Annahme, dass sie zum grössten Teil aus Lösungsmittel bestehen (Näheres siehe weiter unten). Die echten Ch.-Lösungen passieren auch die feinsten Ultrafeinfilter, sie zeigen vollständig depolarisiertes, rotes Fluoreszenzlicht und keinen Tyndallkegel. Dies wurde mit Hilfe von Polaroid-Filtern einerseits und Rot absorbierenden Filtern andererseits festgestellt. In Fig. 12 ist die Absorption des Kolloids mit der Wiedergabe der Messpunkte als Kurve 16 zusammen mit Kurve 6 dargestellt. *Für λ grösser als 5060 Å.E. ergibt sich weitgehende Übereinstimmung.* Kurve 6 musste um 120 Å.E. nach Rot verschoben werden, um diese Übereinstimmung zu erzielen, was mit der Verschiedenheit der Lösungsmittel zu erklären ist (6 enthält reinen Äthylalkohol, 16 dagegen 75% Wasser und 25% Äthylalkohol). Die grossen Kreise entsprechen dem ganz frischen Kolloid, die kleinen dem um 14 Stunden gealterten. (Kleine Abweichungen im Grün zeigt wohl das gealterte, aber augenscheinlich nicht das frische Kolloid.) Man geht wohl nicht fehl, aus dieser Übereinstimmung zu schliessen, *dass Kurve 6 und 9, wie bereits in Kap. IV bemerkt wurde, als kolloidale alkoholische Lösungen anzusehen sind,* was noch dadurch bekräftigt wird, dass Kurve 6 durch Überführung in P.Ä. und Rückführung in Äthylalkohol wieder in den Typ der Kurve 1 (echt gelöstes Ch.) zurückverwandelt werden konnte (siehe Kap. IV)¹⁾ Besonders hervorgehoben sei, *dass diese kolloidalen alkoholischen Ch.-Lösungen fluoreszieren.*

Das zweite Kolloid wurde folgendermassen hergestellt: Ein Volumenteil Lösung wird rasch mit 0,6 Teilen Wasser gut durchgemischt, dann wurden sukzessive weitere 6,4 Teile Wasser hinzugefügt. Dies ergibt eine opaleszierende, getrübte, kolloidale Lösung, die nicht absetzt, keine Fluoreszenz zeigt, wohl aber sehr starkes polarisiertes Tyndall-Licht. Die Grösse der Teilchen²⁾ liegt zwischen 1 und 3μ . Im Ultramikroskop zeigen sie viel grössere Intensität des gebeugten Lichtes als die Teilchen von Lösung 16. Kurve 17 (Fig. 13) zeigt die Absorption dieser Lösung. *Kurve 17 verläuft wesentlich anders als Kurve 16;* dass der Unterschied auf keinen Fall nur in der verschieden starken Streuung durch die beiden Kolloide liegt, wird weiter unten gezeigt.

¹⁾ Diese Übereinstimmung zeigt ferner, dass keine irgendwie „störende langwellige Carotinabsorption“ auftritt (siehe Anmerkung 4 Seite 379). Da auch das Ch. in kolloidaler, wässriger Lösung eine Rotverschiebung des Spektrums zeigt und zudem in diesen Lösungen nur noch $\frac{1}{10}$ des natürlichen Carotinoidgehaltes vorhanden ist (siehe Seite 369 Anmerkung 1), ist das nicht weiter erstaunlich. Gerade dort wo Maxima der langwelligen Carotinabsorption auftreten würden (5100—5350 Å.E.) liegen ungefähr die Absorptionsminima unserer Spektren!

²⁾ Durch Filtration gemessen wie bei Lösung 16.

Nach R. ZSIGMONDY¹⁾ lassen sich die experimentell gefundenen Eigenschaften der beiden untersuchten Kolloide durch folgendes, aus andern Fällen bekanntes Modell darstellen: Wir gehen von Ch.-Primärpartikeln²⁾ aus, die so klein sind (Durchmesser ≈ 100 Å.E.), dass sie noch keine Trübung der Lösung hervorrufen. Solche Teilchen müssen in Lösung 16 vorliegen, da sie ja klar durchsichtig ist. Diese Primärteilchen sind dort in Gebilden von ca. 2μ Durchmesser vereinigt, deren Existenz wir durch Filtration nachgewiesen haben, und die wir „Sekundärteilchen“ nennen wollen. Diese Sekundärteilchen müssen zum weitaus

