

## Beiträge zur Assimilationstheorie

VON WALTER DRAHEIM und HERMANN ZIEGENSPECK, Königsberg (Pr.)

### Einleitung

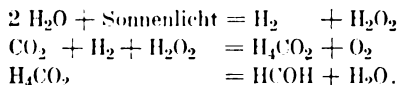
In den letzten Jahren sind über die Kohlensäureassimilation eine Reihe von Arbeiten erschienen, die sich alle mehr oder weniger mit der Frage beschäftigten, wie die autotrophe Pflanze aus der Kohlensäure organische Verbindungen herstellen kann. Vor allen Dingen versuchte man seit der BAYERSchen Formaldehydhypothese dieses Zwischenprodukt bei der Assimilation festzustellen.

Heute ist man dazu übergegangen, sich mehr mit den physikalischen Eigenschaften der Chloroplastenfarbstoffe zu beschäftigen. Man hat sich die Frage gestellt, wie und wodurch vermag die Pflanze die Sonnenenergie zu verwerten. So wurde man auf eine Eigenschaft des Chlorophylls aufmerksam, die man bisher nicht genügend beachtet hatte, die Fluoreszenz.

Bereits im Jahre 1904 haben TAPPEINER, JODLBAUER, NEUBERG und WILLSTÄTTER (1) gefunden, daß durch die Fluoreszenz des Eosins eine oxydierende Wirkung hervorgerufen wird. Sie fanden, daß eosinhaltige Jodkalilösung bei der Belichtung Jod ausscheidet. NOACK (2) hat diese Wirkung der Fluoreszenz weiter verfolgt und in neuen Arbeiten eingehender untersucht.

Wie wirkt nun überhaupt die Fluoreszenz? Daß kurzwelliges Licht in langwelliges umgewandelt wird, ist schon seit langem bekannt (3). Über die sonstige Wirkung ist verhältnismäßig wenig gearbeitet worden. NOACK fand, daß sie einen photodynamischen Effekt hervorruft, durch den Sauerstoff aktiviert wird. Woher kommt nun dieser Sauerstoff? Darüber herrschen die verschiedensten Ansichten.

THUNBERG (4) und WIELAND (5) nehmen an, daß das Wasser aktiviert wird, was mehr auf eine Aktivierung des Wasserstoffs als des Sauerstoffs hinauslaufen würde.



NOACK (6) behauptet, daß der Luftsauerstoff aktiviert wird und in der Lösung ein Peroxyd bildet. Er fand bei seinen Arbeiten, auf die weiter unten noch näher eingegangen wird, daß sich in ausgekochter Lösung bei Luftabschluß nur langsam durch Belichtung eine oxydierende Wirkung zeigt, während die Kontrollen an der Luft innerhalb weniger Minuten starke Reaktionen gaben. Diese Tatsache untersuchte er quantitativ und fand einen Zusammenhang zwischen dem Sauerstoffgehalt des Wassers, der Oxydationswirkung und der Menge des angewandten Chloroplastenfarbstoffes. Außerdem war in den geschlossenen Gefäßen eine Abnahme des Luftsauerstoffs zu bemerken. Versuche über Oxydationswirkungen im sauerstofffreien Raum hat er nicht weiter ausgeführt.

Da die Zerstörung des Chlorophylls auf einer Oxydation beruht, durfte es in sauerstofffreier Atmosphäre nicht zerstört werden. Diese Tatsache war bereits von N. PRINGSHEIM (7) festgestellt worden, der bei einer 20 Minuten dauernden Belichtung von *Spirogyra*-Fäden fand, daß das Chlorophyll in einer Atmosphäre von Wasserstoff oder Wasserstoff und Kohlendioxyd nicht entfärbt wurde. Sonst war bei seinen Belichtungsversuchen in der Luft die Verfärbung innerhalb weniger Minuten vor sich gegangen.

### Versuche mit Chlorophylllösung unter Luftausschluß

Anläßlich von Vorlesungsversuchen, die ZIEGENSPECK im Sommer 1926 gemacht hatte, arbeitete DRAHEIM mit roher Chlorophylllösung, um festzustellen, welche Gase durch die Fluoreszenzwirkung des Chlorophylls aktiviert werden. Die Chlorophylllösungen, mit denen gearbeitet wurde, wurden so hergestellt, daß frische *Selaginella*- oder Taubnesselblätter im Mörser unter Zusatz von  $\text{CaCO}_3$  zerstampft wurden.  $\text{CaCO}_3$  wurde zugesetzt, um eine Zerstörung des Chlorophylls durch gebildete organische Säuren zu verhindern. Die zerstampften Blätter wurden dann mit schwach verdünntem Alkohol (Methyl- oder Aethyl-Alkohol) oder mit einem Gemisch von  $\frac{2}{3}$  Aceton und  $\frac{1}{3}$  Wasser versetzt. Die entstandenen Chlorophylllösungen wurden darauf rasch filtriert. Diese Lösungen wurden für alle in Frage kommenden Versuche stets frisch bereitet, um bei Beginn des Versuchs unveränderte Chlorophylllösung zu haben, da sich sonst die Chlorophyllase geltend macht.

Es wurde gefunden, daß bei Ausschaltung des Luftsauerstoffs Chlorophylllösungen tagelang in der Sonne stehen konnten, ohne daß

das Chlorophyll entfärbt wurde. Zu diesem Zweck waren die Lösungen in Reagenzgläser eingeschmolzen worden, indem darauf geachtet wurde, daß die Luft möglichst vollständig aus den Gläsern verdrängt wurde. Die Kontrollen in offenen Gläsern, die gleichzeitig der Sonne ausgesetzt worden waren, wurden wie üblich innerhalb kurzer Zeit zerstört. Die Lösungen in den zugeschmolzenen Röhren hielten sich vollkommen unverändert, jedoch zeigte sich nach einem Monat eine allmähliche Gelbfärbung, die wohl auf Säurewirkung zurückzuführen war. Ein Auszug von Taubnessel wurde sogar schon nach wenigen Tagen braun. Es wurden im August 1926 neue Versuche angesetzt, denen zur Verhinderung der Säurebildung eine geringe Menge von Bicarbonat oder Carbonat zugesetzt wurde. Hierzu wurden auch Taubnesselauszüge verwandt. Gleichzeitig wurden einigen Versuchen Kaliumsalze zugesetzt, um zu sehen, ob diese vermöge ihrer geringen Radioaktivität von irgendeinem Einfluß auf das Chlorophyll sein würden.

Die Versuche wurden in folgender Weise angesetzt: 3. VIII. 26 Acetonauszug von Taubnessel:

|                            |                                                                                                      |                              |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| 1. + $\text{NaHCO}_3$      | 1. XI. 26.<br>Farbe unverändert (blaugrün mit etwas gelbem Stich wie unbelichtete Chlorophylllösung) | 1. VIII. 27<br>wie 1. XI. 26 |
| 2. + $\text{KHCO}_3$       | wie vorstehend                                                                                       | desgl.                       |
| 3. + $\text{CaCO}_3$       | Farbe olivgrün, nach gelb verändert                                                                  | desgl.                       |
| 4. + $\text{CaCO}_3$ + KCl | " " " " "                                                                                            | "                            |
| 5. Kupferchlorophyll       | Farbe unverändert blaugrün                                                                           | desgl.                       |
| 6. Kupferchlorophyll + KCl | wie vorstehend                                                                                       | desgl.                       |

Wie aus dem Protokoll zu ersehen ist, hat sich bei einem Zusatz von Bicarbonat die Farbe der Chlorophylllösung nicht im geringsten verändert, obwohl diese Lösungen fast ein Jahr im Licht gestanden hatten. Calciumcarbonat war nicht so wirksam, wahrscheinlich, weil es nicht löslich ist. Die Farbe hatte sich in ein olivgrün verändert, jedoch war eine weitere Entfärbung nicht eingetreten. Das Kaliumsalz hatte ebenfalls keinen besonderen Einfluß gezeigt.

Gleichzeitig waren Versuche gemacht worden, bei denen Chlorophylllösung in Kohlensäure-Atmosphäre dem Licht ausgesetzt wurde. Im KIPPSchen Apparat wurde  $\text{CO}_2$  entwickelt, nachdem der Marmor und ebenso die angewandte  $\text{H}_2\text{SO}_4$  vorher zum Vertreiben

der Luft eine Stunde lang ausgekocht worden waren. Die entwickelte Kohlensäure wurde durch zwei Waschflaschen geleitet, von denen die erste mit Wasser, die zweite mit Pyrogallollösung beschickt war, um das  $\text{CO}_2$  weitestgehend zu reinigen und den Sauerstoff zu entfernen. Dann wurde es durch ein Verbrennungsrohr geleitet, in dem eine reduzierende Kupferspirale erhitzt wurde, um auch die letzten Reste von Sauerstoff zu entfernen. Es wurde darauf geachtet, daß bei der Apparatur möglichst Glasrohr an Glasrohr stieß, damit das Gas so wenig wie möglich mit den Kautschukverbindungen in Berührung kam. Nun wurde das  $\text{CO}_2$  in langsamem Strom, nachdem aus der ganzen Apparatur die Luft verdrängt war, durch einen Acetonauszug von *Selaginella*, dem  $\text{NaHCO}_3$  und  $\text{MnSO}_4$  zugesetzt waren, geleitet. Darauf wurde diese Lösung belichtet. Im Laufe des Tages trat ein ganz langsames Verfärben ein, so daß nach zwei Tagen die Lösung leicht olivgrün gefärbt war. Von da ab zeigte die Lösung nach 3—4 Tagen keine weitere Veränderung mehr. Während der Nacht war die Apparatur unter  $\text{CO}_2$ -Druck gelassen worden, damit von außen keine Luft hereindringen konnte.

Ähnliche Versuche wurden mit Wasserstoff angestellt, nur wurde dieser nicht über die glühende Kupferspirale geleitet. Dafür wurden zwei mit Pyrogallol beschickte Waschflaschen vorge-schaltet. Der Erfolg der Belichtung war genau so, wie der in der  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre vorgenommene. Die Farbe veränderte sich nur in geringem Maße, um von da ab denselben Farbton zu behalten.

