

Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung des Chlorophylls.

Von

Julius Stoklasa, Johann Šebor und Emanuel Senft.

Mit Tafel III bis XII.

(Aus der chem.-physiol. Versuchsstation an der k. k. böhm. techn. Hochschule, Prag.)

Es ist fast schon 100 Jahre her (1817), als Pelletier und Caventou allen im alkoholischen Blätterauszuge vorhandenen Pigmenten den Namen „Chlorophyll“ beileigten, welche Benennung sich ausschließlich auf den grünen Blattfarbstoff bezog.

Seit dieser Zeit wurden zwar auf diesem Gebiete sehr viele Arbeiten ausgeführt, doch die chemische Zusammensetzung dieses kompliziert gebauten Blattfarbstoffes hat man bisher noch nicht völlig erforscht.

In den letzten Jahren waren es namentlich die grundlegenden Arbeiten Marchlewskis¹⁾, Willstätters²⁾ sowie seiner Schüler

- ¹⁾ L. Marchlewski u. P. Kozniewski, Zur Kenntnis des Chlorophylls. (Biochemische Zeitschrift 3, 302 [1906].)
- L. Marchlewski, Über Herrn Tswetts histor. Chlorophyllforschungen und seine Chlorophylline. (Ber. d. d. bot. Ges. 25, 225 [1907].)
- L. Marchlewski, Ein weiterer Beweis der chem. Verwandtschaft des Chlorophylls und Blutfarbstoffes. (Biochem. Zeitschrift 3, 320 [1907].)
- L. Marchlewski, Zur Phylloxanthinfrage. (Ebenda 7, 282 [1907].)
- L. Marchlewski und St. Mostowski, Zur Kenntnis des Blutfarbstoffes VII. (Zeitschr. f. physiol. Chemie 51, 464 [1907].)
- L. Marchlewski und J. Rettinger, Zur Kenntnis des Blutfarbstoffes VIII. (Ebenda 54, p. 151 [1907].)
- L. Marchlewski, Studien in der Chlorophyllgruppe I, L. Hildt, L. Marchlewski und J. Robel, Über die Einwirkung von Säuren auf Chlorophylle. (Biochem. Zeitschrift 10, 131 [1908].)
- L. Marchlewski und J. Rettinger, Zur Kenntnis des Hämopyrrols. (Biochem. Zeitschr. 10, 437 [1908].)
- L. Marchlewski II., Über die Umwandlung des Phyllotaonins in Phyltorhodine. (Ebenda 472 [1908].)
- L. Marchlewski, Zur Chemie des Blutfarbstoffes IX. (Zeitschr. f. physiol. Chemie 56, 316 [1908].)
- L. Hildt, L. Marchlewski u. J. Robel, Über die Umwandlung des Chlorophylls unter dem Einfluß von Säuren. (Extr. du Bull. Acad. des Sci. de Cracovie. Avril 1908.)
- T. Kozniewski u. L. Marchlewski, On the Conversion of Phyllotaonine into Phyltorhodine. (Ebenda. April 1908.)
- L. Marchlewski III., Eine neue Abbaumethode in der Chlorophyllchemie. (Biochem. Zeitschr. 16, 3 [1909].)
- H. Malarski u. L. Marchlewski IV., Über Zinkchlorophylle und Zinkphyllotaonine. (Ebenda 21, 523 [1909].)

(Fortsetzung der Fußnote ¹⁾ sowie Fußnote ²⁾ siehe nächste Seite.)

und Tswetts³⁾, die in der Chlorophyllchemie eine neue Phase eingeleitet haben. Durch diese Arbeiten, welche den chemischen

- L. Barabsz u. L. Marchlewski V, Der endgültige Beweis der Identität des Chlorophyllpyrrols und Hämopyrrols. (Ebenda 548 [1909].)
- Z. Leyko u. L. Marchlewski, Zur Kenntnis des Hämopyrrols II. (Ebenda 22, 464 [1909].)
- L. Marchlewski, Die Chemie der Chlorophylle. Braunschweig 1909.
- H. Malarski u. L. Marchlewski IV, Bestimmung des Chlorophylls in Pflanzenteilen. (Biochem. Zeitschr. 24, 319 [1910].)
- H. Malarski u. L. Marchlewski VII, Über Chlorophyllan, Allochlorophyllan und Chlorophyllpyrrol. (Ebenda 27, 246 [1910].)
- H. Malarski u. L. Marchlewski VIII, Über die Bildung des Phylloaonins aus Chlorophyllan. (Ebenda 28, 48 [1910].)
- ²⁾ R. Willstätter u. W. Mieg, Untersuchungen über Chlorophyll I. Über eine Methode der Trennung und Bestimmung von Chlorophyllderivaten. (Liebigs Annalen 350, I [1906].)
- R. Willstätter II, Zur Kenntnis der Zusammensetzung des Chlorophylls. (Ebenda 48 [1906].)
- R. Willstätter III u. F. Hocheder, Über die Einwirkung von Säuren und Alkalien auf Chlorophyll. (Ebenda 354, 205 [1907].)
- R. Willstätter IV u. W. Mieg, Über die gelben Begleiter des Chlorophylls. (Ebenda 355, I [1907].)
- R. Willstätter V u. A. Pfannenstiel, Über Rhodophyllin. (Ebenda 358, 205 [1907].)
- R. Willstätter VI u. M. Benz, Über kristallisiertes Chlorophyll. (Ebenda 269 [1907].)
- R. Willstätter VII, F. Hocheder u. E. Hug, Vergleichende Untersuchung des Chlorophylls verschiedener Pflanzen. (Ebenda 371, I [1909].)
- R. Willstätter VIII u. H. Fritzsche, Über den Abbau von Chlorophyll durch Alkalien. (Ebenda 33 [1909].)
- R. Willstätter IX u. Yas. Asahina, Oxydation der Chlorophyllderivate. (Ebenda 373, 227 [1910].)
- R. Willstätter u. H. H. Escher, Über den Farbstoff der Tomate. (Zeitschr. f. physiol. Chemie 64, 47 [1910].)
- R. Willstätter, Chlorophyll und seine wichtigsten Abbauprodukte. (Handbuch der Biochem. Arbeitsmethoden, herausgeg. von E. Abderhalden 2, 2. Hälfte, 671 [1910].)
- R. Willstätter u. A. Oppé, Vergleichende Untersuchung des Chlorophylls verschiedener Pflanzen. II. (Liebigs Annal. 1910, 378. I.)
- R. Willstätter u. A. Stoll, Über Chlorophyllase. (Ebenda S. 18.)
- R. Willstätter, E. W. Mayer u. E. Hüni, Über Phytol I. (Ebenda S. 73.)
- R. Willstätter u. A. Stoll, Spaltung und Bildung von Chlorophyll. (Ebenda 380, 148 [1911].)
- R. Willstätter u. M. Isler, Vergleichende Untersuchung des Chlorophylls verschiedener Pflanzen. III. (Ebenda 154.)
- R. Willstätter u. E. Hug, Isolierung des Chlorophylls. (Ebenda 177.)
- R. Willstätter u. M. Utzinger, Über die ersten Umwandlungen des Chlorophylls. (Ebenda 382, 129 [1911].)
- R. Willstätter, A. Stoll u. M. Utzinger, Absorptionsspectra der Komponenten und ersten Derivate des Chlorophylls. (Ebenda 385, 156 [1911].)
- R. Willstätter u. Yasuhiko Asahina, Über die Reduktion der Chlorophylle. I.
- ³⁾ M. Tswett, Über das Pigment des herbstlich vergilbten Laubes. (Ber. d. d. bot. Ges. 94 [1908].)
- M. Tswett, Ist der Phosphor an dem Aufbau der Chlorophylline beteiligt? (Ebenda 214 [1908].)
- M. Tswett, Über das Phäophytin und die Chlorophyllane nebst Schlussbemerkungen über das Phylloxanthin. (Biochem. Zeitschr. 10, 404 [1908].)
- M. Tswett, Natur des sogen. „kristallisierbaren Chlorophylls“ (Metachlorophyllins). (Ebenda 414 [1908].)
- M. Tswett, Das neue System der sogen. Chlorophyllderivate. (Ebenda 426 [1908].)

Charakter des Chlorophylls eingehend behandelten, wurden auch tatsächlich unsere Kenntnisse in dieser Frage wesentlich bereichert.¹⁾

Tswett²⁾ hat sich über Willstätters sogenanntes „krystallisierbares“ Chlorophyll in nachstehender Weise geäußert:

„Das sogenannte „krystallisierbare Chlorophyll“ (α -Metachlorophyllin) ist keine natürliche Komponente des Chlorophylls, sondern ein Kunstprodukt, welches bei der langsamen Extraktion der Blätter vieler Pflanzen unter Einwirkung noch unbekannter Faktoren des Zellchemismus aus den genuinen Chlorophyllinen entsteht. Momentan hergestellte, also unveränderte Chlorophyllauszüge sind stets frei von genanntem Derivat. In seinem Spektrum vereinigt dasselbe die Absorptionsbänder der Chlorophylline α und β und ist also als ein Sammelerivat dieser genuinen Farbstoffe zu betrachten.“

Den gleichen Standpunkt wie Tswett vertraten auch wir, nachdem die ersten Arbeiten Willstätters erschienen sind. Unsere Untersuchungsergebnisse divergieren, wie bekannt, mit jenen von Willstätter und seiner Schüler in manchen Richtungen.

Willstätter mit seinen Mitarbeitern behauptet, daß für krystallisierte und amorphe Chlorophylle ein Magnesiumgehalt charakteristisch ist und daß das Chlorophyll überhaupt phosphorfrei ist. Im Lichte seiner Forschungsergebnisse scheint bewiesen zu sein, daß Chlorophylle, wie sie durch Extraktion mit Alkohol oder anderen indifferenten Stoffen erhalten werden, niemals phosphorhaltig sind.

Auf Grund unserer Untersuchungen können wir uns jedoch dieser Ansicht nicht anschließen, vielmehr sind wir der Überzeugung, daß das Chlorophyll, wie es in der Pflanzenzelle vorkommt, niemals phosphorfrei ist. Es liegt uns aber fern, dadurch etwa die großen Verdienste, die sich Willstätter erworben hat, herabzusetzen, sondern wir wollen bloß bemerken, daß durch die Untersuchungen von Willstätter und seinen Mitarbeitern keineswegs der chemische Charakter des Chlorophylls vollständig klargelegt wurde, wie man allgemein annimmt.