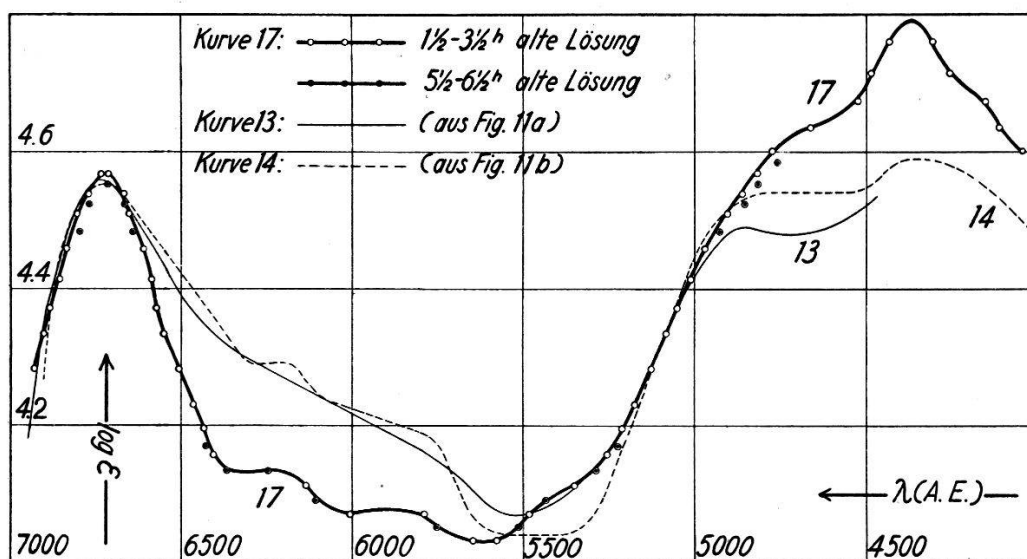


Fig. 13.

Kurve 17: Absorption einer kolloidalen wässrigen Chlorophylllösung. Kurven 13, resp. 14 (aus Fig. 11a resp. 11b): Chlorophyllabsorption in unverletzten Laubblättern von Aucuba resp. Fatsia.

grössten Teil aus Lösungsmittel bestehen, und dürfen keine dichten Agglomerationen von Primärteilchen enthalten, da sie ja die Lösung nicht sichtbar zu trüben vermögen. Die Sekundärteilchen sind auch unter dem Mikroskop nicht zu sehen, wohl aber im Ultramikroskop. Dass so grosse Teilchen nicht absetzen, findet seine Erklärung darin, dass Ch. eine Dichte von 1,11 hat³⁾.

In Lösung 17 dagegen müssen die Primärteilchen innerhalb der wiederum ca. 2μ grossen Sekundärteilchen viel dichter gepackt vorliegen, da ja die Lösung getrübt erscheint, und die einzelnen Sekundärteilchen im Mikroskop sichtbar werden. Auch die viel

¹⁾ R. ZSIGMONDY, Kolloidchemie, allgemeiner Teil, bei Spamer, Leipzig, 1925, Abschnitt Strukturlehre.

²⁾ Die innere Struktur der Primärteilchen wollen wir vorderhand völlig offen lassen.

³⁾ J. A. A. KETELAAR und E. A. HANSON, Nature **140**, 196, 1937.

grössere Helligkeit, die die Sekundärteilchen von Lösung 17 im Vergleich zu Lösung 16 im Ultramikroskop zeigen, entspricht einer stärkeren „Füllung“ der Sekundärteilchen mit Primärteilchen.

Die Spektren 6, 9 und 16 würden nach dieser Vorstellung den kleinen, noch praktisch isolierten Ch.-Primärteilchen entsprechen, die sich in diesem Falle gegenseitig nicht optisch beeinflussen. Die Kurve 17 aber entspricht den dichter gepackten, sich bereits gegenseitig optisch beeinflussenden Primärteilchen.

Kurve 17 zeigt grosse Ähnlichkeit mit den Blattspektren, wie man an Hand der zum Vergleich eingezeichneten Kurven 13 und 14 sieht. Diese sind hierfür um 20 Å.E. nach Violett verschoben worden (diese 20 Å.E. rühren von den 12,5% Alkohol her, die 17 noch enthält, grössere Unterschiede im Alkoholgehalt gaben auch grössere Verschiebungen). Bei Kurve 15 ist die Ähnlichkeit etwas geringer.

Da die Übereinstimmung bis zu $\lambda \geq 4900$ Å.E. gilt, nachher aber das Kolloid die stärkere Absorption zeigt als das Blatt, liegt ein neuer Hinweis dafür vor, dass bei der Messung der Blattspektren die Carotinoidabsorption ungefähr richtig eliminiert wurde. Die Hauptunterschiede zwischen Kolloid und Blatt liegen zwischen 5600 und 6600 Å.E. Die Extinktion des Blattes ist dort um etwa 40% grösser. Wie sich aus der oben beschriebenen Umsetzung des nativen Ch. in das bekannte Ch. ergibt, enthalten alle unsere Lösungen Ch. A und Ch. B im Verhältnis 9:1. Da der Gehalt der Pflanzen an Ch. B¹⁾ bekanntlich wesentlich grösser ist als $\frac{1}{10}$, so könnte der Unterschied zwischen 5600 und 6600 Å.E. lediglich durch das andere Komponentenverhältnis verursacht sein, denn die Reinpräparate zeigen für Ch. B im fraglichen Gebiete höhere Absorption als für Ch. A.