Alle Versuche sind mehrfach ausgeführt worden. Sie zeigten, daß bei Ausschluß von Sauerstoff die Chlorophylllösung nicht verändert wurde, gleichzeitig zeigten sie auch, daß andere Gase durch die Fluoreszenz nicht aktiviert werden, weil diese auf die Chlorophylllösung keine Einwirkung gezeigt haben. Wäre Wasserstoff aktiviert worden, so hätte das Chlorophyll ausbleichen müssen, da dieses durch eine Reduktion entfärbt wird.

Wäre die THUNBERG-WIELANDSche Theorie von der Aktivierung des Wassers richtig gewesen, so hätte auch hier eine solche stattfinden müssen, da die Acetonlösung mit ein Drittel Wasser versetzt worden war. Die Einwirkung auf das Chlorophyll hätte sich zeigen müssen. Da eine solche nicht eingetreten ist, darf man wohl annehmen, daß die Fluoreszenz eine Aktivierung des Wassers nicht bewirken kann, sondern lediglich eine solche des Luftsauerstoffs.

### Einwirkung von Fluoreszenten auf Kupferchlorophyll

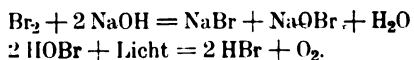
Wenn die Bildung peroxydischen Sauerstoffs tatsächlich auf dem photodynamischen Effekt beruht, den die Fluoreszenz organischer Farbstoffe und des Chlorophylls auslöst, so müßte sich diese Wirkung eben nur bei fluoreszierendem Chlorophyll zeigen. Tatsächlich wurde festgestellt, daß Chlorophyll in kolloidalem Zustand durch das Licht nicht im geringsten beeinflusst wird (8). Es ist schon dann, wenn es in Lecithin oder Fetten gelöst ist, eine Minderung des Ausbleichens festzustellen (9). Das ist darauf zurückzuführen, daß in diesem Falle dem Luftsauerstoff der Zutritt zu dem Chlorophyll erschwert wird.

Ebenso verhält sich Chlorophyll, in welchem das Magnesium durch andere, und zwar durch schwerere Metalle, z. B. Kupfer, ersetzt ist. Kupferchlorophyll fluoresziert nicht und wird auch nicht von der Sonne zerstört (10). Ein Zusatz eines fluoreszierenden Farbstoffs zu dem Kupferchlorophyll müßte bewirken, daß sich dieses ebenso verhält wie reines Chlorophyll, d. h. die Fluoreszenz des Farbstoffes müßte den Sauerstoff in genau derselben Weise aktivieren. Das Kupferchlorophyll müßte als Akzeptor dienen und daher zerstört werden. Um dieses zu untersuchen, wurde eine Reihe von Versuchen angestellt, bei denen folgende fluoreszierende Farbstoffe zur Verwendung kamen: Eosin, Fluoreszein, Cyaneosin, Erythrosin und Methylenblau. Eine Einwirkung von Methylenblau war leider nicht festzustellen, da die Farbkraft dieses Farbstoffes bei der gewählten Konzentration zu stark war, so daß die Farbe des Kupferchlorophylls vollständig verdeckt wurde. Das Kupferchlorophyll wurde nach den Angaben von NOACK hergestellt (10) und zeigte im Lichtkegel der Projektionslampe nicht die geringste Fluoreszenz. — *Avena*-Blätter wurden zwei Minuten lang in eine siedende 1 %-wässrige Kupfersulfatlösung hineingelegt, über Nacht in der Lösung stehen gelassen und darauf 24 Stunden in fließendem Wasser gewaschen. — Von einem gewissen Nachteil war die schwere Löslichkeit des Kupferchlorophylls, weil dadurch die Lösungen verhältnismäßig dünn waren. Jedoch genügte auch diese Konzentration, um die Einwirkung der Fluoreszenten festzustellen. Es wurde eine 0,1 %-Lösung von den verschiedenen Farbstoffen hergestellt und 1 resp. 5 oder 10 Tropfen zu je 4 ccm Kupferchlorophylllösung hinzugefügt. In nachstehender Tabelle ist das Resultat zusammengestellt, sowohl der belichteten Versuche, wie auch der Dunkelkontrollen.

| Tropfen:     | L i c h t              |                   |        | D u n k e l |        |          |
|--------------|------------------------|-------------------|--------|-------------|--------|----------|
|              | 1                      | 5                 | 10     | 1           | 5      | 10       |
| Eosin        | s. schwach<br>hellgrün | weiß              | wie 1  | grün        | grün   | hellgrün |
| Eosin BA     | s. schwach<br>hellgrün | gelbl.<br>hellgr. | gelb   | h.grün      | weiß   | hellgrün |
| Eosin ACo    | s. schwach<br>hellgrün | wie 1             | wie 1  | grün        | h.grün | grün     |
| Na Eosin     | h.grün                 | gelb              | gelb   | h.grün      | g.grün | h.g.grün |
| Erythrosin   | s. schwach<br>h.grün   | wie 1             | h.grün | grün        | grün   | h.grün   |
| Cyaneosin    | h.g.grün               | h.orange          | orange | gelb        | orange | d.orange |
| Methylenblau | grün                   | grün              | grün   | grün        | grün   | grün     |
| Fluoreszein  | s. schwach<br>h.grün   | wie 1             | wie 1  | grün        | grün   | grün     |

Ein Ausbleichen des Kupferchlorophylls war bei diesen sämtlichen Versuchen zu sehen. Anscheinend spielte auch die Menge des hinzugefügten fluoreszierenden Farbstoffs eine Rolle, da bei einigen Versuchen bei einem Zusatz von 5 Tropfen ein stärkeres Ausbleichen festzustellen war, als bei 1 und bei 10 Tropfen. Es ist möglich, daß die größere Konzentration des zugesetzten Farbstoffs eine gewisse Schutzwirkung ausübte und daher das Kupferchlorophyll nicht in dem Maße ausgebleicht wurde wie in verdünnteren Lösungen, da der Farbstoff selber auch angegriffen wird.

Um diese Ergebnisse nochmals zu kontrollieren, wurden neue Versuche mit größeren Mengen Kupferchlorophyll angesetzt. Als Fluoreszenten wurden Eosin und Fluoreszein verwendet. Diese beiden Farbstoffe wurden gewählt, weil das Eosin die stärkste Wirkung gehabt hatte und das Fluoreszein die schwächste. Außerdem enthält Fluoreszein kein Brom. Man könnte sich nämlich vorstellen, daß durch das Licht Brom abgespalten würde und dieses dann durch die Entstehung von unterbromiger Säure wie ein Peroxyd wirken könnte.



Bei dem Fluoreszein ist dieses ausgeschlossen, und die Versuche sind daher als Kontrollen gut zu verwenden. Es wurden 1 resp. 5 und 10 Tropfen auf 10 ccm Kupferchlorophylllösung angewendet.

| Stunden     |        | L i c h t |         |           | D u n k e l |      |      |
|-------------|--------|-----------|---------|-----------|-------------|------|------|
|             |        | 1         | 2       | 3         | 1           | 2    | 3    |
| Fluoreszein | 1 Tr.  | grün      | gelbgr. | h.gelbgr. | grün        | grün | grün |
| Fluoreszein | 5 Tr.  | g.grün    | gelbgr. | gelb      | grün        | grün | grün |
| Fluoreszein | 10 Tr. | g.grün    | h.g.gr. | gelb      | grün        | grün | grün |
| Eosin       | 1 Tr.  | g.grün    | g.grün  | gelb      | grün        | grün | grün |
| Eosin       | 5 Tr.  | g.grün    | h.g.gr. | gelb      | grün        | grün | grün |
| Eosin       | 10 Tr. | h.g.gr.   | gelb    | gelb      | grün        | grün | grün |

Nach 14 Tagen waren die Kontrollösungen gelbgrün geworden, während die belichteten Versuche schon lange vorher vollkommen farblos geworden waren. Die Versuche hatten 3 Tage bei sehr trübem Wetter im Licht gestanden, ohne daß eine große Einwirkung zu merken gewesen war. 1 war unverändert, 5 etwas gelbstichig, 10 noch etwas stärker gelblich geworden. In der Sonne war am 4. Tag eine sofortige Einwirkung in der kurzen Zeit von drei Stunden zu bemerken.

Im nächsten Jahr wurden diese Versuche nochmals wiederholt und dieselben Resultate erzielt. Gleichzeitig wurde untersucht, ob mit frischer Chlorophylllösung eine ähnliche Wirkung zu erreichen ist wie mit den fluoreszierenden Farbstoffen. Zu diesem Zweck wurde Kupferchlorophyll mit frischer Magnesium-Chlorophylllösung in dem Verhältnis 1:1 gemischt und dann belichtet. Schon nach zwei Stunden war gegenüber den Dunkelkontrollen eine merkbare Aufhellung festzustellen und im Verlauf von zwei Tagen waren die belichteten Lösungen hellolivgrün geworden. Es war nicht festzustellen, wieweit beide Komponenten an dem Ausbleichen beteiligt waren, da beide grün gefärbt sind und gelbes zerstörtes Magnesium-Chlorophyll mit blaugrünem Kupferchlorophyll eine gelbgrüne Färbung gibt. Die Kontrollösungen sind zu dunkelgrün, um einen Vergleich zu gestatten.