Wir sind gemäß unseren Untersuchungsergebnissen fest überzeugt, daß das in der Pflanzenzelle vorkommende Chlorophyll, welches ein komplizierter organischer Körper ist mit dem Kunstprodukt, nämlich mit dem krystallisierten Chlorophyll, woselbst bloß Magnesium komplex gebunden vorkommt, nicht identisch ist. Das krystallisierte Willstättersche Chlorophyll hat mit dem natürlichen in der Pflanzenzelle vorkommenden nichts Gemeinschaftliches. Den chemischen Charakter der Krystalle vom Chlorophyll, welche

¹⁾ Ich will hier den ganzen Extrakt dieser Arbeiten nicht rekapitulieren, sondern verweise bloß auf die geistreichen Besprechungen Friedrich Czapeks in der Zeitschrift für Botanik. 1911. p. 43; 1912, p. 321.

²⁾ Tswett, M., Über die Natur des sogenannten „krystallisierbaren Chlorophylls“ (Metachlorophyllins). (Biochemische Zeitschrift X, 1908.)

sich nach der Methode von Borodin und Monteverde darstellen lassen, werden wir in der nächsten Abhandlung ausführlich besprechen.

Unsere langjährigen Studien dokumentieren, daß die von Stoklasa schon früher ausgesprochene Ansicht, daß dem Phosphor bei dem Aufbaue des Chlorophylls eine wichtige Rolle zukommt, durch die Arbeiten Willstätters nicht endgültig widerlegt wurde, wie manche Physiologen angenommen haben.

Wir können an dieser Stelle nicht unterlassen, auch unsere schon früheren Mitarbeiter, sofern uns dieselben ihre Unterstützung bei der Ausführung dieser Arbeiten angedeihen ließen, hier zu erwähnen. Es sind dies namentlich die Herren Prof. Dr. Brdlik, Dozent Dr. Just und Adjunkt Dr. Ernest, sämtliche an der k. k. böhmischen techn. Hochschule in Prag, ferner Eugen Vitek, Vorstand der Samenkontrollstation des Landeskulturrates für das Königreich Böhmen, und Prof. Dr. Zelenka in Chrudim.

Die vorliegende Arbeit zerfällt in folgende Kapitel:

- I. Zusammensetzung des Rohchlorophylls.
- II. Chemische Zusammensetzung der im Handel vorkommenden Chlorophyllpräparate.
- III. Mikrochemische Untersuchung des im Handel vorkommenden Chlorophylls.
- IV. Chemische Zusammensetzung des Chlorophylls aus der Blattsubstanz verschiedenartiger Pflanzen.
- V. Über den Einfluß der sich im Minimum befindenden Vegetationsfaktoren, Magnesium und Phosphor, auf die Entwicklung der Vegetation von *Polygonum fagopyrum* und *Zea Mais*.
- VI. Resumé.

I. Zusammensetzung des Rohchlorophylls.

Vor 17 Jahren hat Stoklasa eine ausführliche Arbeit über die Verbreitung und physiologische Bedeutung des Lecithins in der Pflanze¹⁾ publiziert, in welcher Arbeit er zu dem Resultate gekommen ist, daß Phosphor ein Bestandteil des Chlorophylls ist und daß ohne ihn die Entwicklung desselben, resp. die Entstehung der Chlorophyllkörner als Unmöglichkeit angesehen werden muß; durch seine ausführlichen Untersuchungen ist er zu der festen Überzeugung gekommen, daß das Studium der Chlorophyllfragen mit dem der Phosphatide überhaupt eng verbunden ist. Er ist damals zu der Annahme gelangt, daß das Chlorophyll nichts anderes ist, als Leci-

¹⁾ Julius Stoklasa, Sitzungsberichte der kaiserl. Akademie d. Wissenschaften in Wien. 1896. (Über die Verbreitung und physiol. Bedeutung des Lecithins in der Pflanze.)

thin, wobei die fetten Säuren durch eine bestimmte Gruppe von Chlorophyllan-Säuren ersetzt erscheinen.

Seine Forschungen über das Chlorolecithin haben in der neuesten Zeit bei Richard Willstätter¹⁾ keinen Anklang gefunden und versuchte der genannte Forscher auf Basis seiner eigenen Untersuchungen seine zahlreichen Beobachtungen anzuzweifeln.

Willstätter äußert sich in nachstehender Weise: „Ich habe beobachtet, daß das aus Gras oder aus Brennesseln isolierte Chlorophyll keinen Phosphor enthält oder nur ganz geringfügige Mengen, die von Verunreinigungen herrühren. Aus den Angaben, die der experimentelle Teil enthält, sei hier nur excerpiert:

„Rohchlorophyll aus frischen Brennesseln nach Kraus mit Holzgeist-Benzin gereinigt, enthielt 0,0108 % Phosphor.

Rohchlorophyll aus getrockneten Brennesseln, mittelst der colloidalen Lösung gereinigt, enthielt keinen Phosphor.

Rohchlorophyll aus frischem Gras, nach Kraus gereinigt, enthielt 0,0746 % Phosphor.

Übrigens hatte ich auch bei der Verseifung von 300 g eines, in einer späteren Abhandlung zu beschreibenden phylloxanthinartigen Chlorophyllderivates keine Spur von Glyzerin aufgefunden.“

Die Methode zur Konstatierung des Glyzeringehaltes gibt der Autor nicht an, wiewohl Näheres zu erfahren von großem Interesse wäre.

Stoklasa hat die Lecithinnatur des Chlorophylls in der neuesten Zeit weiter verfolgt und gelang es ihm abermals, aus frischen Spinatblättern durch nachstehende Methode ein Reinchlorophyll zu gewinnen, welches ebenfalls reich an Phosphor war. Wir verweisen hier auf Stoklasas Arbeiten in den Berichten der deutschen Botan. Gesellschaft Berlin 1907 und 1908.

75 kg reiner Spinatblätter wurden mit destilliertem Wasser gewaschen, in einer Dunkelkammer in dünnen Schichten auf Filterpapier getrocknet und dann in einer Hackmaschine in einen Brei verwandelt. Dieser Brei wurde zuerst mit Äther gewaschen und hierauf mit 166 l Äthyl-Alkohol in mehreren großen Kolben eine Woche lang in der Dunkelkammer bei gewöhnlicher Temperatur extrahiert. Die Alkoholextrakte wurden im Vakuum bei 40° C. abgedampft, der Verdampfungsrückstand in Alkohol aufgelöst, die Lösung nach G. Kraus²⁾ mit Wasser verdünnt und mittels Benzols das sogenannte Kraus'sche Kyanophyll abgeschieden.

Diese Prozedur erfuhr eine dreimalige Wiederholung und hatte den Zweck, womöglich Xantophyll und Karotin in der Alkohollösung abzuscheiden. Endlich wurde der dunkelgrüne Extrakt in Äther aufgelöst und mit Wasser, welchem Chlornatrium zugesetzt wurde, geschüttelt. Auf diese Weise vollzog sich die Absonderung der Ätherschicht von der Wasserschicht sehr leicht. Die reine Ätherlösung wurde abgedampft und mit absolutem Alko-

¹⁾ Richard Willstätter, Zur Kenntnis der Zusammensetzung des Chlorophylls. (Justus v. Liebig's Annalen der Chemie. Bd. 350. H. 1 u. 2.)

²⁾ G. Kraus, Zur Kenntnis der Chlorophyllfarbstoffe und ihrer Verwandten, Stuttgart 1872.

hol behandelt. Durch Abkühlung sonderte sich aus der Alkohol-lösung ein kompakter Niederschlag von metallischem Glanze und schwarzgrüner Färbung ab.

Eine gewisse abgetrennte Menge wurde bis zum konstanten Gewichte im Wasserbade getrocknet. Die Trocknung zum konstanten Gewicht vollzieht sich selten in mehreren Tagen, ja manchmal sogar erst in mehreren Wochen.

In einer Portion der so gewonnenen Substanz wurde der Phosphor, in der anderen der Stickstoff bestimmt. Für die Phosphorbestimmung betrug das Gewicht der benützten Menge 0,21 g. Diese wurde mit Natriumkarbonat und Natriumnitrat in einer Platinschale verbrannt, die verkohlte Substanz in ein Gefäß geschüttet und mit Salpetersäure angesäuertem Wasser gekocht. Im reinen Filtrate erfolgte mittels der Molybdänmethode die Bestimmung von Phosphorsäure. An $Mg_2P_2O_7$ wurden 0,022 g gefunden, was 2,91 % Phosphor entspricht. In einem anderen, abgewogenen Quantum, und zwar in 0,403 g wurde der Stickstoff bestimmt und hievon 1,12 % gefunden.

Durch diese präparative Methode hat Stoklasa, wie wohl angenommen werden kann, fast ein Reinchlorophyll erhalten, welches 2,91 % Phosphor enthielt.

Durch eine schon früher durchgeführte Isolierung wurde von ihm ein Reinchlorophyll mit 3,37 % Phosphor erhalten.

Einer von unseren Mitarbeitern, V. Brdlik, hat größere Quantitäten von Chlorophyll dargestellt, indem er 120,5 kg Spinatblätter mit 230 Liter chemisch-reinen Methylalkohols extrahierte.

Frisch gepflückter Spinat wurde gewaschen, getrocknet, d. h. in der Weise, daß das zur Abspülung verwendete Wasser verdunstete, worauf die so getrockneten Blätter in einer emaillierten Mühle zerrieben wurden. Zur Neutralisation der organischen Säuren im Extrakte wurde diesen etwas kohlen-saurer Kalk zugesetzt. Der erhaltene alkoholische Extrakt von 188 l, wurde mit 48 l chemisch reinen Benzols ausgeschüttelt. Die Benzolschicht, welche das Chlorophyll aufgenommen hatte (43 l) wurde bei etwa 40° C. abgedampft. Es wurden 65 g Chlorophyll gewonnen. Diese wurden behufs Entfernung der Stoffe, welche beim Ausschütteln aus der Alkoholschicht teilweise in die Benzolschicht gelangten, in Benzol aufgelöst. Der Rückstand wurde nach Abdampfen der Benzollösung direkt verseift, um das Chromophor, wie Hoppe-Seyler es bereits getan hat, abzutrennen. Die Verseifung des Rohchlorophylls erfolgte nach Abdampfen des Benzols durch Kochen mit konzentriertem Barythydrat. Das überschüssige $Ba(OH_2)$ wurde in gebräuchlicher Weise mittels Durchleitens von CO_2 herausgefällt und nach der Abkühlung filtriert. Auf dem Filter wurden neben verschiedenen Barytseifen unlösliche Barytsalze der genannten Chlorophyllansäuren festgehalten, welche nach Hoppe-Seyler als Chromogen des Chlorophylls angesehen werden. Das Filtrat wurde abgedampft (mit einigen Tropfen HCl behufs Überführung eventuell vorhandener freier Basen in Chlorhydrate angesäuert), der Rückstand einigemal mit absolutem Alkohol digeriert und auf diese Weise

das Filtrat in eine Partie alkoholischer Lösung und einen nach der alkoholischen Digestion im Wasser löslichen Rückstand geteilt. Ein bloß unbedeutender, Phosphor nicht enthaltender Teil blieb im Wasser unlöslich.