Zieht man auch noch die Abweichungen der verschiedenen Blattspektren untereinander in Betracht, so wird man zu dem Schluss kommen, *dass Kolloid und Blatt, so genau man es eben auf Grund der bis anhin ausgeführten Messungen beurteilen kann, dasselbe Spektrum haben*²⁾. Die Genauigkeit des Vergleiches ist hier sehr viel geringer als bei den echten Lösungen. Beispielsweise würden Unterschiede von der Grösse, wie sie zwischen nativem

¹⁾ R. WILLSTÄTTER und A. STOLL, loc. cit.; H. FISCHER und A. LIEB, Ann. d. Ch. **498**, 228, 1932; A. SEYBOLD und K. EGGLE, Planta **26**, 491, 1937.

²⁾ Auf Grund dieser Identifikation der Blattspektren mit Kurve 17 wurden die gemessenen Blatt-Extinktionen in Extinktionskoeffizienten umgerechnet. (Die Zulässigkeit dieser Identifikation findet in Kap. VIII ihre Bestätigung.) Siehe auch Kap. II.

und gewöhnlichem Ch. gefunden wurden, hier bereits an der Grenze der Messgenauigkeit liegen.

In bezug auf die Fehler, welche durch die Lichtstreuung an den Kolloidteilchen hervorgerufen werden (siehe Kap. II), ist folgendes zu bemerken:

1. Für Lösung 16, die ja klar durchsichtig erscheint, soll die Streuung vernachlässigt werden.

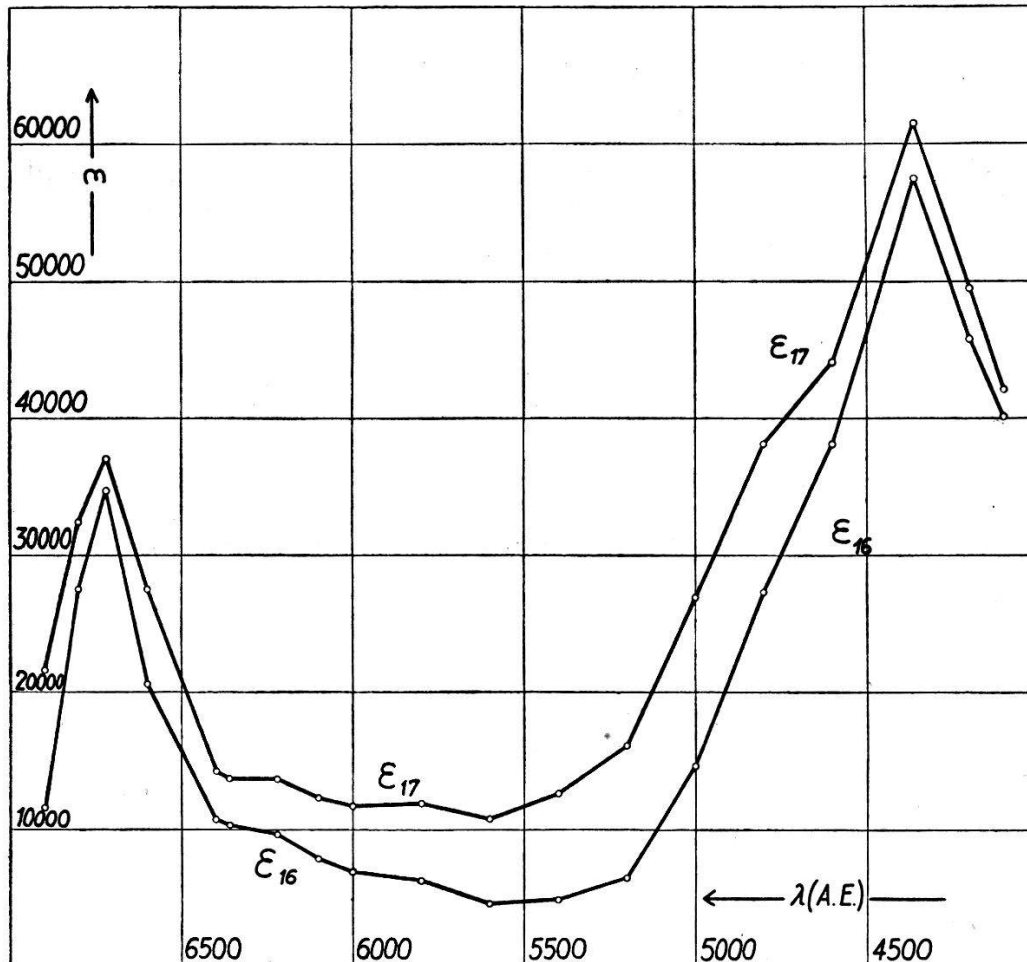


Fig. 14.

Extinktionskoeffizienten ϵ_{16} und ϵ_{17} der beiden kolloidalen Chlorophyllösungen 16 und 17. (Es sind nur eine beschränkte Zahl von charakteristischen Punkten aus den logarithmischen Kurven 16 und 17 entnommen und gradlinig verbunden worden.)