Es mußte hier also ein anderer Weg eingeschlagen werden, um festzustellen, wie weit auch das Kupferchlorophyll zerstört wurde. Es wurden folgende Versuchsreihen angesetzt: In zwei Reagenzgläser kamen je 10 ccm Kupferchlorophyll. Dem einen derselben wurden 10 ccm frisch dargestellter Chlorophylllösung zugesetzt. Die gleiche Menge frischer Chlorophylllösung wurde in ein drittes Reagenzglas gleicher Dicke und gleichen Glases gegeben. Alle drei Gläser standen zwei Tage im intensiven Sonnenlicht. Dann wurde

die ausgebleichte reine Chlorophylllösung mit der reinen Kupferchlorophylllösung gemischt. Ein Vergleich der gesondert und gemischt belichteten Lösungen ergab einen bedeutend helleren Farbton der gemischt belichteten, nämlich hellolivgrün gegen dunkelolivgrün. Es zeigte sich also, daß bei der gemischt belichteten Lösung nicht nur das Magnesiumchlorophyll, sondern auch das Kupferchlorophyll zerstört worden war, während das Kupferchlorophyll allein von der Sonne nicht im geringsten verändert wurde, wie Vergleiche mit Dunkelkontrollen zeigten. Diese Versuche wurden mehrfach ausgeführt und jedesmal zeigte sich, daß die Fluoreszenz der Chlorophylllösung ein Ausbleichen des Kupferchlorophylls bewirkte. Daß dieses kein restloses war, wie bei Eosin und Fluoreszein, läßt sich so erklären, daß das Magnesiumchlorophyll selbst viel leichter zerstört wird als die fluoreszierenden Farbstoffe. Daher konnte der aktivierte Sauerstoff nur in geringerem Maße das Kupferchlorophyll angreifen.

### **Wasserstoffsuperoxyd und belichtete Farblösungen**

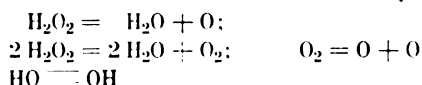
Es wurde auch die Einwirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf Kupferchlorophyll-, Eosin- und Fluoreszeinlösungen beobachtet. Zu diesem Zwecke waren Farbstoffkonzentrationen gewählt worden im Verhältnis 1:40 000, um das Ausbleichen des Farbstoffes besser beobachten zu können. Noack hatte gefunden, daß die peroxydische Wirkung des aktivierten Sauerstoffs erheblich größer war als diejenige von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Die Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd mußte also eine geringere zerstörende Wirkung ausüben als sie der aktivierte Sauerstoff verursacht.

Es wurden 15 ccm Eosin-, Fluoreszein- und Kupferchlorophylllösungen mit je 5 ccm 3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  versetzt. Eine Versuchsreihe wurde dem Licht ausgesetzt, die andere wurde in die Dunkelkammer gestellt. Gleichzeitig waren Kontrollösungen angesetzt worden, denen an Stelle von  $\text{H}_2\text{O}_2$  gleiche Mengen Wasser zugesetzt worden waren. Von diesen wurde ebenfalls eine Reihe belichtet, die andere in der Dunkelkammer belassen.

Die Dunkelversuche mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zeigten nach zwei Tagen eine ganz erhebliche Aufhellung gegenüber den mit Wasser angesetzten Kontrollen. Am schwächsten war diese bei Kupferchlorophyll zu bemerken, das anscheinend gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$  am beständigsten war. Die Versuche im Licht zeigten alle ein weit stärkeres Ausbleichen. Am geringsten war es wiederum beim Kupferchlorophyll, das nur

wenig heller geworden war als der Dunkelversuch. Die Eosin- und Fluoreszeinlösung war schon nach einem Tag vollständig zerstört und farblos geworden. Die gleichzeitig nur mit Wasser belichteten Farbstofflösungen waren nicht in dem Maße zerstört worden. Im Dunkeln hatten sie sich überhaupt nicht verändert.

Man konnte also hier ein stärkeres Ausbleichen im Licht feststellen. Erklären kann man sich das so, daß durch das Licht das Wasserstoffsuperoxyd zersetzt wird und der dabei frei werdende Sauerstoff viel schneller die Farbstoffe und das Kupferchlorophyll angreifen kann, als es im Dunkeln der Fall ist. Daß die fluoreszierenden Farbstoffe vollkommener zerstört wurden, könnte darauf beruhen, daß die Fluoreszenz die Zersetzung des Wasserstoffsuperoxyds vermehrt. Es handelt sich dann wohl um eine Überführung in aktiven Sauerstoff. Das Wasserstoffsuperoxyd wird allein durch die Sonnenstrahlen in Sauerstoff und Wasser gespalten. Dabei entsteht intermediär aktiver Sauerstoff. In der Fluoreszenzlösung kann der schon molekular gewordene Sauerstoff wieder aktiviert werden und dadurch eine größere Oxydationswirkung entstehen. Es wäre aber auch möglich, daß die Fluoreszenten in dem Sinne auf das  $\text{H}_2\text{O}_2$  einwirken, daß aktiver Sauerstoff in erhöhtem Maße direkt entsteht.



Die Folge beider Vorgänge wäre eine größere Menge von aktiviertem Sauerstoff, der dann natürlich auch eine größere zerstörende Kraft ausüben kann, als es der aktivierte Sauerstoff vermag, der lediglich aus molekularem Luftsauerstoff stammt.

Diese Versuche stehen mit der Erwartung vollkommen im Einklang. Das nicht fluoreszierende Kupferchlorophyll wird im Licht nicht wesentlich stärker ausgebleicht als im Dunkeln. Das Wasserstoffsuperoxyd bleibt im Dunkeln wesentlich länger bestehen als in den belichteten Lösungen. Es war noch nach zwei Tagen nicht vollständig zum Ausbleichen der Lösungen verbraucht worden.

Diese Versuche wurden mit einem anderen nicht fluoreszierenden Farbstoff, der die Rolle des Kupferchlorophylls vertrat, wiederholt. Dazu wurde Kongorot verwendet. In nachstehender Tabelle sind die Resultate zusammengestellt.

|                                       | Tag | Sonne                                                                           | Dunkel                                                         |
|---------------------------------------|-----|---------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| I Kongorot + $H_2O_2$                 | 1   | hellrosa, stark ausgebleicht                                                    | etwas heller als reines Kongorot                               |
|                                       | 2   | hellorangerot                                                                   | hellrosa, etwas heller als reines Kongorot i. d. Sonne         |
| II Kongorot + $H_2O_2$ + Eosin        | 1   | hellrosa, viel heller als bei Kongorot + Eosin                                  | etwas (sehr wenig) heller als Kongorot + Eosin im Dunkeln      |
|                                       | 2   | fast farblos, hell orangerosa<br>Eosin auch stark gebleicht                     | etwas heller als am Tage vorher                                |
| III Kongorot + $H_2O_2$ + Fluoreszein | 1   | hellgelb                                                                        | etwas dunkler als Kongorot + Fluoreszein in der Sonne (orange) |
|                                       | 2   | hellgelb fast farblos, Fluoreszein fast völlig zerstört                         | reine Fluoreszeinfarbe, etwas heller als V, 2 Sonne            |
| IV Kongorot + Eosin                   | 1   | Farbe von Eosin, wesentlich heller als Dunkelversuch                            | dl. orangerot = Eosin + Kongorot (unverändert)                 |
|                                       | 2   | hellorangerosa, doch dunkler als bei II, 2 Sonne, auch Eosin etwas ausgebleicht | dl. orangerot = Eosin + Kongorot (unverändert)                 |
| V Kongorot + Fluoreszein              | 1   | Farbe von Fluoreszein = gelb                                                    | dl. orange gelb = Kongorot + Fluoreszein (unveränd.)           |
|                                       | 2   | orange gelb, wesentl. heller als der Schattenversuch                            | dl. orange gelb = Kongorot + Fluoreszein (unveränd.)           |
| VI Kongorot                           | 1   | rot, wie Dunkelversuch                                                          | rot                                                            |
|                                       | 2   | hellrot, etwas heller als der Dunkelversuch                                     |                                                                |

Auch diese Versuche bestätigten die zuerst erhaltenen Resultate vollkommen. Hier ist ebenfalls eine ganz verschiedene Einwirkung der belichteten und der nicht belichteten Lösungen festzustellen. Man kann sagen, daß Kongorot genau in demselben Maße durch die fluoreszierenden Farbstoffe und durch das  $H_2O_2$  zerstört wurde, wie es bei dem Kupferchlorophyll der Fall war.

Es scheinen hier zwei ganz verschiedene Reaktionen vor sich gegangen zu sein: 1. wird in den Lösungen, welche die Fluoreszenten enthalten, das Wasserstoffsperoxyd schneller zerstört, als es sonst im Lichte der Fall ist; 2. wird molekularer Sauerstoff durch die Fluoreszenten aktiviert. Bei der Zerstörung des Wasserstoffsperoxyds wird weit mehr aktiver Sauerstoff frei, als sonst aus

molekularem Luftsauerstoff oder  $H_2O_2$  ohne Fluoreszenten entsteht. Dies macht sich in einer stärkeren Bleichwirkung bemerkbar.

Wenn wir annehmen, daß der durch die Fluoreszenz „aktivierte“ Sauerstoff fähig ist, ein Peroxyd zu bilden, wie es von NOACK und anderen angenommen wurde, so müßte hier ein reversibler Vorgang stattfinden (Peroxyd bildend und Peroxyd zerstörend). Demnach ist anzunehmen, daß in belichteten fluoreszierenden Farbstoff- und Chlorophyllösungen ein gebildetes Peroxyd nie *in großer Menge* vorhanden sein kann, sondern daß es sich im ungestörten System um ein Gleichgewicht handeln wird. Bei Zugabe eines Acceptors kann der aktivierende Prozeß nach der Richtung hin verschoben werden, daß der labile aktivierte Sauerstoff in eine stabile Form umgewandelt wird und so aus dem im Gleichgewicht befindlichen System ausscheiden kann. Es ist in diesem Fall gleichgültig, ob es sich um ein stabiles Peroxyd oder Oxyd handelt. Dadurch fällt der Vorgang aus, der wieder molekularen Sauerstoff als stabile Form bildet. Die durch die Fluoreszenzwirkung erzeugten Energiemengen streben also einem Ausgleich in stabiler Richtung zu. NOACK (12) hatte ähnliche Beobachtungen gemacht, und eine summierende Wirkung von belichteter Eosinlösung und  $H_2O_2$  gefunden, aber darauf verzichtet, die erhöhte Wirkung des  $H_2O_2$  zu erklären. Den Beweis für obige Annahme könnte man erbringen, wenn es gelingen würde, durch den photodynamischen Effekt ein stabiles Peroxyd zu bilden.