Da der alkoholische Teil Basenreaktionen mit Phosphorwolframsäure, Kaliumplatinjodid, Jodjodkalium lieferte, wurde durch Platinchloridsäure eine Isolation von Aminen versucht. Die Kristalle der zweiten Fraktion, die gewonnen wurden, wiesen einen Geruch nach Trimethylamin auf, während jene der ersten Fraktion bedeutende Mengen von Kalium enthielten. In den Kristallen der zweiten Fraktion wurde das Cholin nachgewiesen. Das durch fraktionierte Kristallisation gewonnene Cholinplatinchlorid ergab beim Verbrennen folgende Resultate:

- I. 0,1235 g lieferten 0,03945 g Pt = 31,94 %.
- II. 0,1164 g lieferten 0,0374 g Pt = 32,13 %.
- III. 0,1962 g lieferten 0,0626 g Pt = 31,9 %.

Cholinplatinchlorid erfordert theoretisch 31,64 % Pt. Da das Präparat auf Versuchstiere keine toxische Wirkung ausübte, enthielt es kein Neurin; auch Betain konnte in dem Präparate nicht nachgewiesen werden.

Der wässerige Anteil. Der nach der alkoholischen Digestion zurückbleibende im Wasser lösliche Rückstand gab einen flockigen Niederschlag mit absolutem Alkohol und trübte sich beim Erwärmen. Durch Erkalten wurde er wieder klar und lieferte mit Bleiacetat abermals Niederschläge. Diese Reaktionen deuteten auf Baryumglyzerinphosphat, welches auch wie folgt, isoliert und identifiziert wurde. Die konzentrierte Lösung wurde mit absolutem Alkohol gefällt, der Niederschlag auf dem Filter gesammelt und nach erfolgter Durchwaschung mit absolutem Alkohol in kühlem Wasser aufgelöst und von neuem mit absolutem Alkohol gefällt. Diese Operation wurde fünfmal wiederholt; der schließlich auf dem Filter gesammelte Niederschlag wurde zum konstanten Gewicht bei 95° getrocknet. Es resultierten 0,212 g Baryumglyzerinphosphat. Ein Teil hiervon wurde in einer kleinen Menge Wassers aufgelöst und Schwefelsäure zur Ausscheidung von Baryumsulfat und Bestimmung des Baryums hinzugefügt. Die im Filtrate überschüssige Schwefelsäure wurde mittels Baryumchlorid ausgeschieden, konzentriert und das Glyzerin nach der Methode Zeisel und Fanto¹⁾ bestimmt. Das überdestillierende Isopropyljodid wurde im Zeiselschen Apparate mittelst Silbernitrat aufgefangan. Das ausgeschiedene Jodsilber wurde bei 120° C getrocknet und gewogen.

Belege:

- I. 0,0953 g der Substanz ($\text{BaC}_3\text{H}_7\text{PO}_6 + 2 \text{H}_2\text{O}$). 0,0658 g $\text{BaSO}_4 = 0,0387 \text{ g} = 40,63 \%$ Ba (Theorie 40 %).
- 0,059 AgJ = 0,0231 $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3 = 24,29 \%$ $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ (Theorie 26,78 %).
- II. 0,1022 g der Substanz 0,0702 g $\text{BaSO}_4 = 0,0413 \text{ g}$ Ba = 40,39 %.
- 0,0638 g AgJ = 0,025 $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3 = 24,26 \%$.

¹⁾ S. Zeisel und R. Fanto, Zeitschr. f. d. landw. Versuchswesen in Osterreich. p. 729 (1902).

Die verhältnismäßig hohen Ziffern für das Baryum in Hinsicht auf den festgestellten Glyzeringehalt finden ihre Erklärung einerseits in dem unzureichenden quantitativen Verlauf bei der Bestimmung des Glyzerins, andererseits ist es auch möglich, daß bei der Zersetzung des Baryumglyzerinphosphats mittels Schwefelsäure, behufs Entfernung des Baryums die freigewordene Glyzerinphosphorsäure sich teilweise zersetzt; im Filtrate verdampft dann beim Konzentrieren ein wenn auch unbedeutender Teil des Glyzerins. Glyzerinphosphorsäure findet sich daher auch im Rohchlorophyll vor, wie schon Hoppe-Seyler angedeutet hatte.

Die Bestimmung des Phosphors im Reste der ursprünglichen Benzollösung hatte für diese Versuche keine Bedeutung, da sämtlicher Phosphor, wegen unvollständiger Verseifung dieses Restes, in das Filtrat nicht übergeht (durch Parallelversuche wurde festgestellt, daß etwa 20% Phosphor zurückbleiben), und deshalb wurde jener Filtratphosphor als Basis weiterer Beobachtungen angesehen. Das nach der Verseifung resultierende Filtrat wurde auf 2000 ccm verdünnt und hievon 50 ccm zur Bestimmung des Gesamtphosphors verwendet. Es wurden 0,0242 g $Mg_2P_2O_7 = 0,0067$ g P gefunden, somit im ganzen Filtrate 0,2691 g Phosphor. Die restlichen 1950 ccm wurden abgedampft, mit absolutem Alkohol digeriert und auf diese Weise, so wie es bei den vorherbeschriebenen Identifikationsarbeiten geschehen ist, in zwei Partien: eine alkoholische und eine wässrige Lösung geteilt.

In der alkoholischen Fraktion sollte die gesamte Menge des Platins in dem Niederschlage der alkoholischen Lösung der Chlorplatinsäure bestimmt werden. Deshalb wurde auf 500 ccm verdünnt, hievon auf die Platinbestimmung 25 ccm abgeteilt, mit Chlorplatinsäure gefällt und 0,451 g Platin gefunden, d. i. in 500 ccm des alkoholischen Teils 9,02 g Platin und umgerechnet auf die ursprüngliche Menge von 2000 ccm des Filtrats 9,25 g Platin, welches also die Basen und das Kalium gebunden hatten.

Während des Experimentierens wurde das Vorhandensein von Kali in dem ausgeschiedenen Niederschlage der alkoholischen Lösung der Chlorplatinsäure konstatiert. Um die an das Kali gebundene Platinmenge festzustellen, wurde wie folgt vorgegangen:

Die restlichen 25 ccm von 500 ccm alkoholischen Digestion wurden mit einer alkoholischen Lösung von Chlorplatinsäure gefällt. Der Niederschlag wurde aufgefangen, gewaschen und die organischen Stoffe in einem Wasserstoffgasstrom verbrannt. Der Rückstand wurde wiederholt mit heißem Wasser ausgelaugt, das Filtrat abgedampft, schließlich der Tiegel in dunkle Rotglut gebracht und das Chlorkalium gewogen.

Belege:

In 25 ccm wurden 0,0165 g KCl $= 0,00865$ g K gefunden oder in 500 ccm alkoholischer Digestion 0,173 g K.

In 2000 ccm des ursprünglichen Filtrats also 0,179 g K, welche 0,445 g Platin gebunden hatten.

Es betrug somit das Gesamtgewicht des ursprünglichen

Platins	9,250 g
Platins gebunden an Kali	0,445 g
Verblieb somit an Basen gebundenen Platins	<u>8,805 g Pt.</u>

Der wässerige Anteil. Nach alkoholischer Digestion wurde der Rückstand im Wasser aufgelöst, ein kleiner, nicht löslicher Teil auf dem Filter festgehalten und mit Salpeter und Soda behufs Feststellung des Phosphors verbrannt, wobei gefunden wurde, daß Phosphor in der unlöslichen Partie nicht vorhanden ist.

Das wässerige Filtrat des phosphorhaltigen Rückstandes verdünnte man demnach auf 250 ccm, hievon wurden 25 ccm für die neuerliche Bestimmung des Phosphors nach der alkoholischen Digestion abgetrennt, um zu kontrollieren, ob ein Teil des Phosphors nicht in die alkoholische Fraktion übergegangen sei. Das war tatsächlich auch der Fall, und zwar wurden in 25 ccm : 0,0434 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0121$ g P gefunden, somit berechnet auf das Gesamfiltrat:

von 250 ccm	0,1210 g P
wobei jedoch vorhanden sein sollten	0,2624 g P
	<u>0,1414 g P</u>

welch letztere daher in die alkoholische Digestion übergegangen sind, d. i. 54,01%, also über die Hälfte.

Darauf kam man leider erst dann, als das Filtrat nach der Ausscheidung des Cholins aus der alkoholischen Fraktion durch Platinchlorid bereits anderweitig verarbeitet war, so daß es zu einem Versuche nicht mehr kommen konnte, wodurch sichergestellt werden sollte, ob der Phosphor in einer organischen alkohol-löslichen Verbindung vorhanden war. Anorganischer Phosphor würde in dem Baryumniederschlag gleich nach der Verseifung zurückgeblieben sein.

Die nächste Erklärung wäre gewesen, ob nicht vielleicht beim Abdampfen des Filtrats nach der Verseifung, als etliche Tropfen Salzsäure zur Überführung der freien Cholinbase im Chlorhydrat hinzugetan wurden, der Überschuß an Salzsäure die Zersetzung eines Teiles des Baryumglyzerinphosphates in freie, allerdings in alkohollösliche Glyzerinphosphorsäure verschuldet hat, welch letztere sich eventuell an das, wie nachgewiesen, vorhandene Kali hätte binden und als ebenfalls in Alkohol lösliche glyzerinphosphorsaures Kali in diesen alkoholischen Teil hätte übergehen können.

Diese Umstände hätte ein Überschuß von Salzsäure verschulden müssen, von welcher jedoch, wie oben angeführt, bloß etliche Tropfen hinzugefügt wurden, und dann hätte ein bedeutender Überschuß derselben vorhanden sein müssen, um mehr als die Hälfte des gesamten Glyzerinphosphates frei zu machen.

Es erübrigt noch die Möglichkeit zu erwähnen, daß vielleicht jener Phosphor sich schon als Kaliumglyzerinphosphat im Filtrate nach der Verseifung befunden habe, wiewohl es nicht gut denkbar ist, daß dasselbe der Wirkung des Barythydrats beim Kochen widerstanden hätte.

Die Trennung mit Aceton.