2. Lösung 17 dagegen ist trüb und streut somit schon beträchtlich. Es muss daher die Frage aufgeworfen werden, ob die Unterschiede gegen 16 vielleicht bloss durch die Streuung verursacht werden könnten. Um dies zu untersuchen, wird für Kurve 16 und 17 statt $\log \epsilon$ einmal ϵ selbst aufgetragen. Dies ist hier möglich, da 16 und 17 aus der selben Ausgangslösung hergestellt wurden, und somit das Konz.-Verhältnis bekannt ist. Nach

Kap. II müsste sich die Wirkung der Streuung in einer vertikalen Parallelverschiebung der Kurven gegeneinander zu erkennen geben. Fig. 14 aber zeigt, dass die beiden Kurven absolut nicht parallel verlaufen, womit bewiesen ist, dass zum mindesten nicht die Streuung allein für den Unterschied zwischen 16 und 17 verantwortlich ist¹⁾).

Es muss noch festgestellt werden, ob auch bei der Berücksichtigung der Streuung der Vergleich der Blattspektren mit 17 zulässig ist. Für die Blätter soll durch Vergleich mit den gelben Flecken die Streuung und Reflexion kompensiert werden, natürlich ausgenommen die Streuung an den Ch.-Partikeln selbst. Da bei 17 auch nur die Streuung an den Ch.-Partikeln der Absorption überlagert wird, ist der Vergleich korrekt.

Da sich in Lösung 17 nun also ein physikalischer Verteilungszustand des nativen Ch. gefunden hat, in dem dieses innerhalb unserer Messgenauigkeit dasselbe Spektrum zeigt wie das Blatt, kommt man zu dem Resultat, *dass sich spektrometrisch kein chemischer Unterschied zwischen dem nativen Ch. und dem Ch. im Blatt feststellen lässt.*

VIII. Der physikalische Verteilungszustand des Ch. in der Pflanze.

Da wir in Lösung 17 eine Ch.-Verteilung gefunden haben, die dasselbe Absorptions-Spektrum liefert wie das Blatt, liegt es nahe anzunehmen, der physikalische Verteilungszustand sei in beiden Fällen derselbe. Diese Annahme zu beweisen, soll im folgenden versucht werden:

1. Aus dem voneinander verschiedenen Verlauf von Kurve 16 und 17 geht hervor, dass das Spektrum der kolloidalen Lösungen sehr empfindlich darauf ist, wie dicht gepackt die Ch.-Primärpartikel in den Sekundärteilchen vorliegen. Wenn daher zwei kolloidale Ch.-Lösungen dasselbe Spektrum zeigen, so müssen die lokalen Ch.-Konz. in beiden Fällen gleich gross sein, oder anders ausgedrückt, die unmittelbare Umgebung des einzelnen Ch.-Moleküls muss in beiden Fällen gleich aussehen.

Aus der Übereinstimmung der Spektren von Blatt und Lösung 17 folgt also *Übereinstimmung in den lokalen Ch.-Konz.*

2. Um nun auch etwas über die mittleren Ch.-Konz. aussagen zu können, ist es notwendig, die im Blatt vorkommenden Strukturelemente des Ch. zu betrachten. In der Pflanze liegt das Ch. in Form von sog. Grana vor, die im Chloroplasten in

¹⁾ 16 ist um 30 Å.E. nach Rot verschoben eingetragen; Ursache: verschiedener Alkoholgehalt, Lösung 16 enthält 25%, Lösung 17 nur 12,5% Alkohol.

anderen Substanzen eingebettet liegen¹⁾. Diese Grana sind scheibenförmig und haben einen Durchmesser von der Grössenordnung $0,5\mu$. Sie müssen nun wiederum eine submikroskopische Struktur besitzen, da sie ausser Ch. noch andere Substanzen enthalten¹⁾.

Die Sekundärteilchen des Kolloids 17 zeigen im Mikroskop einen kleinen dunklen Kern und eine helle Hülle²⁾.

Will man nun eine Analogie zwischen Kolloid und Blatt aufstellen, so ist es wohl am nächstliegenden, den Kern eines Sekundärteilchens mit einem Granum analog zu setzen. Das Sekundärteilchen als Ganzes würde also einem Granum + dessen Ch.-freier Umgebung entsprechen. Der Chloroplast der Pflanzenzelle wäre in diesem Bilde das Analogon zu so vielen aneinander gelagerten Sekundärteilchen, wie Grana im Chloroplasten vorhanden sind.

Wenn diese Identifikationen vernünftig sind, würde unser Kolloid ein Modell der räumlichen Ch.-Verteilung in der Pflanze darstellen. Dass die *lokale Ch.-Konz.* im Granum einerseits und im Kern des Sekundärteilchens andererseits gleich sein muss, konnten wir aus der Übereinstimmung der Spektren schliessen. Würde es nun auch noch gelingen, die *Gleichheit der mittleren Konz.* des Ch. im ganzen Chloroplasten einerseits und im ganzen Sekundärteilchen andererseits nachzuweisen, so würde aus der *Übereinstimmung von lokaler und mittlerer Konz.* vollständige Analogie der Ch.-Anordnung im Chloroplasten und Sekundärteilchen folgen.

Falls also Chloroplasten und Sekundärteilchen wirklich auch gleiche mittlere Ch.-Konz. besitzen, so sind wir berechtigt, die innere Struktur unserer Sekundärteilchen als getreues Abbild der räumlichen Ch.-Anordnung in den Chloroplasten, resp. Grana zu betrachten.