## Nachweis eines Peroxyds in fluoreszierenden Farbstofflösungen nach der Belichtung

### 1. Die zum Nachweis angewandten Methoden

Ein Peroxyd selbst konnte NOACK nicht feststellen (13). Seine Versuche mißlangen stets. Die Erklärung hierfür findet man in der, wie oben ausgeführt, geringen Menge Peroxyd, die in den belichteten Lösungen vorhanden sein kann und sich den üblichen Nachweismethoden entziehen mußte. NOACK erklärte sich das folgendermaßen: Der aktivierte Sauerstoff bildet mit den Farbstoffen ein Farbstoffperoxyd und ebenso mit den als Acceptor zugesetzten Stoffen ein solches. Diese beiden gebildeten Peroxyde reduzieren sich gegenseitig unter Abspaltung von molekularem Sauerstoff und Wiederherstellung des Farbstoffes. Die Tatsache, daß Chlorophyll bei Zugabe eines Acceptors viel länger belichtet werden kann, ohne zerstört zu werden, scheint hierfür zu sprechen.

Dieser Weg, das Ausbleiben eines Peroxyds zu erklären, kann nicht völlig befriedigen. Es müßte möglich sein, ein stabileres Peroxyd herzustellen, das der reduzierenden Wirkung eventuell durch Ausfällen entzogen werden kann, um auf diese Weise die rückläufige Reaktion auszuschalten. Verfasser unternahmen nun den Versuch, diese hier bestehende Lücke auszufüllen und den Nachweis eines Peroxyds zu erbringen.

Einige Versuche, die NOACK angestellt hatte, wurden wiederholt, um einen Eindruck von der oxydierenden Wirkung der Floureszenten zu bekommen. Als Acceptor wurde ebenfalls Benzidin verwendet und dieselben Resultate erhalten, wie sie NOACK geschildert hat (14). Er hatte bei seinen Versuchen mit intermittierender Belichtung, wenn die Pausen sehr klein gewählt wurden, gefunden, daß die Oxydationswirkung größer wurde, bezogen auf gleiche Belichtungszeiten. Die oxydierende Wirkung mußte daher auch während der Unterbrechungszeiten vorhanden sein, d. h. man kann annehmen, daß ein intermediäres Peroxyd entsteht, weil „aktivierter“ Sauerstoff äußerst labil ist und nicht so lange in den Lösungen bestehen bleiben kann (15).

Es handelte sich nun darum, einen Weg zu finden, der es ermöglicht, diese geringe gebildete Menge von Peroxyd nachzuweisen. Da die von NOACK angewendete Methode zu keinem Ergebnis geführt hatte, mußte auf anderem Wege versucht werden, dieses Ergebnis zu erreichen. Die Anregung hierzu gab der Nachweis von Peroxydasen mit Hilfe von Benzidin und einem Mangansalz als Sauerstoffüberträger. Als Beispiel mag der Nachweis von Peroxydasen bei der Kartoffel dienen. Eine Kartoffelschnitte wird mit einer 0,2% wäßrigen Benzidinlösung und einem neutralen Mangansalz versetzt. Nach dem Ansäuern mit schwacher Essigsäure zeigt sich an den Stellen, wo Peroxydasen enthalten sind, Benzidinblaubildung<sup>1)</sup>. Nach eingehenden Versuchen konnte diese Benzidinblaubildung in folgender Weise zum Nachweis von Peroxyd verwendet werden: Wenn man zu 10 ccm einer 0,01 % - Wasserstoffsuperoxydlösung ein bis zwei Tropfen alkoholischer Benzidinlösung und als Sauerstoffüberträger 1—2 Tropfen stark verdünntes schwach hämolytisches Blutserum gibt, so bildet sich bei tropfenweisem, vorsichtigem Ansäuern mit 10 % Essigsäure Benzidinblau. Ein Überschuß von Säure muß peinlichst vermieden

<sup>1)</sup> Beim Nachweis von Oxydasen muß  $H_2O_2$  zugesetzt werden. Peroxydasen verhalten sich gerade so, als ob sie aus Oxydasen und  $H_2O_2$  beständen.

werden, weil sonst die Benzidinblaubildung unterbleibt oder der gebildete Farbstoff schnell wieder zerstört wird. Der Farbstoff wird in diesem Falle zunächst grün und verschwindet dann vollkommen. Mangansalze durften ebenfalls nicht hinzugesetzt werden, weil diese mit dem Blutserum allein bereits diese Reaktion gaben. Es ist daher in der Folge stets ohne Mangan gearbeitet worden. Auf eine Beschleunigung der Vorgänge, wie sie Noack festgestellt hatte, mußte von vornherein verzichtet werden. Es zeigte sich sogar, daß Mangan bereits in alkalischer Lösung Benzidinblaubildung hervorruft, wenn dieses auch wesentlich heller aussieht, als das in saurer Lösung entstehende. Eine Verunreinigung mit Mangan mußte daher tunlichst vermieden werden, um nicht zu falschen Resultaten zu kommen.

## 2. Versuche, die peroxydische Nachwirkung festzustellen

Folgende Versuche wurden nun angestellt. Eine Eosinlösung im Verhältnis 1:15 000 wurde zwei Stunden lang unter Kühlung in der Sonne belichtet und dann in der oben angegebenen Weise mit Benzidin geprüft. Die Lösung färbte sich nach dem Ansäuern sofort violett, während die Dunkelkontrollen bei der Prüfung unverändert rot blieben. In der belichteten Lösung war also auch noch einige Zeit *nach* dem Belichten eine peroxydische Nachwirkung festzustellen, die sich durch die Benzidinblaubildung kennzeichnete. Da aktivierter Sauerstoff in der Lösung allein kaum bestehen kann, so muß man wohl annehmen, daß er an irgendeinen Körper gebunden ist, d. h. daß sich ein Peroxyd, wenn auch ein solches von kurzer Lebensdauer, gebildet hat. Mit Fluoreszein gingen diese Versuche nicht, es war keine wesentliche Veränderung im Farbton festzustellen. Fluoreszein ist, wie schon Noack feststellte, weniger wirksam als Eosin. Es wird sich daher ein Peroxyd nicht in dem Maße bilden wie bei Eosin. Doch wäre dies immer noch keine Erklärung für das Ausbleiben der Reaktion. Man kann sich das folgendermaßen erklären: Die Blaubildung ist beim Eosin stets nur so gering gewesen, daß die Lösung gerade violett wurde. Wenn eine derartig geringe Menge Benzidinblau in der gelben Fluoreszeinlösung entsteht, so wird das eine grüne Farbe ergeben, die durch die grüne Fluoreszenzfarbe vollständig verdeckt werden muß und deshalb nicht beobachtet werden kann. Meines Erachtens ist nur darauf das Versagen der Reaktion zurückzuführen.

Gleichzeitig wurde versucht, ob dieses vorhandene Peroxyd auch imstande ist, aus KJ nachträglich Jod freizumachen, wie es

$\text{H}_2\text{O}_2$  vermag. Diese Versuche wurden angesetzt, wie es TREADWELL (16 b) zur quantitativen Bestimmung des  $\text{H}_2\text{O}_2$  vorschreibt. Belichtete Eosin- und Fluoreszeinlösungen wurden im Dunkeln mit KJ versetzt. Dann wurden diese Lösungen mit Schwefelsäure angesäuert und nach fünf Minuten mit Schweflkohlenstoff oder Tetrachlorkohlenstoff ausgeschüttelt. Die dabei entstehende violette Färbung, die allerdings nicht sehr stark war, zeigte, daß Jod in Freiheit gesetzt worden war. Die in gleicher Art und Weise behandelten Dunkelkontrollen zeigten niemals die geringste Reaktion. Auch diese Versuche bestätigen das Vorhandensein eines intermediär entstandenen Peroxyds in den belichteten Lösungen. Hier waren die Versuche mit Fluoreszein ebenfalls positiv, was die oben gegebene Erklärung noch wahrscheinlicher erscheinen läßt. Dieses Resultat war insofern wertvoll, weil dadurch der Einwand behoben ist, daß die peroxydische Wirkung der belichteten Eosinlösung lediglich auf der Abspaltung von Brom in der oben angeführten Art und Weise beruhte.

Diese Untersuchungen wurden recht häufig wiederholt und ergaben stets dieselben Resultate. Es war vollkommen gleichgültig, ob es sich um rein wässrige oder solche Lösungen handelte, denen  $\text{NaHCO}_3$  zugesetzt worden war. Wurden die Lösungen zu lange belichtet, so daß sie so weit ausgebleicht waren, daß sie fast farblos wurden, so war ein Peroxyd nicht mehr nachzuweisen. Es macht den Eindruck, als ob die Zerstörung des Farbstoffes das gebildete Peroxyd verbraucht hätte. Man kann es sich aber auch so erklären, daß das gebildete Peroxyd eben ein Farbstoffperoxyd gewesen ist und daher in den fast farblosen Lösungen auch nicht mehr vorhanden sein kann.

Mit Chlorophylllösung gingen diese Versuche überhaupt nicht. Es kam dort anscheinend gar nicht zu einer nachweisbaren Peroxydbildung, sondern die Oxydation des Chlorophylls ging so rasch vor sich, daß dazu der gesamte aktivierte Sauerstoff verbraucht wird. Außerdem könnte die geringe Benzidinblaufärbung durch die grüne Farbe des Chlorophylls verdeckt werden, wie es schon von dem Fluoreszein angenommen wurde.