Das Rohchlorophyll löste sich im Aceton sehr leicht; dagegen waren die Lecithine in diesem Agens nur sehr wenig löslich, so daß man sich des Acetons zur Ausscheidung der Phosphatide aus ihren alkoholischen Lösungen bediente. Brdlik hat versuchsweise in Lecithinpräparaten sichergestellt, daß die Lecithine im Aceton nicht ganz unlöslich sind, wie die Literatur hie und da angibt. Es wurde von ihm dagegen gefunden, daß z. B. nach 2 Minuten langer Digestion 7% Lecithin in das Aceton übergegangen sind; nach dem Schütteln übergangen nach weiteren 10 Minuten 13,4% und nach einer weiteren Stunde 22,5%. Nach dreitägiger Digestion bestimmte er abermals den Phosphor. Es waren 27,5% Lecithinphosphor in die Acetondigestion, zusammen sind also 70,4% des Gesamtlecithins nach dreitägiger Digestion in Aceton übergegangen.

Belege:

100 ccm alkoholischer Lösung von bekanntem Lecithingehalte, entsprechend 0,01834 g P wurden abgedampft und mit Aceton digeriert. Es übergangen:

Nach 2 Minuten	0,0048 $Mg_2P_2O_7$ = 0,0013 P = 7,0 %
Nach weiteren 10 Minuten	0,0089 $Mg_2P_2O_7$ = 0,00240 P = 13,4 %
Nach einer weiteren Stunde	0,0149 $Mg_2P_2O_7$ = 0,00414 P = 22,5 %
Nach weiteren 3 Tagen	0,0182 $Mg_2P_2O_7$ = 0,00506 P = 27,5 %
	<hr/> insgesamt 70,5 %

Der Chlorophyllrückstand löste sich ungemein leicht in Aceton, d. h. selbst bei Bereitung einer konzentrierten Lösung (1 g des Rückstandes von Epheurochlorophyll in 50 ccm) ist in einer Minute alles in Lösung übergegangen. Um sicherzustellen, ob vielleicht bei Gegenwart des Chlorophylls nicht irgend eine Adsorption der farblosen Lecithine durch das Chlorophyll erfolgte, mengte Brdlik (vor dem Abdampfen) die Lecithine zu dem Letzteren. Hierauf wurde mit Aceton digeriert, bis sich die neuen Partien desselben nicht mehr färbten (dreimal während einer Minute), und in dieser acetonischen Digestion der Phosphor bestimmt.

Belege:

350 ccm alkoholischen Chlorophylls, welche 0,00545 g Phosphor entsprechen, wurden 50 ccm alkoholischer Lecithinlösung hinzugefügt, entsprechend 0,0917 g Phosphor; dieses Gemenge wurde abgedampft und mit Aceton digeriert.

Die acetonigen Partien wurden abgedampft und der Phosphor bestimmt. Es wurden 0,0462 g $Mg_2P_2O_7$ abgewogen, d. i. 0,0128 g Phosphor. Zieht man den Chlorophyllphosphor (0,0128—0,0054) ab, so bleiben aufs Lecithin 0,0074 g Phosphor übrig, d. h. es sind somit 8,1% farblosen Lecithins in das Chlorophyll übergegangen. Berücksichtigt man aber die Summe des Chlorophyll- und Lecithinphosphors in dem Gemenge vor der acetonischen Digestion, d. i. 0,0971 g P und den in das Aceton übergegangenen Phosphor, d. h. 0,0128 g, so findet man, daß von demselben bloß

13,3% übergegangen sind, d. i. eine Abnahme im acetonigen Teile von 86,7% P. Wenn man jedoch diese Chlorophyllrückstände mit Aceton digeriert, findet man, daß der Phosphor im Acetonteil nicht abnahm, sondern im Gegenteil prozentuell auf die Trockensubstanz zugenommen hat.

Bei 30° C wurden sodann 500 ccm Chlorophyllbenzollösung abgedampft, der Rückstand fünfmal im Laufe von 24 Stunden digeriert (die Digestionswässer wurden zu jenen hinzugefügt, in welchen das Phytin bestimmt wurde). Diese Wässer waren nur schwach gelb verfärbt. Der Rückstand wurde in absolutem Äthylalkohol aufgelöst und diese Lösung mit Benzol ausgeschüttelt.

Die benzolige Partie wurde bei 30° C abgedampft und mittels Acetons digeriert, die zweite acetonige Partie, welche nur wenig grün verfärbt war, wurde nicht zu der Hauptpartie hinzugefügt. Die acetonige Hauptpartie wurde abgedampft und im Rückstande der Phosphor bestimmt.

Belege:

I. 1,129 g Rohchlorophylls. Abgewogen 0,0163 g $Mg_2P_2O_7 = 0,0045$ g P, d. i. 0,4% P.

Der Phosphorgehalt stieg durch diese Operation von 0,31% in der ursprünglichen benzoligen Lösung auf 0,4%, d. i. fast um ein Drittel. Man darf allerdings nicht übersehen, daß man durch die Lösung in Aceton zwar andern Reinigungsoperationen zuvor gekommen ist, durch welche verschiedene Verunreinigungen beseitigt werden, keineswegs aber das farblose Lecithin entfernt wird, und daß durch die Verringerung der Qualität des Rückstandes der Phosphorgehalt relativ gestiegen ist. Deshalb wurden nachstehende Parallelversuche ausgeführt:

Es wurde bei 30° C je 1 Liter benzoliger Lösung abgedampft. Der Rückstand wurde in einem Falle neuerdings mit Benzol gelöst, im zweiten mit Aceton digeriert und in beiden Fällen der Phosphor bestimmt.

Belege:

I. 5,736 g des Benzolrückstandes.

Abgewogen 0,07 g $Mg_2P_2O_7 = 0,0195$ g P, d. i. 0,33% P.

II. 5,710 g des Acetonrückstandes.

Abgewogen 0,0636 g $Mg_2P_2O_7 = 0,0177$ g P, d. i. 0,31% P.

Dieses unbedeutende Sinken des Phosphorgehaltes im Acetonrückstande kann keinerlei Einfluß auf die Deduktion über die Abwesenheit der farblosen Lecithine haben, nachdem vom Lecithinphosphor bei so kurzer Digestion mit Aceton 7% übergingen, während aus den angeführten Belegen klar ist, daß vom Phosphor des Rohchlorophylls 94% in die Acetonlösung übergegangen sind. Mit Rücksicht auf diese Beweise über die Abwesenheit der farblosen Lecithine ist die Erkenntnis interessant, zu der Just gelangt ist, nämlich, daß die ursprünglichen alkoholischen Extrakte der grünen Blätter eine Reaktion mit alkoholischen Lösungen von

Chlorplatinsäure gaben, während die alkoholische Lösung des gereinigten Rohchlorophylls (die ursprüngliche alkoholische Lösung wurde mit Benzol ausgeschüttelt, die benzolige Partie abgedampft und in absolutem Alkohol gelöst) diese Reaktion nicht mehr lieferte. Die also eventl. vorhandenen farblosen Lecithine würden demnach aus den alkoholischen Extrakten in den benzoligen Anteil nicht übergehen.

Nachdem sich nach Brdliks Ansicht physiologisch nachweisen läßt, daß eine bestimmte Beziehung zwischen der Bildung des Chlorophylls und der Gegenwart des Phosphors in der Pflanzenzelle besteht; da sich ferner der Phosphor immer im alkoholischen, eventuell im benzoligen Extrakte der grünen Blätter, und zwar in nicht unbedeutenden Mengen vorfindet und er weder den anorganischen, phosphorhaltigen Beimengungen, noch auch den farblosen Phosphatiden angehört, so kann daraus geschlossen werden, daß der Phosphor einen wichtigen Bestandteil des Chlorophylls bildet.

In unserer vorliegenden Arbeit wollen wir den Nachweis liefern, daß die Behauptung Willstätter's, welche dahin geht, daß sowohl Rohchlorophyll, als auch Reinchlorophyll keinen nennenswerten Phosphorgehalt aufweisen, unrichtig, sowie die von ihm diesbezüglich angegebenen Ziffern, die sich in Hundertsteln von Prozenten bewegen, vollständig fehlgegriffen sind. Wir vermögen uns schwer zu erklären, wie Willstätter vorgegangen ist, um in dem analytischen Teile seiner Untersuchungen zu einem so zweifelhaften Resultate zu gelangen.

Wir wollen hier zuerst die Beschreibung des experimentellen Teiles bei der Herstellung des Alkohol- und Benzol-Extraktes aus der Blattsubstanz verschiedener Pflanzen geben.

Zu unseren Untersuchungen wurde immer frisches, grünes Material im Gewichte von 2—5 kg von verschiedenartigen Pflanzen verwendet. Die Blätter wurden abgetrennt, dann mit destilliertem Wasser gewaschen und in der Dunkelkammer auf Filtrierpapier in dünnen Schichten getrocknet. Die so vorbereiteten Blätter wurden in einer Hackmaschine in einen Brei verwandelt und in einem abgewogenen Quantum des Gesamtbreis die Trockensubstanz bestimmt. Die Menge der Trockensubstanz bewegte sich zwischen 10—25 %. Aus der so erhaltenen breiigen Masse wurde in großen Kolben mittels doppelten Volumens, d. i. 4—10 Litern, Äthyl- oder Methyl-Alkohol in einer Dunkelkammer das Chlorophyll extrahiert. Nach 3—8 Tagen wurde der Alkoholextrakt durch Filtration von dem Blätterbrei entfernt und dann entweder direkt in dem Methyl- oder Äthylalkoholfiltrat der Phosphor bestimmt.

Wir haben auch die Reinigung des Chlorophylls nach dem Entmischungsverfahren von Kraus vorgenommen und zwar in der Weise, daß wir zu dem oben erwähnten Äthyl- oder Methylalkohol-Extrakte Wasser zusetzten, mit Benzol gut durchschüttelten und das Chlorophyll ausschieden. Diese Operation wurde mehreremal wiederholt, um das Chlorophyll von dem Karotin möglichst zu befreien.

Die Alkohol- oder Benzol-Extrakte wurden in einer Platinschale langsam abgedampft, zum konstanten Gewichte im Wasserbade getrocknet, dann mit Natriumkarbonat und Natriumnitrat in derselben Schale verbrannt und die Phosphorsäure nach der Molybdänmethode bestimmt. Richtunggebend für unsere Untersuchungen war in erster Linie der Gedanke, ob und welche Veränderungen mit dem Phosphorgehalt des Chlorophylls in den Blättern der Pflanzen in den verschiedenen Jahreszeiten vor sich gehen, und zwar hielten wir uns die Frage vor Augen, ob das Chlorophyll in den Perioden der vollen, grünen Frische der Blätter (etwa in den Monaten Mai, Juni und Juli) einen gleichen oder veränderten Phosphorgehalt aufweist, wie in den Perioden des sichtbaren vegetativen Verfalls, d. i. in den Monaten September und Oktober, zur Zeit des Vergilbens des Laubes.