Durch Messung der mittleren Ch.-Konz. in den Sekundärteilchen und den Chloroplasten soll nun unsere Hypothese auf ihre Richtigkeit geprüft werden.

1. Bestimmung der Ch.-Konz. in den Sekundärteilchen: Aus ϵ , d und $\log J_0/J$ lässt sich die Konz. der kolloidalen Ch.-Lösung berechnen. Um hieraus die Konz. in den Sekundärteilchen zu bestimmen, ist es notwendig, den von ihnen erfüllten Bruchteil des Volumens der Lösung zu berechnen. Hierfür ist es aber nur erforderlich, Volumen und Zahl der Sekundärteilchen zu kennen.

¹⁾ Siehe z. B. A. FREY-WYSSLING, loc. cit.

²⁾ Im Mikroskop scheinen die Sekundärteilchen 1μ gross, solange sie suspendiert sind; 2μ gross, wenn die Lösung eingetrocknet ist. Die Filtration ergab, wie schon erwähnt, 2μ .

Das Volumen ergibt sich aus dem durch Filtration bereits bestimmten, mittleren Durchmesser von 2μ . Die Zählung der Teilchen wurde unter dem Mikroskop in einer Blutkörperchen-Zählkammer durchgeführt. Die Resultate dieser Messungen sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3.

Konzentration des Ch. bezogen auf Volumen der Lösung	$c = \frac{\log J_0/J}{\varepsilon \cdot d} = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/L.}$
Volumen eines Sekundärteilchens*)	$v = \frac{4}{3} \cdot r^3 \cdot \pi = 4,2 \cdot 10^{-15} \text{ Liter}$
Zahl der Sekundärteilchen im Liter	$Z = 2,2 \cdot 10^{10} \text{ Sekundärteilchen/Liter}$
Gesamtvolumen der Sekundärteilchen im Liter	$V = Z \cdot v = 9,2 \cdot 10^{-5} \text{ L./L.}$
Konzentration des Ch. bezogen auf das Volumen der Sekundärteilchen	$C = c/V = 0,13 \text{ Mol/Liter}$

*) r = Radius des Sekundärteilchens.

2. Bestimmung der Ch.-Konz. in den Chloroplasten: Aus ε und $\log J_0/J$ ergibt sich für die Blätter das Produkt von c und d , woraus sich mit Hilfe des Molekulargewichtes der Ch.-Gehalt in mg pro m^2 Blattfläche angeben lässt. Diese Grösse schwankt nicht nur von einer Pflanzensorte zur andern, sondern auch innerhalb eines Blattes in einem gewissen Bereich. Eine Kontrolle der so bestimmten Ch.-gehalte von Blättern liesse sich durch quantitative Extraktion und Bestimmung des Ch. in der Lösung durchführen. Hierauf haben wir verzichtet. Dagegen liegen unsere Werte (siehe Tabelle 4) im Bereich normaler Ch.-Gehalte von Laub-

Tabelle 4.¹⁾

Verwendete Pflanze	$c \cdot d = \frac{\log J_0/J}{\varepsilon}$ in cm · (Mol/L.)	umgerechnet in mg pro m^2 Blattfläche	Dicke des Blattes d in cm	Konz. im Blatt-Volumen Mol/L. c	Vo- lumen- ver- hältnis q^*	Konz. im Chloroplasten $C = \frac{c}{q} \text{ Mol/L.}$
<i>Aucuba</i>	$3,6-4,7 \cdot 10^{-5}$	330—420	0,025	$1,5-1,9 \cdot 10^{-3}$	$1/43$	0,062—0,080
<i>Fatsia</i> Vollgrüne Partien	$2,8-4,1 \cdot 10^{-5}$	250—370	0,0265	$1,0-1,5 \cdot 10^{-3}$	$1/28$	0,040—0,059
<i>Fatsia</i> Halbgrüne Partien	$1,7-2,1 \cdot 10^{-5}$	160—190	0,024	$0,73-0,89 \cdot 10^{-3}$	$1/71$	0,051—0,063

*) $q = \frac{\text{Volumen der Chloroplasten}}{\text{Volumen des Blattes}}$

1) Die Werte sind mit einer Dezimale mehr gerechnet und dann abgerundet.

blättern, wie folgende Zahlen zeigen: Tabakblätter (Ammerforter) enthalten 120—250 mg pro m² ¹⁾. Für *Phaseolus multiflorus* wurde 460—530 mg pro m² gefunden²⁾.