Jedenfalls hat sich gezeigt, daß in den stark ausgebleichten Farbstofflösungen die Peroxydmenge so gering gewesen ist, daß sie sich dem Nachweis entzog. Die Feinheit der Benzidinblaureaktion hat ebenfalls ihre Grenzen. Eine zu geringe Menge von Peroxyd ist nicht nachweisbar. Die Jodprobe in der oben angewandten Form

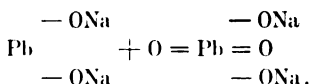
ist schon wesentlich empfindlicher. Mit ihr konnten noch Peroxyd-mengen nachgewiesen werden, die auf Benzidin nicht mehr einwirkten. In diesem Falle versagte sie aber ebenfalls.

### Darstellung eines stabilen Peroxyds durch den photodynamischen Effekt

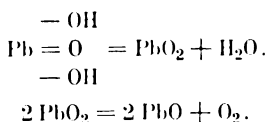
Um diesen Übelstand zu beheben, wurde versucht, ein stabiles Peroxyd anzureichern. Es handelte sich darum, Peroxyde herzustellen, die beständiger sind als die entstandenen metastabilen Körper. Am einfachsten wäre es natürlich gewesen,  $\text{MnO}_2$  herzustellen. Es genügte schon, zu einer  $\text{NaHCO}_3$ -haltigen Lösung ein neutrales Mangansalz hinzuzufügen, um nach der Belichtung  $\text{MnO}_2$  nachweisen zu können. Da aber Mangan in alkalischer Lösung sowieso Sauerstoff aus der Luft unter Bildung von  $\text{MnO}_2$  aufnimmt, so ist diese Reaktion verhältnismäßig wenig charakteristisch und einwandfrei. Man ist niemals sicher, ob diese  $\text{MnO}_2$ -Bildung wirklich auf die Fluoreszenzwirkung zurückzuführen ist. Allerdings waren einige Versuche, das Entstehen von Braunstein, seinen Hydraten und Manganverbindungen in Bikarbonatlösungen durch Sauerstoffaufnahme ohne Licht aus der Luft nachweisen, ergebnislos. Wir können also deren Entstehen auf den photodynamischen Effekt zurückführen.

Da einige Versuche, eine Nickelverbindung darzustellen, sehr zweideutig ausfielen, schlug Herr Privatdozent Dr. ZIEGENSPECK vor, mit Blei zu arbeiten.

Wenn man zu einer alkalischen Bleilösung (d. h., wenn sich das Bleihydroxyd wieder in überschüssiger Alkalilauge gelöst hat) irgendein stark oxydierendes Mittel hinzugibt, wie unterchlorige Säure, Chlor oder Wasserstoffsuperoxyd, so entsteht ein hell- bis dunkelbrauner Niederschlag von metableisaurem Natrium:



Erhitzt man diesen entstandenen von Na durch Säure befreiten Niederschlag auf  $100^\circ$ , so entsteht dunkelbraunes Bleisuperoxyd, erhitzt man es höher, so entsteht  $\text{PbO}$  von gelber Farbe (16 a).



Metableisäure ist gegen weiteren Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd einigermaßen beständig; sie wird nur leicht von Säuren zerstört. Sie verhält sich ganz wie ein Peroxyd (17), wenn sie ihrer Struktur nach auch nicht als ein solches aufzufassen ist; sie macht also aus KJ beim Ansäuern mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  Jod frei. Es wurde natürlich versucht, ob sie mit Benzidin in genau derselben Weise reagiert wie Wasserstoffsuperoxyd. Wenn man Metableisäure mit 10 ccm Wasser und 1—2 Tropfen alkoholischer Benzidinlösung versetzt, so entsteht nach tropfenweisem Ansäuern mit 10 % Essigsäure sofort Benzidinblau<sup>1)</sup>. Ein Zusatz von Peroxydase, also schwach hämolytischem Serum, war nicht nötig, die Metableisäure gab diese Reaktion schon ganz von alleine. Dieselbe Reaktion hatte anlässlich von Vorlesungsversuchen Herr Privatdozent Dr. ZIEGENSPECK mit Braunsteinniederschlägen erhalten. Auch hier bildete sich sofort mit Benzidin, ohne einen Zusatz von Peroxydase oder  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Benzidinblau.

Es wurde nun weitestgehend untersucht, ob Blei in irgendeiner anderen Form diese Reaktion gibt, die der eines Peroxyds entspricht. Bleisalze allein gaben keine peroxydische Reaktion. Die alkalische Bleihydroxydlösung konnte längere Zeit an der Luft stehen, ohne daß sich Metableisäure bildete. Es fiel nur Bleikarbonat aus, das keine Peroxydwirkung zeigte. Nur einmal, bei längerem Stehen (14 Tage) in der Sonne, entstand eine geringe Menge von Metableisäure, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß bei der Verdunstung der Lösung sich etwas Wasserstoffsuperoxyd gebildet hatte, das dann die Fällung erzeugte. Ein so langes Stehen kam bei den Belichtungsversuchen nie in Frage, außerdem wurden als Kontrolle blinde Versuche angesetzt. Wenn die Lösung gekühlt wurde, bildete sich auch bei tagelangem Belichten keine Spur von Metableisäure. Nachdem nun eine derartige Reaktion gefunden war, bei der ein peroxydischer Körper entsteht, der nicht so leicht wieder zersetzt wird, konnte zu Versuchen geschritten werden, diesen durch die Belichtung fluoreszierender Farbstofflösungen herzustellen. Die Metableisäure fällt als unlöslicher Körper aus und kann dann noch durch Verdunkeln des Grundes der zur Belichtung benutzten Gefäße gegen eine kaum zu befürchtende Reduktion durch metastabile Peroxyde geschützt werden.

Es wurden nun folgende Versuche ausgeführt: Die vorher erwähnten Versuche, bei denen mit Benzidin nach der Belichtung

---

<sup>1)</sup> Bei Cuprisalzen fand NOACK (2 b) eine ähnliche Reaktion.

im Dunkeln noch ein Peroxyd festgestellt wurde, wurden nun mit der alkalischen Bleihydroxydlösung wiederholt. Zu 500 ccm einer Fluoreszein- und einer Eosinlösung, die zwei Stunden unter Kühlung in der Sonne gestanden hatte, wurden 10 ccm alkalischer Bleihydroxydlösung zugegeben. Die gleichen Mengen von Dunkelkontrollösungen wurden genau so behandelt. Diese Lösungen wurden möglichst rasch filtriert. Bei den belichteten Lösungen zeigte sich eine geringe Menge des braunen Niederschlags, der bei den Dunkelkontrollen fehlte. Die Niederschlagsmenge war nicht sehr groß, es zeigte sich nur ein schwacher brauner Belag auf dem Filter. Nachdem dieser Niederschlag gut durchgewaschen war, wurde er auf peroxydische Reaktionen untersucht. Teile des Filters mitsamt dem darauf haftenden Niederschlag wurden sowohl mit KJ und  $H_2SO_4$ , als auch mit Benzidin und Essigsäure auf Peroxyd geprüft. In beiden Fällen war das Ergebnis positiv. Die Abscheidung von Jod war so stark, daß die ganze Lösung blau gefärbt wurde, während sich bei der Benzidinprobe lediglich das Papier blau färbte. Es war also eine peroxydische Reaktion festzustellen. In den belichteten Lösungen mußte eine geringe Menge von Peroxyd enthalten gewesen sein.

Es wurden nun neue Versuche unternommen, um größere Mengen von Metableisäure herzustellen. Die alkalische Bleihydroxydlösung wurde jetzt den fluoreszierenden Farbstofflösungen sofort zugesetzt und erst dann wurden diese Lösungen belichtet. Nach einstündiger Belichtung zeigte sich am Boden der Gefäße ein geringer brauner Niederschlag. Dieser wurde abfiltriert und dann auf seine peroxydische Wirkung untersucht. Diese wurde auch in diesem Fall wiederum festgestellt.

Die Versuche wurden nun häufig wiederholt, und immer wieder wurde dasselbe Resultat erhalten. Um den Einwand auszuschalten, daß das Peroxyd sich nur aus der geringen Verdunstung der belichteten Lösungen gebildet hatte, wurden gleichzeitig alkalische Bleihydroxydlösungen derselben Konzentration ohne den Zusatz des fluoreszierenden Farbstoffs belichtet. In diesen Kontrollösungen zeigte sich niemals ein Niederschlag von Metableisäure. Daß die Dunkelkontrollösungen natürlich niemals eine Abscheidung von Metableisäure zeigten, braucht wohl nicht besonders erwähnt zu werden. Es wurden auch durch Korken verschlossene Gläser mit Farbstofflösung belichtet und in diesen ebenfalls dieselbe Reaktion festgestellt. Hiermit dürfte wohl der Einwand beseitigt sein, daß

die Metableisäure durch das bei der Verdunstung entstehende Wasserstoffsuperoxyd gebildet wurde. Diese Niederschläge von Metableisäure wurden bei der Belichtung durch Sonnenlicht und ebenso bei der Belichtung mit einer Bogenlampe erhalten.

Es muß eine bestimmte, zwar beobachtete, aber nicht genau verfolgte Beziehung zwischen der Peroxydbildung und der Stärke des Überschusses von Natronlauge bestehen. In allzu starken Alkalilösungen, und ebenso in sehr schwachen, ging die Reaktion schlecht, doch immerhin spurenweise.

Auch bei der Bildung von Metableisäure wurden Versuche angesetzt unter Ausschluß des Luftsauerstoffs. Ausgekochte Fluoreszein- und Eosinlösungen wurden mit erhitztem Paraffin überschichtet, wie es NOACK gemacht hatte (18), oder in Reagenzgläser eingeschmolzen. Zur Kontrolle wurde stets ein offenes Glas mit derselben ausgekochten Lösung belichtet. Die Metableisäure bildete sich in den Lösungen, zu denen die Luft Zutritt hatte, verhältnismäßig langsamer als es sonst in nicht ausgekochten Lösungen der Fall gewesen war. Die verschlossenen Lösungen zeigten in zwei Fällen eine ganz minimale Bildung von Metableisäure, die sich durch eine gerade noch sichtbare Benzidinblaubildung nachweisen ließ, während sonst überhaupt keine Reaktion festgestellt werden konnte. Auch diese Versuche zeigen die notwendige Anwesenheit von Luftsauerstoff. Ohne diesen ist die Peroxydbildung nicht möglich.