Als Untersuchungs- und Vergleichungsobjekte wählten wir Blätter von Waldahorn (*Acer pseudoplatanus*). Selbstverständlich haben wir die Blätter stets von denselben Bäumen und immer vollkommen frische zu den einschlägigen Untersuchungen genommen.

Die Bestimmung des Phosphorgehaltes erfolgte stets in den Benzolextrakten, welche durch Reinigung nach dem Entmischungsverfahren gewonnen wurden.

Bemerken müssen wir noch, daß wir immer unter denselben Verhältnissen gearbeitet haben. Auf 2,5 kg frischer Blättersubstanz wurden 5 Liter Methylalkohol benützt. Die Extraktion dauerte 5 Tage und dann wurde immer dieselbe Menge Benzol und zwar 1½ Liter für das Entmischungsverfahren verwendet. Die folgenden Zahlen geben das Resultat unserer Untersuchungen in übersichtlicher Weise wieder:

Tabelle I.

Monat der Beobachtung	Trockengewicht d. Benzolextrakte in g	Gefundene Menge $Mg_2P_2O_7$ in g	P in % d. Trockengew. d. Extrakte
Am 20. Mai	1,043	0,036	0,959
Am 15. Juni	0,963	0,038	1,097
Am 8. Juli	1,005	0,049	1,355
Am 20. August	1,186	0,026	0,609
Am 11. September	0,925	0,009	0,270
Am 16. Oktober	0,932	0,002	0,059

Aus diesen Zahlen ist ersichtlich, daß im Monate Juli der Phosphorgehalt der größte war und zwar bezifferte sich derselbe auf 1,353 %, in den Monaten Mai und Juni auf ca. 1 %. Fast ganz unvermittelt sinkt im Monat August der Phosphorgehalt auf 0,6 % und im Monat September, in welchem die Blätter „gelb“ zu werden beginnen, auf 0,27 %; im Monat Oktober, in welchem das Blatt schon äußerlich das Aufhören jeder vegetativen Tätigkeit erkennen läßt, beträgt der Phosphorgehalt nur mehr 0,059 g.

Das sind sicherlich hinreichend beredete Ziffern, aus denen hervorgeht, daß, wenn das Chlorophyll aus den Blättern

verschwindet, auch der Phosphor nicht zugegen ist. Im Jahre 1906 stellten wir weitere Untersuchungen an. Im Monate September, zu einer Zeit, wo sich auf demselben Baume in der inneren Partie der Krone grüne und an der äußeren vergilbte Blätter befanden, nahmen wir am selben Tage Blätterproben und zwar mehrere schöne grüne Blätter und mehrere vollkommen gelb gewordene Blätter und analysierten sodann wieder die Benzolextrakte. Die Analysenresultate waren nun folgende:

Tabelle II.

	Trockengewicht der Benzol- Extrakte	Gefundene Mengen an $Mg_2P_2O_7$	Gefundene Mengen an P in % des Trockengew. der Extrakte
Grüne Blätter von Ahorn	1,326	0,0246	0,518 %
Gelbe Blätter von Ahorn	0,9621	0,0013	0,036 %

Dieselben Resultate haben wir bei Beobachtung der Zuckerrübe gewonnen. Die Trockensubstanz der Benzolextrakte der grünen Blätter hat immer einen Phosphorgehalt von 0,7—0,9 %, während der Benzolextrakt aus den gelb gewordenen Blättern einen Phosphorgehalt von bloß 0,01—0,03 % aufwies. Aus diesen Resultaten ist ferner ersichtlich, daß durch die Zersetzung des Chlorophylls der Phosphor aus den Blättern verschwindet, nachdem die Funktionen des ersteren beendet erscheinen. Diese Beobachtung hat Stoklasa schon vor 10 Jahren gemacht und ihre Ergebnisse publiziert. Die Ansichten E. Stahl's über das Vergilben des Laubes (siehe Berichte der deutschen Botanischen Gesellschaft, Heft IX, 1907) sind daher nicht neu.

Wir führen weiter die Daten der Analysen an, welche wir mit den Blättern verschiedener Pflanzen ausgeführt haben. In der Tabelle III sind diese Analysenresultate unserer Versuche niedergelegt.

Aus allen diesen Analysen geht hervor, daß wir in sämtlichen 18 Untersuchungsfällen nicht ein einziges Mal auf einen so niedrigen Phosphorgehalt gestoßen sind, wie ihm Willstätter auf Seite 56 seiner Arbeit als durchschnittlichen Höchstgehalt an Phosphor im Rohchlorophyll angibt. Die an dieser Stelle angegebenen Zahlen bewegen sich zwischen Spuren und hundertstel Prozenten. Frappieren muß es, daß sich Willstätter auf einigen Seiten seiner Arbeit betreffs der Angaben über den Phosphorgehalt im Rohchlorophyll widerspricht. Auf Seite 54 gibt er, wie oben erwähnt, nur Spuren von Phosphor im Rohchlorophyll an; aber in der Tabelle I (zur Seite 72) findet er in den Blättern der Petersilie in zwei Fällen 0,44 % Phosphor. In derselben Tabelle I konstatiert er in 6 Fällen (frische und trockene Brennessel) Spuren von Phosphor und in frischem und trockenem Grase Phosphormengen, die sich zwischen 0,07 und 0,13 % bewegen. In getrocknetem Spinat fand er 0,13 %, während

wir im Spinat immer über 1 % Phosphor und im trockenen Grase ca. 1 % Phosphor sichergestellt haben.

Die von Willstätter gefundenen Phosphormengen in den Blättern derselben Pflanzenarten, die auch wir untersucht haben, sind daher ca. 10mal geringer als die von uns gefundenen; eine Differenz, die sich sicherlich aus der differierenden Provenienz und verschiedenen Vegetationsfaktoren (Boden, Luft, Standort usw.) nicht erklären läßt, obwohl wir bei Gewinnung der Benzol-Extrakte dasselbe Verfahren genau eingehalten haben, wie es Willstätter

Tabelle III.

No.	Pflanzenart	Gewicht d. Alkohol-Extrakte (Trockengew.) in g	Gewicht d. Benzol-Extrakte (Trockengew.) in g	Gefundene Menge an $Mg_2P_2O_7$ in g	P in % des Trockengewichtes der Extrakte
1	Spinatblätter	2,2506		0,1006	1,24
2	Spinatblätter, junge u. alte	2,0815	1,0842	0,0596 0,1057	1,54 1,41
		0,99		0,0045	0,12
3	Milzfarn (<i>Asplenium</i>)		0,78	0,0238	0,85
4	Blätter von <i>Convallaria majalis</i>		0,4284	0,0054	0,35
5	Hühnerdarm (<i>Stellaria media</i>)		0,5491	0,0078	0,39
6	Weizenblätter		0,3319	0,0041	0,34
7	Roggenblätter		0,4074	0,0053	0,36
8	Haferblätter	1,3215		0,0106	0,22
9	Blätter von Roßkastanie	2,7266		0,0135	0,14
10	Weinstockblätter		0,4249	0,0091	0,59
11	Tannennadeln		0,1681	0,003	0,50
12	Gras	1,0171	1,913	0,0278	0,404
13	Gras	0,7688		0,0265	0,73
14	Trockenes Gras		0,0284	1,02	
15	Trockenes Gras		1,0171	0,0265	0,73
16	Trockenes Gras		1,673	0,0556	0,927
17	Trockenes Gras		1,8114	0,0604	0,929
18	Trockenes Gras		1,7987	0,0583	0,903
18	Blätter der Zuckerrübe		0,943	0,0268	0,79

angewendet hat. Wir müssen deshalb offen erklären, daß es uns ein unfabbares Rätsel ist, wie Willstätter zu so auffälligen, von den unsrigen so abweichenden Untersuchungsergebnissen gekommen ist. Wir haben alle denkbaren Operationsfehlerquellen berücksichtigt. So haben wir, um nur die wichtigsten anzuführen, die Substanz der zerriebenen Blätter einmal nur kurze, das andere Mal durch längere Zeit extrahiert; wir haben weiter nicht nur im Dunkeln, sondern auch bei voller Einwirkung des Tageslichtes gearbeitet, wir haben endlich auch die Alkohol- und Benzol-Extrakte dem Lichte ausgesetzt, um etwaige Operationsfehler aufzuklären. Obzwar wir schließlich alle diese Fehlerquellen in unseren Kalkül gezogen haben, erhielten wir doch niemals so niedrige Re-

sultate des Phosphorgehaltes, daß sie uns gestatten würden, die Befunde Willstätters als auch nur im Bereiche einer reellen Möglichkeit gelegen zu akzeptieren. Der Phosphorgehalt ist bei Berücksichtigung aller dieser Eventualitäten niemals auf $\frac{1}{100}$ ‰ oder gar auf Spuren, „die von Verunreinigungen herrührten“, herabgesunken. Man könnte da einwenden, daß wir ja selbst bei gewissen Pflanzenarten, wie z. B. bei den Blättern der *Convallaria majalis* und der Hafer- und Weizenpflanze ebenfalls nicht mehr als bis 0,3 ‰ Phosphor in dem Trockengewichte der Benzolextrakte nachgewiesen haben. Der niedere Phosphorgehalt im Trockengewichte der Benzolextrakte läßt sich aber dadurch erklären, daß trotz des Entmischungsverfahrens mit Benzol sich das Karotin und verschiedenartige andere Verbindungen aus den Alkoholextrakten gewisser Pflanzenarten nicht vollständig abscheiden lassen. Wir betonen hier ausdrücklich, daß das Reinchlorophyll aus gewissen Pflanzenarten nur schwer, manchmal überhaupt nicht abgeschieden werden kann. Erst durch Abdampfen der Benzolextrakte und neuerliche Auflösung des Rückstandes in Alkohol und Anwendung eines weiteren Entmischungsverfahrens steigert sich der Phosphorgehalt allmählich in den Benzolextrakten, und so gelang es uns denn auch tatsächlich, die Phosphorextraktion aus Weizen- und Roggenblättern auf 0,7 ‰ bis 0,9 ‰ zu erhöhen. Daraus ist zu ersehen, daß, was auch schon von anderen Chlorophyllforschern ausgesprochen wurde, die chemische Natur des Chlorophylls nicht in allen Pflanzenarten die gleiche ist.