Misst man noch die Dicke der Blätter, so kann man die Konz. des Ch., bezogen auf das Volumen des Blattes, berechnen. Wird nun noch der Bruchteil des Blattvolumens, der vom Chloroplasten erfüllt ist, bestimmt, so lässt sich auch die Ch.-Konz. im Chloroplasten angeben. Zu diesem Zwecke wurden Zellen und Chloroplasten unter dem Mikroskop ausgemessen, und die Zahl der Chloroplasten in der Zelle bestimmt³⁾. Hieraus lässt sich der Quotient aus Zell- und Chloroplastenvolumen berechnen. Da aber nicht alle Zellen Ch. führen, musste nun noch der Bruchteil des Blattquerschnittes bestimmt werden, der aus Ch.-führenden Zellen besteht. Aus den beiden Grössen zusammen ergibt sich der Anteil der Chloroplasten am Blattvolumen. Sehr genau ist die Bestimmung dieses Anteils natürlich nicht, besonders den mit Ch.-führenden Zellen erfüllten Bruchteil des Blattes kann man in der Regel nur roh festlegen. Eine Ausnahme bilden die halbgrünen Partien von *Fatsia*, in denen nur die Pallisadenzellen, also eine einzige, wohldefinierte Zellschicht, Ch. führt. Die Bestimmung des Anteils der Chloroplasten am Blattvolumen ist in diesem Falle weitaus am genauesten. Tab. 4 gibt die Resultate dieser Messungen wieder.

Die Übereinstimmung zwischen der Konz. in den Sekundärteilchen (0,13 Mol pro Liter) und in den Chloroplasten (Mittelwert 0,059 Mol pro Liter) ist überraschend gut. Bessere Übereinstimmung darf man nicht erwarten, da ja einige Grössen nur sehr roh bestimmt werden konnten. Ganz besonders der mittlere Durchmesser der Sekundärteilchen, der mit der 3. Potenz eingeht, ist nur sehr ungenau bekannt. Nimmt man z. B. statt 2μ als mittleren Durchmesser $2,6\mu$, so wäre die Konz. in den Sekundärteilchen nur noch 0,059 Mol pro Liter, und die Abweichung wäre bereits verschwunden.

Das Resultat ist also, dass die mittlere Konz. im Sekundärteilchen und im Chloroplasten innerhalb der Messgenauigkeit übereinstimmt.

¹⁾ E. HEIERLE, Dissertation Eidg. Tech. Hochschule Zürich, 1935, bei Buehler & Co., Bern.

²⁾ A. SEYBOLD und K. EGLE, l. c.

³⁾ Die Ausmessung der Zellen und Chloroplasten erfolgte mit freundlicher Erlaubnis von Herrn Prof. GAUMANN und mit Unterstützung von Herrn Dr. THOMAS im Institut für spezielle Botanik der E.T.H. Zürich.

Nachdem dieser Nachweis erbracht ist, sind wir im Sinne der Ausführungen zu Anfang dieses Kapitels berechtigt, die innere Struktur der Sekundärteilchen unseres Kolloides als getreues Modell der Ch.-Anordnung im Inneren der Chloroplasten, resp. Grana aufzufassen. Die weitere Erforschung der Ch.-Struktur in den Grana wird sich also zweckmässig dieser Modell-Kolloide als Hilfsmittel bedienen.

Unsere spektrometrischen Konz.-Bestimmungen in den Chloroplasten stehen in bester Übereinstimmung mit den Angaben von EULER, BERGMANN und HELLSTRÖM¹⁾, die den Ch.-Gehalt von Chloroplasten an *Elodea densa* durch quantitative Extraktion bestimmt haben. Sie finden für ein Chloroplastenvolumen von $40 \mu^3$ die Anzahl der Ch.-Moleküle zu $1,65 \cdot 10^9$. Unsere Konz. von 0,059 Mol pro Liter ergibt für dasselbe Volumen $1,43 \cdot 10^9$ Moleküle. Diese Übereinstimmung bestätigt die Zuverlässigkeit der spektrometrischen Ch.-Bestimmung in unverletzten Blättern. Besonders hervorgehoben werden muss der Umstand, *dass die Ch.-Konz. im Blatt von uns ja durch Identifikation des Blattspektrums mit dem Spektrum einer kolloidalen Ch.-Lösung bekannter Konz. bestimmt wurde* (siehe Kap. II und VII).

Da die hieraus errechneten Ch.-Gehalte der Chloroplasten mit den Werten von EULER und Mitarbeiter (loc. cit.) übereinstimmen, ist damit unmittelbar nachgewiesen, dass diese Identifikation richtig war, und der Verteilungszustand des Ch. im Blatt wirklich durch unser Kolloid nachgeahmt wird.

Wenn wir nun also sagen, *das Ch. im Blatt liegt im kolloidalen Zustande vor*, so kommen wir trotzdem nicht in Widerspruch mit K. NOAK²⁾, B. HUBERT (loc. cit.) und A. FREY-WYSSLING (loc. cit.), die bekanntlich mono- und di-molekulare Ch.-Schichten in den Chloroplasten, resp. Grana annehmen. Die von den genannten Autoren geforderte Struktur ist nach unserer Meinung einfach die Feinstruktur des Kerns der Sekundärteilchen, mit der wir unter der Bezeichnung Primärteilchen bereits operiert haben. Die Frage, ob das Ch. kolloidal vorliege oder in Form von solchen Schichten, ist also hinfällig. Wirklich gegen den kolloidalen Zustand sprach nur die Fluoreszenz des Ch. im Chloroplasten und das Fehlen derselben in den kolloidalen Ch.-Lösungen. Da nun in den Lösungen 6 und 9 *Fluoreszenz von kolloidalem Ch. nachgewiesen wurde*, fällt auch dieses Argument dahin.