### Versuche mit Chlorophylllösungen

Es wurde nun untersucht, ob mit Chlorophylllösungen dieselben Resultate erzielt werden konnten. Die Schwierigkeit besteht darin, daß Chlorophylllösung durch den Zusatz von Alkalien verändert wird. Dieses war nicht zu umgehen. Die so veränderten, schwach alkalischen Chlorophylllösungen fluoreszieren noch, wenn auch schwächer als unveränderte Chlorophylllösung. Die Fluoreszenzwirkung muß daher auch wesentlich schwächer sein, sich sonst aber vollständig gleich verhalten. Es wurde zu Äthyl- und Methyl-Chlorophyll-Auszügen alkalische Bleihydroxydlösung gegeben. Es entstand sofort ein weißer Niederschlag, der keinerlei peroxydische Reaktion zeigte. Fügt man zu diesen Lösungen Wasserstoffsuperoxyd hinzu, so fiel Metableisäure aus. Dasselbe mußte also der Fall sein, wenn sich durch die Belichtung ein metastabiles Peroxyd bildete. Es wurde nun versucht, dieses durch die Belichtung zu erhalten.

Eine ganze Reihe von Versuchen verlief ergebnislos. Die grüne Farbe der Chlorophylllösungen verdeckte die geringe Blaufärbung, die bei der Benzidinfärbung entstehen konnte, vollständig. Dieses war durch Kontrollversuche festgestellt worden. Es mußte versucht werden, die geringe Menge gebildeter Metableisäure aus der Chlorophylllösung herauszubringen. Die belichteten Lösungen wurden in der Zentrifuge stark geschleudert, und der Niederschlag mehrfach durchgewaschen. Die Niederschläge waren stets stark grün gefärbt infolge von mitgerissenem Chlorophyll. Dieses färbte bei den Proben auf Benzidinblau die Lösungen immer noch so stark grün, daß eine geringe Benzidinblaubildung verdeckt wurde. Deshalb wurde das Chlorophyll mit Äther herausgelöst und dann erst versucht, die Benzidinblaureaktion zu erhalten. Das gebildete Benzidinblau wird vom Äther nicht gelöst. Die Lösung war nun unter der grünen Ätherschicht vollständig klar und bei einer jetzt vorgenommenen Prüfung mit Benzidin und Essigsäure war auch die geringste Benzidinblaubildung zu erkennen. Auf diese Art und Weise war es auch möglich, bei den belichteten Chlorophylllösungen die Bildung von Metableisäure nachzuweisen. Natürlich war untersucht worden, ob Äther in wässriger Lösung eine derartige Reaktion zeigt. Es zeigte sich aber stets, daß dieses nicht der Fall war. Die Peroxydwirkung konnte daher nicht vom Äther ausgegangen sein. Es wurde sowieso zu den Versuchen Aether pro narcosi benutzt, der peroxydfrei sein soll. Die zum Vergleich angesetzten Dunkelkontrollen zeigten auch nach tagelangem Stehen nicht die geringste Bildung eines peroxydischen Niederschlags.

Es zeigten also nicht nur fluoreszierende organische Farbstofflösungen, sondern auch Chlorophylllösungen dieselbe Peroxydbildung. Da in den Chloroplasten das Chlorophyll in fluoreszierendem Zustande vorhanden ist, muß auch dort eine Peroxydwirkung stattfinden. NOACK hat bei seinen Versuchen mit unveränderten Chloroplasten auch dieselbe Oxydationswirkung festgestellt wie mit Chlorophylllösungen (19). Man ist daher zu der Annahme berechtigt, daß bei der Assimilation zunächst aktiver Sauerstoff oder eine  $\text{HO}\equiv$  Gruppe gebildet wird, die dann auf die Kohlensäure einwirkt, sie in ein Peroxyd überführt und deren Reduktion zum Formaldehyd bewirkt. Wie diese Reduktion zustande kommt, läßt sich nicht mit Sicherheit sagen. Alle in dieser Richtung unternommenen Versuche führten zu keinem Resultat. Es sind eine Menge von Hypothesen aufgestellt worden, die diesen

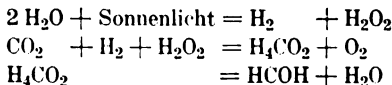
Vorgang erklären sollen. Von diesen sollen nur diejenigen erwähnt werden, welche die Bildung eines Peroxyds bei der Assimilation berücksichtigt haben. Nach den Arbeiten NOACKS und den in vorliegender Arbeit niedergelegten Resultaten dürfte an dieser Tatsache nicht mehr zu zweifeln sein.

Seit KLEIN und WERNER (20) den Formaldehyd als Zwischenprodukt bei der Assimilation festgestellt haben und somit die BAYERSche Formaldehydhypothese bestätigten, handelt es sich nur noch darum, den Verlauf des Assimilationsvorganges festzustellen. Als gegeben zu betrachten sind auf der einen Seite die Kohlensäure und das Peroxyd, auf der anderen der Formaldehyd, welcher zu Kohlehydraten kondensiert wird.

Es muß also eine Reduktion der Kohlensäure erfolgen, damit der Formaldehyd entstehen kann. Wie denkt man sich nun diesen Vorgang?

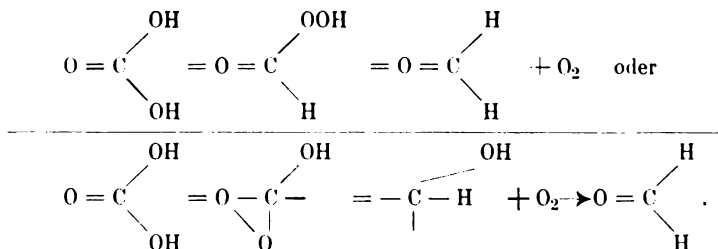
### Einige Hypothesen über den Verlauf der Assimilation

Zunächst soll die schon einmal erwähnte Theorie (4, 5) von WIELAND-THUNBERG besprochen werden. Diese besagt, daß das Wasser aktiviert wird und dabei Wasserstoff und Wasserstoffsuperoxyd entsteht. Diese sollen die Kohlensäure unter Bildung von Orthoformaldehyd angreifen, wobei Sauerstoff frei wird. Der Orthoformaldehyd seinerseits zerfällt in Formaldehyd und Wasser.



Diese Hypothese beruht von vornherein auf einer falschen Voraussetzung, da ja gar nicht das Wasser bei der Assimilation aktiviert wird, sondern der Luftsauerstoff. Dieser bildet erst ein Peroxyd, wie es von NOACK nach der Reaktionsweise angenommen und in dieser Arbeit bestätigt wurde. Der Verlauf der Peroxydbildung würde dann folgender sein:  $2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + \text{Energie} = 2\text{H}_2\text{O}_2$ . Wenn das Wasserstoffsuperoxyd mit der Kohlensäure in der oben angegebenen Weise reagieren würde, so würde das in folgender Art und Weise geschehen:  $\text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}_2 = \text{H}_4\text{CO}_2 + 2 \text{O}_2$ . Es würden also zwei Moleküle Sauerstoff entstehen, was mit den bisher bei der Assimilation beobachteten Resultaten nicht übereinstimmt. Man kann daher wohl annehmen, daß der Verlauf der Assimilation nicht in dieser Weise stattfinden wird.

WILLSTÄTTER (21) denkt sich die Bildung des Formaldehyds derartig, daß er durch eine intramolekulare Umlagerung der Kohlensäure erfolge, was unter Luftausschluß stattfinden kann. Er hält den Luftsauerstoff bei der Assimilation für nicht notwendig, mußte aber selbst zugeben, daß die Assimilation erst dann beginnt, wenn eine Spur von Sauerstoff zugegen ist. Die Umlagerung der Kohlensäure denkt er sich in folgender Art und Weise:

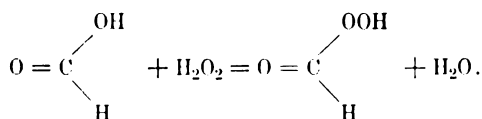


Wenn der Vorgang wirklich so verläuft, ist es nicht ersichtlich, warum dazu Luftsauerstoff notwendig ist. Diese Notwendigkeit ist nicht anders zu erklären, als daß der aktivierte Sauerstoff die Reduktion der Kohlensäure bewirkt. Eine minimale Menge von Luftsauerstoff ist zur Einleitung des Assimilationsvorganges notwendig, weil die später gebrauchten Mengen von Luftsauerstoff bei der Assimilation durch Abspaltung von molekularem Sauerstoff bei der Reduktion der Kohlensäure entstehen.