M. Tswett¹⁾ versuchte in einem Artikel, betitelt „Ist der Phosphor an dem Aufbau der Chlorophylline beteiligt?“ die Divergenz der analytischen Befunde aufzuklären, welche zwischen den Untersuchungen Willstätters und den unserigen in bezug auf den Phosphorgehalt im Rohchlorophyll bestehen. Wiewohl der Autor sich in der Einleitung zu seiner Arbeit dahin äußert: „Es wäre offenbar höchst unwissenschaftlich, einer vorgefaßten Meinung zuliebe die Richtigkeit der Bestimmungen des einen oder des anderen Forschers zu bezweifeln, sondern man muß, um die Frage zu beurteilen, beide Zahlenreihen berücksichtigen“, sagt er doch in den unmittelbar darauffolgenden Zeilen, diesen einzig richtigen Standpunkt einer gerechten Kritik verlassend und in Inobjektivität verfallend wörtlich: „Betrachten wir zunächst den Phosphorgehalt der Rohextrakte von Chlorophyll. Willstätter bereitete dieselben aus getrockneten, in diesem Zustande während Wochen oder Monaten aufbewahrten Blättern oder aus zerstampftem, frischem Material, welches zuerst in Holzgeist digeriert wurde, um es vom Wasser zu befreien.“ Tswett fährt ferner fort: „Beim Aufbewahren des getrockneten Materials kann es nun sehr wohl geschehen, daß Lecithane oder Phosphatide ihre Löslichkeit in Alkohol teilweise einbüßen. Es ist bekannt, daß Lecithin in dieser

¹⁾ M. Tswett, Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft. H. 3. 1908.

Hinsicht unbeständig ist und daß es sogar beim Liegen an der Luft nicht nur in Alkohol, sondern auch in Äther teilweise unlöslich wird. Beim präliminieren Digerieren der frischen Blätter in Holzgeist findet aber möglicherweise ein Auslaugen der Lecithane statt oder ein Unlöslichwerden derselben. (cf. Schulze und Lickirnick l. c.) Aceton ist kein gutes Lösungsmittel für das Lecithin.“

Stoklasa¹⁾ und seine Mitarbeiter haben aber ihre Rohextrakte aus kurz getrockneten, wasserhaltigen Blättern hergestellt, welche dann direkt mit Methyl- oder Äthylalkohol ausgezogen wurden. Es ist einleuchtend, daß unter diesen Umständen auch die farblosen Lecithane der Blätter, dessen Existenz Stoklasa wohl nicht in Abrede stellt, in Lösung gehen müssen.“²⁾

Hierzu müssen wir zunächst bemerken, daß wir grüne Blätter, frisch gepflückte und keineswegs, „kurz getrocknete“ Blätter verwendeten, wie der genannte Autor annimmt, und daß unsere Trocknung nur so weit ging, als sie zur Beseitigung des Waschwassers erforderlich gewesen ist. Um ganz genau zu sein, müssen wir hinzufügen, daß es sich nur um eine Abtrocknung der Oberfläche der Blätter gehandelt hat und keineswegs um eine Trocknung und Entfernung der Vegetationswässer in der Blattsubstanz.

Es ist somit nicht zu bestreiten, daß unser Rohchlorophyll-extrakt weit eher den Anspruch hat auf die Bezeichnung eines intakten Chlorophylls, als jener Willstätters, dessen Ausgangsmaterial alte, welke und trockene Blätter gebildet haben, welche obendrein der Einwirkung des Lichtes, der Luft und vielleicht auch den Einflüssen bakteriologischer oder enzymatischer Natur ausgesetzt gewesen sind; kurz der von Willstätter gewonnene alkoholische Extrakt enthielt ein kadavriertes und alteriertes Chlorophyll. Durch die erwähnten Wirkungen konnte es geschehen, daß das intakte Chlorophyll zersetzt und seine phosphatidische Komponente ebenso eliminiert wurde, wie durch die Einwirkung der in der Pflanzenzelle vertretenen verdünnten organischen Säuren (Oxalsäure usw.), das Magnesium aus dem Chlorophyllmolekül eliminiert wird, wie Willstätter dies nachgewiesen hat. Damit wäre erwiesen, oder ist erwiesen, warum manche Forscher im Rohchlorophyll das Magnesium nicht gefunden haben. Selbst Willstätter äußert sich in seiner Arbeit³⁾: „Bei der Reaktion mit Säuren, selbst mit schwachen, tritt nämlich das Magnesium sehr leicht aus. Bei der Einwirkung von Oxalsäure erhielten wir ein mit olivbrauner Farbe lösliches Derivat, das keine Asche mehr gibt; es soll Phäophorbin, genannt werden (von phorbe, Kraut)“.

Ganz dasselbe kann auch betreffs des Phosphors der Fall sein, jedoch mit dem Unterschied, daß der Grund der Aus-

¹⁾ Stoklasa, Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft. 26 a. p. 69.

²⁾ Willstätter, Liebigs Annalen der Chemie 350. 1906.

³⁾ Willstätter, Über kristallisierte Chlorophylle. (Justus Liebigs Annalen der Chemie. 1908. H. 3.

scheidung der Phosphorkomponente aus dem Chlorophyll bisher nicht aufgeklärt ist und diese ebenso durch die Wirkungen des Lichtes, der atmosphärischen Oxydation, oder der Bakterien oder schließlich der Tätigkeit der Enzyme herbeigeführt worden sein konnte.

Von großer Bedeutung sind gewiß die Untersuchungen, welche Hans Vageler¹⁾ über das Vorkommen von Phosphatiden in vegetabilischen und tierischen Stoffen vornahm. Er fand, daß sich beim Trocknen in Alkohol lösliche Phosphatide zersetzen und äußert sich in seiner diesbezüglichen Arbeit wie folgt:

„In Übereinstimmung mit Soxhlet konnte auch ich konstatieren, daß die Abnahme der in Alkohol löslichen Phosphatide um so beträchtlicher war, je länger der Prozeß des Trocknens andauerte. Auch gebe ich zur Erleichterung der Beurteilung der Beschaffenheit der Substanz den Wassergehalt mit an. Es gelangte einmal frisches Gras zur Untersuchung mit einem Wassergehalt von 85,55 ‰, dann wurde eine Probe desselben Grases 10 Stunden bei 70 bis 80° getrocknet; der Wassergehalt betrug jetzt 4,898 ‰. Eine zweite Probe wurde ca. 2 bis 4 Tage unter öfterem Wenden auf Sieben ausgebreitet, lufttrocken gemacht, und zwar bei offenem Fenster und Sommerwärme, aber im Schatten. Der Wassergehalt des so erhaltenen Grashes betrug noch 24,02 ‰. Die Untersuchung, auf Trockensubstanz bezogen, ergab folgendes:

	Phosphor ‰
Gras frisch	0,0780
Gras getrocknet	0,0584
Grasheu	0,0333

Der Phosphorgehalt ist also um die Hälfte gesunken.

Vageler bestätigt unsere früheren Untersuchungsergebnisse, die dahin lauten, daß durch Trocknen der Pflanzenmasse die Phosphatide, die als Bestandteil des Chlorophylls zu betrachten sind und in Alkohol und Äther löslich sind, in solche Verbindungen übergehen, die in Alkohol und Äther unlöslich sind. Natürlich glaubt Willstätter, daß das von uns geäußerte Bedenken, daß bei dem Trocknen durch verschiedenartige Einflüsse sich das Chlorophyll in der Weise ändert, daß Phosphor nicht mehr in Lösung übergeht, nicht stichhaltig ist. Wie wir uns aber überzeugten, ist Willstätters Anschauung völlig irrig.

Daß Willstätter, im Gegensatz zu der Annahme Tswetts, in seinem eigenen alkoholischen Rohchlorophyllextrakte mehr Lecithin bekommen hat, wenn er zuerst die zermalmtten Blätter zur Beseitigung des Wassers mit Alkohol digerierte und dann erst die Extraktion mittels Alkohols durchführte, als wenn er direkt

¹⁾ H. Vageler, Untersuchungen über das Vorkommen von Phosphatiden in vegetabilischen und tierischen Stoffen. (Biochem. Zeitschr. Bd. XVII. 1909. p. 189.)

extrahiert hätte, ohne vorher erfolgter Digestion, wie wir dies getan haben, ist ja klar. Bei dieser Operation wird infolge des stets vorhandenen vegetativen Wassers in den Blättern der Alkohol, der zur Extraktion verwendet wird, verdünnt.

Es sind also von den gegenwärtigen Phosphatiden in alkoholische, mit Vegetationswasser verdünnte Chlorophyllextrakte weniger übergegangen, als bei der Extraktion mit nicht verdünntem Alkohol, wie dies bei dem Vorgang Willstätters der Fall gewesen. Übrigens, die Frage der Nichtanwesenheit der farblosen Phosphatide behandeln wir später auf Grund unserer Untersuchungen.

Was die Bezeichnung „Reinchlorophyll“ betrifft, so waren wir weit entfernt davon, mit dieser Bezeichnung die Einheitlichkeit des Produktes andeuten zu wollen; vielmehr bezeichneten wir mit diesem Ausdruck nur das Produkt, das wir durch verschiedene Reinigungsoperationen erhalten hatten, ebenso, wie wir uns im Laufe der Arbeit dessen bewußt wurden, daß das Produkt, das wir durch die Extraktion erhalten, nur ein postmortales Produkt ist. Gerade der Umstand, daß wir zu den Entmischungsverfahren Benzol verwendet haben, was uns Tswett ausstellt, und daß es notwendig ist, mehr Wasser hinzuzufügen als bei Verwendung von Kohlenwasserstoff (Benzin, Petroleumbenzin), damit die Kyanophyllen- und Xanthophyllen-Zonen sich zu bilden vermögen, spricht für unsere Anschauung, daß die eventuell gegenwärtigen farblosen Lecithine in die Schichte der Kyanophyllen nicht hineingekommen sind. Durch Parallelversuche, d. i. mit Lecithinpräparaten, welche den alkoholischen Chlorophyll-Lösungen beigemischt sind, haben wir gefunden, daß bei der Ausschüttelung mit Benzol und Hinzufügung von so viel Wasser, daß dadurch die Abscheidung von Schichten zum größeren Teile bewirkt wird, die Lecithine nicht in das Benzol übergehen, wie Tswett supponiert, sondern zum größten Teile in der Emulsion, welche sich bei dieser Methode an der Grenze beider Schichten bildet, suspendiert werden, wie auch Just in unserem Laboratorium konstatiert hat.