¹⁾ H. v. EULER, B. BERGMANN und H. HELLSTRÖM, Ber. dtsh. bot. Ges. **52**, 458, 1934.

²⁾ K. NOAK, Biochem. Zeitschr. **183**, 135, 1927.

Über die Struktur des Kerns der Sekundärteilchen, der ja einem Granum entsprechen soll, kann nun noch einiges ausgesagt werden.

Lösung 17 hat (nach Tabelle 3) eine Konz. von $1,2 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter, d. h. $7,3 \cdot 10^{18}$ Ch.-Moleküle im Liter. Ein Sekundärteilchen enthält somit $3,3 \cdot 10^8$ Ch.-Moleküle, da nach Tabelle 3 insgesamt $2,2 \cdot 10^{10}$ Sekundärteilchen im Liter sind. Aus der Dichte von Ch. die (siehe Seite 382) 1,11 beträgt und dem Molekulargewicht (ca. 900), ergibt sich ein Volumen von rund 1350 (A.E.)³ pro Molekül. Hieraus ergibt sich das Volumen aller Ch.-Moleküle im Sekundärteilchen zu $4,5 \cdot 10^{-16}$ Liter, d. h. das Sekundärteilchen ist nur zu ca. $\frac{1}{10}$ mit Ch. erfüllt, ca. $\frac{9}{10}$ seines Volumens bestehen aus Lösungsmittel. Wie die $3,3 \cdot 10^8$ Ch.-Moleküle eines Sekundärteilchens nun in Primärteilchen gruppiert sind, lässt sich auf Grund dieser Arbeit nicht eindeutig angeben:

Versucht man es mit mono- oder di-molekularen Schichten, wie es ja von NOAK (l. c.) und FREY-WYSSLING (l. c.) gefordert wird, so ergibt sich folgendes: Als Primärteilchen müsste man Scheiben aus mono- oder di-molekularen Filmen annehmen, die so klein sind (Durchmesser ~ 100 A.E.), dass sie noch keine Trübung hervorrufen, wie es bei den Lösungen 6, 9, 16 der Fall ist. Dieser ersten Zusammenlagerung der Moleküle zu Scheiben entspricht also der Übergang des Spektrums vom Typ der Kurve 1 zum Typ der Kurve 6, 9 oder 16. Bei diesen Lösungen sollten die Primärteilchen auch noch solche Distanzen voneinander haben, dass keine gegenseitige optische Beeinflussung auftritt. Gehen wir nun zu Lösung 17 über, dem „Modellkolloid“, so sollten dort die Primärteilchen enger zusammengelagert sein. Das heisst also, dass sich jetzt die kleinen Scheiben mit ihren flachen Seiten unter eventuellem Einbau einer Zwischenschicht zusammenlagern. Dabei ändert sich das Spektrum abermals. In beiden Fällen ändert sich das Spektrum im erwarteten Sinne einer Glättung und Nivellierung der Absorptionskurve, da durch die Zusammenlagerung der Moleküle die Dämpfung der einzelnen optischen Eigenfrequenzen grösser wird. So weit wäre also allen Erfahrungstatsachen Rechnung getragen. Nun muss aber mit dem entwickelten Modell auch der Begriff der Assimilations- und Absorptions-Einheit von ca. 2500 Ch.-Molekülen, wie er von EMERSON, ARNOLD, GAFFRON und WOHL vertreten wird¹⁾, verträglich sein. Das heisst, die Absorptionseinheit muss räumlich in unserem Strukturmodell realisiert sein. Von den betrachteten Struktur-

¹⁾ K. WOHL, Zeitschr. für Phys. Ch. B 37, 105, 186, 209, 1937.

elementen kann eindeutig nur das Primärteilchen einer solchen Absorptionseinheit gleichgesetzt werden. Ordnet man 2500-Ch.-Moleküle in einer di-molekularen, runden Scheibe an, und zwar so, dass alle Prophinringe in der Scheibenebene liegen, alle Phytolschweife senkrecht dazu stehen, so benötigt man für 2 Moleküle rund 100 (Å.E.)². Für 2500 Moleküle gibt das eine runde Scheibe von ca. 400 Å.E. Durchmesser. Ihre Dicke entspricht der Länge von 2 Phytolketten, also ca. 40 Å.E. Ein solches Gebilde, dessen Dicke sich zum Durchmesser verhält wie 1 : 10, ist als Absorptionseinheit physikalisch undenkbar. Sämtliche Moleküle der Einheit sollen nämlich die von ihnen absorbierte Energie an ein gemeinsames, reagierendes Assimilationszentrum abliefern. Wenn auch noch keine genauen Vorstellungen über den Mechanismus dieses Energietransportes vorhanden sind, so ist es doch klar, dass es für die Wirksamkeit des Transportes wesentlich darauf ankommt, wie gross das absorbierende Volumen im Verhältnis zur Oberfläche ist, durch die die Energie wieder wegdiffundieren kann. Ein flächenhaftes Gebilde wäre also für den Energietransport denkbar ungünstig. Um also Primärteilchen zu haben, die auch als Absorptionseinheiten arbeiten können, muss gefordert werden, dass die mono- oder di-molekularen Ch.-Filme in den Grana auch noch in irgendeiner Weise aufgerollt sind.