Neu ist hier der Gedanke, daß als Zwischenglied bei der Assi-

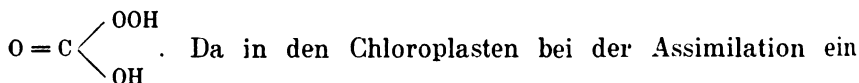
milation die Perameisensäure auftritt:  $\begin{array}{c} \text{OOH} \\ \diagup \\ \text{O}=\text{C} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array}$ . Diese kann

man sich entstanden denken aus der Oxydation von Ameisensäure. Dieser Vorgang ist nach HOUBEN-WEYL (22) durchaus möglich. Bei der Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Ameisensäure entsteht eine Perameisensäure von oben angeführter Konstitution

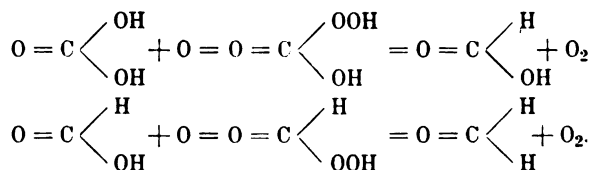


Nach WILLSTÄTTER müßte man also auch mit der Ameisensäure als Zwischenprodukt rechnen, deren Entstehen durch Reduktion der Kohlensäure zu erklären wäre. Schon ERLÉNMEYER (23) nahm diese als Zwischenprodukt bei der Assimilation an, wenn er

sich ihre Konstitution auch ganz anders dachte. Bei der Reduktion der Kohlensäure nimmt WOCKER (24) als Zwischenprodukt die Perkohlensäure an. Nach den Arbeiten von RIESENFELD und REINHOLD (25) ist das Vorhandensein von Perkohlensäure erwiesen. Es würde sich bei der Annahme von WOCKER allerdings nicht um eine Perkohlensäure im Sinne von RIESENFELD und REINHOLD handeln, sondern um ein Additionsprodukt von Kohlensäure und Wasserstoffsuperoxyd, wie es von diesen beiden Forschern bezeichnet wurde. WOCKER schreibt der Perkohlensäure folgende Formel zu:



Peroxyd entsteht, liegt die Bildung der Perkohlensäure durchaus im Bereich der Möglichkeit. Die Reduktion der Perkohlensäure zu Ameisensäure durch Abspalten von molekularem Sauerstoff könnte man sich durch die Einwirkung von Fermenten hervorgerufen denken. Die Oxydation dieser so entstandenen Ameisensäure zu Perameisensäure würde dann ebenfalls durch den aktivierten Sauerstoff hervorgerufen werden und ihre Reduktion könnte man sich genau ebenso denken wie bei der Perkohlensäure. So würde als Endpunkt der Formaldehyd entstehen. In Formeln ausgedrückt würde der Vorgang folgendermaßen aussehen:



Der umgekehrte Vorgang, die Oxydation des Formaldehyds über Ameisensäure zu Kohlensäure in alkalischer Lösung, ist seit langem bekannt (26). Der oben angeführte Vorgang wäre also eine Umkehrung dieser CANNIZZAROSCHEN Reaktion.

WILLSTÄTTER erhielt bei seinen Arbeiten ein Additionsprodukt von Kohlensäure an Chlorophyll. Wenn in belichteten Lösungen von Fluoreszenten sich, wie NOACK annimmt, Farbstoffperoxyde bilden, so wäre die Möglichkeit vorhanden, daß der aktivierte Sauerstoff nicht direkt an das Chlorophyll herantritt, sondern an die mit diesem verbundene Kohlensäure. Bei der Spaltung dieser Verbindung würde wieder Chlorophyll zurückgebildet werden, sowie Ameisensäure und molekularer Sauerstoff. Mit der Ameisensäure könnte dieser Vorgang sich dann nochmals in derselben Weise

wiederholen wie bei der Kohlensäure. In diesem Fall würde die Annahme von NOACK zutreffen, daß die Reduktion der Kohlensäure unter Wiederherstellung der Fluoreszenten vonstatten geht. Er stellte sich diesen Vorgang wie folgt vor: Der aktivierte Sauerstoff bildet mit dem Acceptor ein Peroxyd, bei der Assimilation also mit der Kohlensäure. In der gleichen Weise bildet er ein Peroxyd mit den Fluoreszenten. Diese beiden Peroxyde reduzieren sich gegenseitig unter Wiederherstellung des Fluoreszenten. Diese Annahme steht aber nicht im Einklang mit den in dieser Arbeit gefundenen Resultaten. Nach NOACKS Ansicht müßte ein hinzugefügtes Peroxyd die Farbstoffe oder das Chlorophyll vor einer Oxydation schützen. Dies ist nicht der Fall gewesen, sondern die Zerstörung der Fluoreszenten ging wesentlich rascher vor sich. Bei einem Additionsprodukt von Chlorophyll und Kohlensäure wäre aber die Wiederherstellung des Chlorophylls in der oben angegebenen Weise sehr gut denkbar und mit der Annahme NOACKS zu vereinen.

### **Versuche, die Kohlensäure durch ein Peroxyd zu reduzieren**

Eine ganze Reihe von Forschern versuchte die Reduktion der Kohlensäure über Ameisensäure zu Formaldehyd durchzuführen. Die oben gegebene hypothetische Erklärung des Assimilationsvorganges wurde schon öfter zu verwirklichen versucht. Man ging bei diesen Versuchen von Carbonaten und Wasserstoffsuperoxyd aus. So versuchte WISLICENUS die Reduktion von Natriumbicarbonat (27). Er fand Formaldehyd. Leider stellte sich bei seinen Arbeiten heraus, daß der Formaldehyd nicht durch die Reduktion der Kohlensäure entstanden war, sondern aus organischen Beimengungen, die das Wasserstoffsuperoxyd zu Stabilisierungszwecken enthielt. THUNBERG ging vom Bleicarbonat aus und verwandte ein Wasserstoffsuperoxyd, das frei von allen Stabilisierungszusätzen war (4, 5). Der gefundene Formaldehyd stammte aber ebenfalls nicht von der reduzierten Kohlensäure, sondern war aus Spuren von Acetat entstanden, mit denen das Bleicarbonat verunreinigt war, wie WIELAND nachweisen konnte (5). Zuletzt meldeten RUPP und SCHLEE (28) die Reduktion der Kohlensäure zu Ameisensäure und Formaldehyd. Sie mußten aber ihre eigene Arbeit widerrufen, weil der gefundene Formaldehyd wiederum aus den organischen Stabilisierungszusätzen stammte. Mit frisch destilliertem Wasserstoffsuperoxyd wiederholten sie die Versuche

noch einmal und konnten keinen Formaldehyd nachweisen (29). Alle bisher unternommenen Versuche zeigten Fehlresultate.

Verfasser hatten eine ganze Reihe von Versuchen ausgeführt, um die Reduktion von  $\text{NaHCO}_3$  durch die peroxydische Wirkung belichteter fluoreszierender Lösung zu erreichen. Als Sauerstoffüberträger waren sowohl Mn und Fe, als auch hämolytisches Serum verwendet worden. Diese Versuche waren bei Sonnenlicht und bei künstlicher Belichtung durch eine Osramnitralampe gemacht worden. Sie führten ebenfalls zu keinem Resultat. Der Formaldehyd sollte nach der NEUBERGSchen Methode mit Dimedon (Dimethylcyclohexandion) abgefangen werden, wie es KLEIN und WERNER (20) gemacht hatten. Diese Methode, den Formaldehyd nachzuweisen, ist nicht so empfindlich wie die Farbnachweise. Es gehören hierzu größere Mengen von Formaldehyd. Wurde Dimedon belichteten, fluoreszierenden Lösungen sofort zugesetzt, so diente es als Acceptor und wurde zerstört; es war dann nicht mehr nachzuweisen.

Eine Ausnahme bildeten lediglich Versuche, die mit rohen Chlorophyllauszügen gemacht wurden, denen  $\text{NaHCO}_3$  zugesetzt worden war. Es war hier gleichgültig, ob man als Lösungsmittel Methyl-, Äthylalkohol oder Aceton verwandte. Diese Lösungen wurden solange belichtet, bis das Chlorophyll vollkommen zerstört worden war. Es wurde durch die Lösungen ein Gemisch von Luft und  $\text{CO}_2$  hindurchgeleitet. Dann wurden diese Lösungen abdestilliert und das Destillat mit Dimedon auf Formaldehyd geprüft. In sämtlichen Fällen entstand eine schwache Trübung von ausfallendem Formaldomedon. Der Rückstand wurde eingedampft auf  $130^\circ$  erhitzt und dann mit Magnesium reduziert. Dann wurde die Lösung wieder abdestilliert und das Destillat mit Dimedon auf Formaldehyd geprüft. Die Reduktion war ausgeführt worden, um etwa vorhandene Ameisensäure in Formaldehyd überzuführen. Diese Versuche ergaben etwas stärkere Trübungen. Die Niederschläge wurden abfiltriert, mehrfach umkristallisiert und geprüft. Der Schmelzpunkt stimmte mit dem von Formaldomedon überein, ebenso verhielt sich eine Löslichkeitsprobe. Bei den Niederschlägen handelte es sich also tatsächlich um Formaldomedon. Kontrollversuche, die ohne Zusatz von  $\text{NaHCO}_3$  ausgeführt waren, hatten diese Trübungen nicht gezeigt. Man wäre daher zu der Annahme berechtigt, daß das Formaldehyd durch Reduktion der Kohlensäure entstanden sei. Da aber das Chlorophyll ein so sehr komplizierter

Körper ist, so ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß bei seiner Zersetzung Spuren von Formaldehyd entstanden sind (Methylester!). Daher wurde dieses Ergebnis hier lediglich mitgeteilt, ohne sicher behaupten zu wollen, die Reduktion der Kohlensäure durch belichtete Chlorophyllösungen durchgeführt zu haben.

### **Versuche, Peroxyde bei der Chemosynthese nachzuweisen**

Die Chemosynthese ist ein ungemein wenig Assimilate erzeugender Prozeß. Man kann daher bei ihm keine große Ausbeute an Peroxyden erwarten. Wir wählten für unsere Untersuchungen Nitritbakterien. Eine ganze Reihe von Versuchen hatte einen negativen Ausfall. Da gelangten wir durch eine andere Arbeit unseres Institutes in den Besitz einer ungemein energisch nitrifizierenden Kultur. Mit dieser hatten wir die Möglichkeit, mit der Bleimethode Peroxyde in sehr geringem Ausmaße nachzuweisen. Mit Benzidinblau darf man hier nie direkt arbeiten, weil die Nitrite mit dem Benzidin sich zu Farbstoffen vereinigen. Nach dem Abfiltrieren gelang uns die Reaktion mit dem Bleisuperoxyd. Die Reaktion mit Jod ist hier nur mit größter Vorsicht anwendbar, da die Kulturen Eisensalze enthalten. Diese stören bei vorsichtigem Arbeiten die Metableisäure-Reaktion mit Benzidin nicht. Darüber hat übrigens NOACK bereits behandelt.