Tswett benutzte auch das Benzol beim Krausschen Entmischungsverfahren wie wir, und das so gewonnene Produkt (nachher noch mit Petroläther vermischt und mit Wasser ausgeschüttelt) teilte er durch seine sogenannte chromatographische Adsorptionsmethode. Er schreibt diesbezüglich: „Es entstanden folgende Zonen (von oben nach unten):

- A. Farblose Zone (Phosphatide?).
- B. Gelbgrüne Zone (Chlorophyllin β).
- C. Grünblaue Zone (Chlorophyllin α).
- D. Gelbe Zone (Xanthophylle).“

Ohne daß Tswett irgend eine analytische Unterlage, durch welche wir weiter unten seine Methode ergänzen, angeführt hätte, schreibt er weiter:

„Die grüne Benzolphase enthält nämlich außer den beiden Chlorophyllinen, Xanthophylle und Karotin, noch farblose Bei-

mischungen, welche möglicherweise aus organischen Phosphorverbindungen bestehen.“

Sämtliche vorher angeführten Gründe Tswetts können Gegenstand einer Diskussion sein; es ist aber absolut unstatthaft, daß Tswett, keineswegs auf Grund von analytischen Daten, durch welche wir unsere Erörterungen fundieren, sondern auf Grund der oben angedeuteten, bloß spekulativen Erwägungen folgende Deduktion aufzustellen sich für berechtigt hält.

Tswett geht sogar so weit, folgenden Ausspruch zu tun: „Wir müssen daher schließen, daß die Beteiligung des Phosphors an dem Aufbau der Chlorophylline in einigen Fällen fast sicher ausgeschlossen ist.“

Daß diese letztere Behauptung Tswetts eine übereilte ist, beweisen nicht allein etwa von uns aufgestellte Voraussetzungen, sondern exakte Experimente, welche wir in Befolgung seiner eigenen Methode durchgeführt haben, die er in der Abhandlung „Adsorptionsanalyse, chromatographische Methode, Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls“¹⁾ beschreibt. Wir haben jedesmal 1 kg frischer, reiner Blattsubstanz der großen Klette (*Lappa major*) benützt. Die für das Experiment bestimmte Blattsubstanz wurde zerkleinert, mit feinstem Schmirgel unter Zugabe von Calciumkarbonat zerrieben und die so gewonnene Masse mittels Äthylalkohols extrahiert. Das grün gefärbte Filtrat wurde sodann mit Benzol versetzt und so lange Wasser zugefügt, bis sich die bekannten zwei Phasen gebildet hatten, nämlich die tiefgrüne und die gelbe.

Die smaragdgrüne Benzollösung wurde nun in der beschriebenen Weise mittels wässerigen Alkohols ausgeschüttelt. Nach dieser Operation erfolgte die Vermischung der grünen Benzollösung mit Petroläther, worauf der Extrakt mit destilliertem Wasser sorgfältig und gründlich ausgewaschen wurde, um auf diese Weise den Alkohol vollständig zu entfernen. Hierauf wurde die Lösung der chromatographischen Zerlegung zugeführt. Diese letztere erfolgte bei vollständigem Lichtabschluß. Die ganze Adsorptionsanalyse wurde in einem Glaszylinder, in welchem sich eine 40 cm hohe und 10 cm im Durchmesser fassende Calciumkarbonatschicht befand, vorgenommen. Zu erwähnen erübrigt noch, daß das Calciumkarbonat chemisch rein, bei 150° C getrocknet und vor der Verwendung auskühlen gelassen wurde.

Die durch die Adsorption entstandenen, verschiedenfarbigen Schichten, deren Grenzen gut erkennbar waren (wenn sie auch nicht scharf genug markiert gewesen sind), wurden mit dem Messer geteilt und mittels absolutem Äthylalkohol extrahiert. Die eben beschriebene Operation wurde zehnmal nacheinander mit je 1 kg Blattsubstanz vorgenommen und jedesmal die alkoholischen Extrakte der einzelnen Zonen vereinigt und abgedampft, so daß stets zu einem vollen Versuche 10 kg an Blattsubstanz verwendet worden sind. Sämtliche Operationen haben wir zweimal wiederholt, so daß insgesamt 20 kg Blattsubstanz, d. i. à 10 kg per Versuch,

¹⁾ Tswett, Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 1906, Heft 7.

zur Verarbeitung gelangten. Die nachstehende Tabelle IV zeigt uns die Durchschnittsresultate der beiden Hauptversuche an. In den abgedampften alkoholischen Extrakten wurde hierauf der Phosphor resp. die Phosphorsäure nach den schon von uns erwähnten Methoden bestimmt.¹⁾

Wir haben nachstehende Zonen erhalten:

1. Eine sattgrüne Zone.
2. Eine lichtgrüne Zone.
3. Eine smaragdgrüne Zone.
4. Eine gelbe Zone, welche nach demselben Forscher aus dem Xanthophyll besteht.
5. Eine farblose unterste Zone.

Tabelle IV.

Zonenfolge	Durchschnittl. Höhe der Zone in cm	Verfärbung	Menge d. Trockensubstanz in g	Gefundene Menge $Mg_2P_2O_7$ in g	Phosphorgehalt im $Mg_2P_2O_7$ in g	Phosphor in %
I.	7	sattgrün	0,9722	0,0345	0,0096	0,98
II.	10	lichtgrün	0,8726	0,0255	0,0070	0,80
III.	4	blaugrün	0,3068	0,0092	0,0026	0,84
IV.	10	gelb	0,7625	0,0036	0,0010	0,13
V.	10	farblos	0,2865	0,0058	0,0016	0,56

Die Gestaltung der Phasen war in unserem Falle eine etwas andere, als sie sich bei den Experimenten Tswetts ergeben hatte; Tswett hat als oberste eine farblose Zone erhalten, betreffs welcher er sagt, daß sie die Phosphatide enthält. Die gelbgrüne und grünblaue Zone sollen nach ihm die Chlorophylline α und β enthalten. Die gelbe Zone besteht wesentlich aus den Xantho-

¹⁾ Die Phosphorsäure wurde in Form von Magnesium-Pyrophosphat nach vorangegangener Fällung als Ammonphosphormolybdat bestimmt. Bei dieser Bestimmung der Phosphorsäure ist zu erwähnen, daß von H. Neubauer (Zeitschrift für angewandte Chemie 1896, 439), F. A. Gooch (Zeitschrift f. anorganische Chemie, XX, S. 135) hervorgehoben wird, daß in dem Falle, wenn die Fällung der Phosphorsäure in der Kälte vor sich geht, das Magnesiumammoniumphosphat schwer herausfällt, rein nicht zu erhalten ist und dasselbe bald mit Mg_3PO_4 , bald mit $Mg(NH_4)_4PO_4$ verunreinigt ist. Wir können jedoch mit den Anschauungen von B. Schmitz (Zeitschrift für analytische Chemie, 1906, S. 512), Järvinen (ebendort 1905, S. 333) und Jörgensen (ebendort 1906, S. 278), wonach die Fällung in der Hitze vorgenommen werden muß, nicht übereinstimmen. Unsere analytischen Versuche mit chemisch reinen Monophosphaten haben dargetan, daß, wenn man die Phosphorsäure als Ammonphosphormolybdat fällt, die gefällte Masse nach dem Auswaschen in warmem Ammoniak löst und dann die Lösung mit Salzsäure so lange versetzt, bis der entstehende gelbe Niederschlag sich in der ammoniakalischen Flüssigkeit langsam wieder löst und endlich behutsam mit filtrierter, tropfenweise zugesetzter Magnesiummischung fällt, die Lösung genügend warm ist, und sie nicht zum Sieden zu erhitzen braucht. Man erhält dann immer das Magnesiumammoniumphosphat in ganz reinem, grob-kristallinischem Zustande.

phyllen. Die gelbe Flüssigkeit, welche Tswett als Karotinlösung betrachtet und die bei seinen Versuchen aus der Adsorptionsröhre geflossen ist, trat bei unseren Versuchen nicht auf.

Nun betrachten wir die Resultate unserer eigenen Untersuchungen: Wir finden, daß alle Zonen von grüner Farbe, welche die Chlorophylline α und β enthalten, einen großen Phosphorgehalt in der Trockensubstanz aufweisen und zwar die dunkelgrüne Zone 0,98 %, die lichtgrüne 0,80 % und die smaragdgrüne Zone 0,84 %. Diese drei Zonen ergeben zusammen ca. 2,1516 g Trockensubstanz mit einem Phosphorgehalt von $0,0192 = 0,89$ %, welchen 0,7625 g an Trockensubstanz der gelben Zone mit 0,001 g Phosphor = 0,13 % Phosphor der Xanthophylle gegenüberstehen.

Besonders interessant ist die farblose Zone, in der nach Tswett die Phosphatide enthalten sein sollen. Wir fanden, daß einer Gesamttrockensubstanz per 0,2865 g mit einem Phosphorgehalte von 0,0016 g, d. i. 0,56 % Phosphor, entsprechen.

In der folgenden Tabelle V sind die genauen Resultate unserer Untersuchungen in übersichtlicher Weise niedergelegt. Zunächst ist an diesen Resultaten beachtenswert, daß von dem Gesamtphosphorgehalt 88,08 % auf die grüne Zone entfallen, ferner bloß 4,58 % des gesamten Phosphorgehaltes auf die gelbe und 7,34 % auf die farblose Zone kommen. Dieses Verhältnis des Phosphorgehaltes der einzelnen Zonen ist doch sicherlich ein unverwischliches Dokument dafür, daß der Phosphor tatsächlich in der grünen Zone vertreten ist, wobei noch besonders der Umstand in die Wagschale fällt, daß die analysierten Präparate nach der Tswettschen Methode getrennt worden waren. Die aus der Tabelle V zitierten Ziffern sind ferner ein sprechender Beweis dafür, daß die seitens Tswetts aufgestellte Behauptung, welcher zufolge: „Die Beteiligung des Phosphors an dem Aufbau der Chlorophyllane in einigen Fällen fast sicher ausgeschlossen ist (Willstätters Befunde), in anderen aber sehr problematisch erscheint“, durch unsere Versuche entschieden dementiert wird; denn die Annahme, daß eine Verunreinigung des analysierten Chlorophyll-Präparats durch Phosphatide, obendrein in einem Prozentsatze, wie wir den Phosphorgehalt konstatiert haben, stattgefunden haben könne, erscheint ganz unstichhaltig.

Tswett stellt aber noch folgende Behauptung auf: „Die von Stoklasa mitgeteilten, sehr variablen Zahlen für den Phosphorgehalt der Benzolphase bei verschiedenen Pflanzen und bei derselben Pflanze (Ahorn) für verschiedene Jahreszeiten sprechen vielmehr zugunsten einer variablen Beimischung von Phosphatiden, als für eine variable Zusammensetzung der Chlorophylline (des mythischen Chlorophylls).“

Wir haben zur Entkräftigung dieser seiner Behauptung wiederholt die Adsorptionsmethode Tswetts benützt, wobei wir wieder die Blätter desselben Baumes (Ahorn) der Beobachtung zugrunde gelegt haben, und zwar das einmal im Monat Mai, das anderemal im Monat September. Die Gesamt- oder Rohchlorophyll-Lösung wurde nach der beschriebenen Methode bereitet.