Zusammenfassung.

1. Extrahiert man das Ch. auf besonders schonende Weise aus den Pflanzen, so erhält man Ch.-Lösungen (im folgenden als native Ch.-Lösungen bezeichnet), die einen *anderen Verlauf des Extinktionskoeffizienten* zeigen als das Ch., wie es in den Reinpräparaten vorliegt (im folgenden als gewöhnliches Ch. bezeichnet). Im besonderen wird auch nachgewiesen, dass diese Unterschiede weder durch ein verändertes Mengenverhältnis der A- zur B-Komponente, noch durch irgendwelche Verunreinigungen vorge-täuscht werden können.

2. Lässt man das native Ch. unter den beschriebenen Bedingungen altern, so macht es eine Umwandlung durch und zeigt nachher quantitativ die gleiche Absorptionskurve wie das gewöhnliche Ch. *Das gewöhnliche Ch. ist somit ein Derivat des nativen Ch.*

3. Durch Verwendung von Pflanzen, deren Blätter Ch.-freie Stellen zeigen, gelang es, durch Vergleich der grünen mit den Ch.-freien Stellen, unter Elimination der Streuung und Reflexion

am Blattkörper *den Extinktionskoeffizienten des Ch. im unverletzten Blatt quantitativ zu bestimmen*. Die so gemessenen Blattspektren unterscheiden sich wesentlich vom Spektrum des molekular gelösten, nativen Ch.

4. Bringt man das native Ch. in die kolloidale Form, so ist das Spektrum wesentlich anders als im molekular gelösten Zustand. Die Absorptionskurve ist für verschiedene Kolloide sehr unterschiedlich verändert. Ihr Verlauf hängt von der Konz. des Ch. in den sehr grossen Kolloidteilchen ab, die selbst noch sehr viel Lösungsmittel enthalten.

5. Es gelingt reproduzierbar, aus nativem Ch. eine kolloidale Verteilung derart herzustellen, dass ihre Absorption mit der des Ch. im Blatt weitgehend übereinstimmt. *Somit ist das native Ch. innerhalb unserer Messgenauigkeit chemisch identisch mit dem Ch. in der Pflanze. Die Verteilung des Ch. in der Pflanze muss kolloidal sein.*

6. Es gelang fluoreszierende, kolloidale Ch.-Lösungen herzustellen.

7. Die von andern Autoren vertretene Auffassung, das Ch. liege in den Grana in Form von mono- oder di-molekularen Filmen vor, steht in keinem Widerspruch mit der Annahme einer kolloidalen Verteilung des Ch. in der Pflanze. Die genannten Strukturformen müssen einfach als Feinstruktur der Kolloidteilchen aufgefasst werden.

8. Die Konzentration des Ch. in den Chloroplasten und in den grossen Sekundärteilchen der unter 5. genannten kolloidalen Ch.-Lösung wurde bestimmt und innerhalb der Messgenauigkeit als gleich gefunden.

9. Aus 5. und 8. lässt sich folgern, dass die Chloroplasten und die unter 7. genannten Kolloidteilchen dieselbe submikroskopische räumliche Anordnung der Ch.-Moleküle besitzen müssen. In dem genannten Kolloid liegt somit ein Modell der Ch.-Anordnung im Chloroplasten, resp. Granum vor. Untersuchungen an diesem Modell können also Aufschlüsse über die Anordnung der Ch.-Moleküle im Granum liefern.

10. Es wird versuchsweise ein Bild der Feinstruktur der genannten Kolloidteilchen entworfen, das mit allen Erfahrungstat-sachen im Einklang steht.

Für die, bei der Durchführung der ganzen Arbeit gewährte Unterstützung möchte ich in erster Linie meinem lieben Vater, Herrn Prof. Edgar Meyer, meinen Dank abstatten. Ebenso bin ich Herrn Prof. Hans v. Halban, der mir für die ganze Arbeit die

spektrographischen Einrichtungen des Physikalisch-Chemischen Institutes zur Verfügung stellte, zu tiefstem Danke verpflichtet.

Herrn P.-D. Dr. Almasy möchte ich meinen ganz besonderen Dank für das Interesse aussprechen, das er in zahlreichen Diskussionen und Ratschlägen für meine Arbeit bekundet hat.

Weiterhin bin ich für die Unterstützung, die Ratschläge, Diskussionen und das Interesse, das sie meiner Arbeit entgegenbrachten, den Herren Prof. Däniker, Prof. Ernst, Prof. Fischer (München), Prof. Frey-Wyssling, Prof. Gäumann, Prof. Karrer, Prof. Pallmann, Prof. Stoll (Basel), und den Herren Dr. Schindler und Dr. Thomas zu tiefstem Dank verpflichtet.

Zürich, Physikalisch-Chemisches und Physikalisches Institut
der Universität.