Nach diesem Ergebnis hat es den Anschein, als ob die Chemosynthese der Bakterien ein analoger Vorgang zur Photosynthese ist. Das eine Mal wirkt das Sonnenlicht die Peroxyde erzeugend, das andere Mal die energischen Oxydationsprozesse chemischer Natur, die nebenbei die Peroxyde liefern, welche die Quelle der Assimilate sind. Dadurch würde auch die Kluft zwischen der Photosynthese und Chemosynthese überbrückt. Diese Forderung müssen wir ja aus phylogenetischen Gründen erheben. Dies Ergebnis bedarf einer erweiterten Nachprüfung, wozu auch in unserem Institut die Anfänge gemacht sind.

### **Zusammenfassung**

Im folgenden sollen die in dieser Arbeit niedergelegten Resultate noch einmal kurz zusammengefaßt werden.

Der aktivierte Sauerstoff ruft nicht nur eine peroxydische Wirkung in den belichteten Lösungen hervor, sondern er kann ein labiles Peroxyd bilden, das auch nach der Belichtung in den Lösungen bestehen bleibt. Die entstehenden Mengen sind allerdings sehr gering. Bei Zugabe von geeigneten Acceptoren kann ein Per-

oxyd gebildet werden, das aus der Lösung ausfällt und in größerer Menge entsteht. Bei Abwesenheit von Luftsauerstoff ist eine Oxydationswirkung nicht zu bemerken, ebensowenig eine Peroxydbildung. Eine Aktivierung von Wasser, Kohlendioxyd oder Wasserstoff findet nicht statt.

Die Oxydationswirkung von Wasserstoffsuperoxyd, die im Licht etwas größer ist als im Dunkeln, wird durch Zugabe von Fluoreszenten und darauffolgende Belichtung erheblich verstärkt, was durch das erhöhte Bleichen von Farbstoffen oder Kupferchlorophyll festgestellt werden konnte.

Eine Reduktion der Kohlensäure durch die peroxydische Wirkung belichteter fluoreszierender Farbstofflösungen herbeizuführen, konnte nicht erreicht werden. Eine Bildung von Formaldehyd und Ameisensäure durch Belichten natriumbicarbonathaltiger Chlorophylllösungen konnte wegen der komplizierten Zusammensetzung des Chlorophylls trotz negativ ausfallender Dunkelkontrollen nicht als einwandfrei genug angesehen werden, um die Reduktion der Kohlensäure zu Formaldehyd als erwiesen zu betrachten.

### Abstract

The activated oxygen does not only produce a peroxydical effect on fluorescent bodies in the lightened solutions, but it may also form a labile peroxyde that continues to last in the solution after exposure. The resulting quantity is very small indeed. By addition of suitable acceptors a peroxyde can be formed that, precipitating of the solution, arrises in greater quantities. In absence of atmospheric oxygen no oxydation will be noticed and no formation of peroxyde. An activation of water, carbodioxyd or hydrogen does not occur.

The oxidation effect of hydrogen peroxyde which is somewhat greater in light than in the dark becomes considerably strenghtened by the addition of fluorescents, followed by exposure to light, this has been determined by the increased bleaching of colouring matter or copper chlorophyll.

It has not been possible to obtain a reduction of the carbonic acid by the peroxydical effect of fluorescent solutions of colouring matters exposed to light. A formation of formaldehyde and permic acid by the exposure of chlorophyll solutions, containing sodium bicarbonate, was owing to the complicated composition of the chlorophyll, despite negative dark controls, not possible to be

considered as sufficiently certain, to prove the reduction of carbonic acid to formaldehyde.

Trials with nitrit-bacteria have furnished important proofs for the fact that peroxydes arise also in the chemosynthese. If this result should be supported by further investigations, the principal accordance of photosynthese and chemosynthese would be established, this would be of great phylogenetical importance.

### Literatur

Außer der Literaturzusammenfassung von BÖDLER in Mez, Archiv XX (1927) habe ich folgende Arbeiten berücksichtigt: 1. Die Naturwissenschaften XIII, S. 989. — 2a. NOACK, KURT, Zeit. f. Botanik, 1920, 12, 337 ff., 1925, 17, 482 ff. — 2b. Naturwissenschaften XIV, 383. — 3. I. STRACK und R. MEYER, Physik. Zeitschrift 8. P. PRINGSHEIM, Z. f. Physik, 1921, 10, und Fluoreszenz und Phosphoreszenz im Lichte der neueren Atomtheorie, Berlin 1921. — 4. Svensk Kemisk Tidskrift, 1923, 145, Z. f. Ph. Chemie 106, 305 (1923). — 5. Ann. d. Chemie 436, S. 241 ff. — 6. Z. f. Botanik 1925, 17, S. 491, 509 ff. — 7. N. PRINGSHEIM, Jahrb. f. wiss. Botanik 1879—81, 12, S. 340, 41. — 8. R. WILLSTÄTTER und A. STOLL, Untersuchungen über das Chlorophyll, Berlin 1913. STERN, Z. f. Botanik 1921, 13. — 9. WILLSTÄTTER und STOLL, l. c. — 10. WILLSTÄTTER u. STOLL, l. c. NOACK, KURT, Z. f. Botanik, 1925, 17, S. 496. — 11. ERDMANN, Lehrbuch d. anorg. Chemie, 157. — 12. NOACK, KURT, Z. f. Botanik, 1920, 12, S. 299, 314. — 13. NOACK, KURT, Z. f. Botanik, 1920, 12, S. 297. — 14. NOACK, KURT, Z. f. Botanik, 1925, 17, S. 482 ff. — 15. NOACK, KURT, Z. f. Botanik, 1925, 17, S. 536. — 16a. TREADWELL, Band I, S. 165. — 16b. TREADWELL, Band II. — 18. NOACK, KURT, Z. f. Botanik, 1925, 17, S. 491. — 19. NOACK, KURT, Z. f. Botanik, 1925, 17, S. 500 ff. — 20. Biochem. Zeitschrift 168, S. 340 ff. — 21. WILLSTÄTTER u. STOLL, Untersuchungen über die Kohlensäureassimilation, Berlin 1918. — 22. HOUBEN-WEYL, III, 267. — 23. ERLÉNMEYER, Berichte d. Chem. Ges., X, 634. — 24. WOCKER, G. Pflügers Archiv, 176, 1919. — 25. B. d. Chem. Ges., 1919, 42, 4377. — 26. BEILSTEIN, Band I, 563. — 27. Ber. d. Chem. Ges., 1918, 15, I, 942. — 28. Biochem. Zeitschr. 1926, 172, S. 373. — 29. Biochem. Zeitschr. 1927, 181, Heft 1—3.

### Nachtrag

Während der Drucklegung vorliegender Arbeit erschien die Arbeit von GAFFRON: Die photochemische Bildung von Peroxyd bei der Sauerstoffübertragung durch Chlorophyll (Ber. d. Chem. Gesellsch., 1927).

GAFFRON hat sich mit der Frage beschäftigt, ob sich bei der photochemischen Sauerstoffübertragung durch fluoreszierende Farbstoffe Peroxyde dieser Farbstoffe bilden. Alle Versuche, derartige Peroxyde nachzuweisen, sind negativ ausgefallen. Dagegen fand er, daß bei der Photooxydation von aliphatischen Aminen durch Chlorophyll Peroxyde entstehen, die Acceptorperoxyde sind und nicht Farbstoffperoxyde.

Wenn er in Amylamin gelöstes Chlorophyll belichtete und dann wieder verdunkelte, so erhielt er in der Lösung so viel peroxydischen Sauerstoff, wie während der Belichtung absorbiert worden war. Durch Zusatz eines Katalysators (z. B.  $\text{MnO}_2$ ) zu der verdunkelten Lösung konnte dieser Peroxydsauerstoff quantitativ entwickelt werden. Er ließ sich auch jodometrisch nachweisen und bestimmen, indem die vorher belichtete Lösung im Dunkeln in saure Jodkalilösung eingegossen wurde.

Eiweißstoffe und primäre aliphatische Amine werden auf photodynamischem Wege oxydiert. Die Lösungsmittel sind dabei von Einfluß. Bei der Oxydation durch  $\text{KMnO}_4$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  entstehen andere Produkte, in diesem Falle Isonitril.

Die Sauerstoffabsorption wurde gasometrisch gemessen. Diese Versuche wurden mit Äthylchlorophyllid und Fluoreszein ausgeführt. Der Sauerstoff findet sich nach der Reaktion zum größten Teil als Peroxyd in Lösung. Auch im Dunkeln zersetzt sich das Peroxyd von selbst. Der Luftsauerstoff ist also nur locker gebunden. Es entstand Aminperoxyd, bei langer Belichtung auch  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Bei Gegenwart von Wasser tritt weniger Peroxyd auf, es ist aber Wasserstoffsuperoxyd. Verfasser benutzte zum Nachweis von  $\text{H}_2\text{O}_2$  Titanlösung.

Es zeigt sich also, daß GAFFRON genau dieselben Resultate erhalten hat, wenn auch auf anderem Wege, wie sie hier in dieser Arbeit niedergelegt sind. Zum erstenmale wurde der Nachweis von Peroxyd in belichteten Farbstofflösungen, wie er in vorliegender

Arbeit beschrieben ist, in der Examensarbeit von BÖDLER (Mez, Archiv XX, 1927) erwähnt, die im Juni 1927 eingereicht wurde. Es sind also gleichzeitig beide Arbeiten vollkommen unabhängig voneinander ausgeführt worden und es zeigt sich die erfreuliche Tatsache, daß sie zu denselben Resultaten geführt haben. Von besonderem Interesse ist noch die Tatsache, daß GAFFRON seine Versuche auch mit Chlorophyll ausführen konnte. Die Annahme, daß bei der Assimilation intermediär ein Peroxyd auftritt, gewinnt also immer mehr an Gewißheit. Es steht zu erwarten, daß dieses vielumstrittene Problem in absehbarer Zeit in befriedigender Weise gelöst wird.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Botanisches Archiv. Zeitschrift für die gesamte Botanik](#)

Jahr/Year: 1928

Band/Volume: [22](#)

Autor(en)/Author(s): Draheim Walter, Ziegenspeck Hermann

Artikel/Article: [Beiträge zur Assimilationstheorie 385-413](#)