Was haben wir nun bei diesen Untersuchungen gefunden?

Wir haben gefunden, daß die Extrakte aus den Blättern (Gesamt- oder Rohchlorophyllextrakte), die wir im Monat Mai untersuchten, nachstehenden Phosphorgehalt in den einzelnen Zonen aufwiesen:

Die drei grünen Zonen ergaben einen Phosphorgehalt von 1,1 ‰, die gelbe Zone einen Phosphorgehalt von 0,1 ‰ und schließlich die farblose Zone einen solchen von 0,3 ‰.

Im Monat September, um welche Zeit die Blätter bei uns bereits gelbgrün zu werden beginnen, ergaben sich für den Phosphorgehalt der Blätterextrakte folgende Daten: Die drei grünen Zonen enthielten 0,25 ‰, die gelbe Zone 0,2 ‰ und die farblose Zone 0,38 ‰ Phosphor. Der unvoreingenommene Leser merkt also sofort, daß mit dem Verschwinden des Chlorophylls aus dem Blatte auch der Phosphorgehalt aus den grünen Zonen fast völlig verschwunden ist, somit mit Fug und Recht, ohne der Logik den geringsten Zwang anzutun, auf einen Kausal-

Tabelle V.

Zone	Gehalt an Trockensubstanz in g	Von der Gesamttrockensubstanz entfallen ‰ auf:	Phosphorgehalt in g	Phosphor in d. entsprechenden Trockensubstanz in ‰	Von dem Gesamt-Phosphorgeh. entfallen ‰ auf:
Drei grüne Zonen	2,1516	67,23	0,0192	0,89	88,08
Gelbe Zone	0,7625	23,82	0,0010	0,13	4,58
Farblose Zone	0,2865	8,95	0,0016	0,56	7,34

nexus zwischen dem Vorhandensein des Chlorophylls im Blatte und dem Phosphor in dem ersteren geschlossen werden darf.

Dabei haben wir gar nicht die Absicht, die Selbstverständlichkeit zu bestreiten, daß ein gewisser Prozentsatz des Phosphorgehaltes der Extrakte der Blattsubstanz (Gesamt- oder Rohchlorophyll) den Phosphatiden der farblosen Zone angehört, aber diese Mengen bleiben, wie wir gesehen haben, im Frühjahr wie im Herbst fast konstant.

Etwas Ähnliches haben wir betreffs des Phosphorgehaltes in der gelben Zone beobachtet.

Ganz anders verhalten sich aber die grünen Zonen. Betreffs dieser haben wir gefunden, daß mehr als 80 ‰ des gesamten Phosphorgehaltes im Monat September verschwindet. Diese Tatsache spricht doch deutlich genug für eine variable Zusammensetzung der Chlorophylline, während die „Beimischung“ der Phosphatide (im Gesamt- oder Rohchlorophyll) offenkundig eine fast konstante ist. Durch unsere analytischen Untersuchungen waren wir in der Lage sicherzustellen, daß die im Wege des Kraus'schen Entmischungsverfahrens hergestellten Benzolphasen im Monat Juni und Juli einen Phosphorgehalt von 1,3 ‰, im Monat Oktober aber nur 0,059 ‰ enthalten haben. Das Ver-

schwinden der grünen Farbe ist somit sicherlich ein Zeichen, daß in zwingender Weise auch das Verschwinden des Phosphors indiziert, obendrein aber sich in vollständiger Harmonie mit der chromatographischen Zerlegung befindet, von welcher Tswett selbst sagt: „Daß sie schon jetzt als mächtiges Kontrollmittel anwendbar sei“ und daß „von keinem Farbstoffpräparate behauptet werden könne, dasselbe sei eine definierte reine Substanz, wenn es sich nicht auch in der chromatographischen Probe als einheitlich erweist.“

Wir wundern uns, daß Tswett Molisch den Beweis über die Nichtanwesenheit des Eisens im Chlorophyll vorhält, daß er das Material vorerst 10 Minuten lang im Wasser aufgeköcht hat, wodurch die Abspaltung des Eisens aus dem Chlorophyll leicht hätte erfolgen können, und daß Tswett bei seiner Kenntnis dieses labilen Verhaltens des Chlorophylls nicht früher Willstätter vorgeworfen hat, daß er nicht frisches Material verarbeitete, dasselbe zerstörenden Einflüssen überlassend, wie dies speziell die Wärme und atmosphärische Kohlensäure, gewisse Enzyme und Bakterien für das Chlorophyll sind.

Auf Grund dieser Erwägungen über die Labilität des Chlorophyllmoleküls und der Leichtigkeit, mit welcher das Chlorophyll Elemente ausscheidet, welche ihm in vivo angehört haben, und andererseits jene, welche zu diesem Molekül im Blatt nicht gehört haben, substituiert oder addiert, waren wir genötigt, ein ganz anderes Verfahren, das wir übrigens bereits wiederholt beschrieben haben, einzuschlagen, als es von Willstätter in Anwendung gebracht wurde.

Aus unseren Beobachtungen können wir heute, ohne irgendwie der Logik Gewalt antun zu müssen, abstrahieren, daß die Angaben Willstätters¹⁾ über den Phosphorgehalt der Chlorophyllpräparate (Gesamt- oder Rohchlorophyll), die aus dem Methylalkohol- und Acetonextrakten hergestellt worden sind und betreffs welcher er nur Spuren oder bloß minimale Quantitäten gefunden haben will, nicht richtig sein können. Wir haben durch unzweifelhafte Versuche zu verschiedenen Zeiten konstatiert, daß die Chlorophyllpräparate wesentlich phosphorhaltig sind.

II. Chemische Zusammensetzung der im Handel vorkommenden Chlorophyllpräparate.

Präparat von Merck.

Zur Orientierung über die Eigenschaften des Chlorophylls wurde eine Reihe von analytischen Bestimmungen mit einem Präparat von Merck ausgeführt, welches als Chlorophyllpurissimum

¹⁾ Richard Willstätter, Zur Kenntnis der Zusammensetzung des Chlorophylls. (Liebigs Annalen der Chemie. Bd. 350. 1906.)

bezeichnet und frei von Carotenen war. Dasselbe erlitt im Vakuum bei 100° nur 4,68% Trockenverlust. Es war amorph von olivbrauner Farbe und enthielt, wie durch mikrochemische Untersuchung festgestellt wurde, etwas Cholin.

Der Phosphorsäuregehalt, sowie die Stickstoffmenge wurde nach der Methode Kjelldahls und Dumas bestimmt und hierauf die Elementaranalyse, sowie eine Feststellung der Spaltungsprodukte vorgenommen.

Die Stickstoffbestimmung nach der Methode von Dumas erfolgte auf die Weise, daß eine gewogene Menge der Substanz in einem Hofmeisterschen Schälchen in Petroleumäther gelöst, mit geglühtem Kupferoxyd vermischt und im Trockenschranke bei 100° getrocknet wurde.

0,3231 g des Präparates (0,2932 g aschefreier Trockensubstanz) ergaben 9,65 cm³ Stickstoff bei 18,5° C und 741,5 mm Druck. Der Stickstoffgehalt betrug also 3,65%. Die Methode von Kjelldahl-Willfahrt ergab niedrigere Resultate.

Für die Elementaranalyse wurde die abgewogene Menge des Präparates auf dem Schiffchen in einer auf der einen Seite zugeschmolzenen Röhre, die mit einer Wasserstrahlpumpe auf 100 mm evakuiert wurde, im Wasserdampfe bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, was sehr rasch erreicht wurde.

0,1486 g (0,1419 g aschefreier) Trockensubstanz ergaben 0,1315 g H₂O und 0,3630 g CO₂.

Bei dieser Untersuchung wurden folgende Resultate erzielt:

Tabelle VI.

	In der Trocken- substanz		In aschefreier Trockensubstanz
Asche	4,57 %	N nach Kjelldahl	2,24 %
Org. Stoffe	95,43 %	N nach Dumas	3,65 %
P ₂ O ₅	0,64 %	C	69,80 %
		H	10,20 %
		Differenz (O+P ₂ O ₅)	16,25 %

Sodann wurde der Phytolgehalt nach der von Willstätter¹⁾ und seinen Schülern ausgearbeiteten Methode bestimmt.

Eine abgewogene Menge von Chlorophyll wurde mittels 24prozentiger methylalkoholischer Natronlauge 2 Stunden mit Rückflußkühler gekocht, dann mittels Äther nochmals extrahiert, der Extrakt filtriert und das Filtrat mit Blutkohle entfärbt, eingedampft und im Kölbchen gewogen.

Die Phytolmenge betrug auf aschenfreie Substanz berechnet im ersteren Falle 22,55%, im letzteren Falle 23,65%, im Durchschnitt 23,10%.

Die nach der Phytolextraktion zurückbleibende Seife wurde in heißem Wasser gelöst, mittels Salzsäure (oder Schwefelsäure)

¹⁾ Willstätter, Hocheder u. Hug, Annalen der Chemie, 371, 18, 1909.

schwach angesäuert, die trübe Flüssigkeit mittels Petroleumäthers, der umdestilliert und von höher als 50° siedenden Bestandteilen frei war, dreimal ausgeschüttelt. Sowohl die ätherische Lösung als auch die wässrige, trübe Flüssigkeit wurden durch einen gewogenen Goochtiiegel mit Asbestschicht filtriert und so die durch die alkalische Spaltung gebildeten Phytochlorine, die zum größten Teile in Flocken in den Flüssigkeiten schwammen, möglichst quantitativ aufgefangen und mit etwas Petroleumäther (feucht) nachgewaschen und getrocknet.

Das Resultat der Phytochlorinbestimmung ist freilich etwas ungenau, weil einerseits etwas an Säuren zurückgehalten wird, andererseits, wie an der blauen Färbung des Filtrates ersichtlich ist, die verdünnte wässrige Salzsäure etwas auflöst. Das Resultat wird ohne Umrechnung in der Kolonne Phäophorbin angeführt, weil ein genauer Faktor noch nicht festgestellt wurde.

Nach der Entfärbung mittels Blutkohle wurde die petroleumätherische Lösung eingedampft und der Rest gewogen. Ein Teil der Fettsäuren ging jedoch mit den Petroleumätherdämpfen verloren.

Aus dem Stickstoffgehalt 9,42 %, berechnet nach der Formel für Phäophorbin $C_{34}H_{34}N_4O_6$, ergibt sich ein Phäophorbingehalt des Präparates von 38,74 %.

Die Resultate sind folgende:

Tabelle VII.

	Präparat %	Phytol %	Phäophorbin %	Glyceridrest %	Glyceridrest auf 100 % be- rechnet. %
C	69,80	18,71	26,60	24,49	64,43
H	10,20	3,14	2,23	4,83	13,25
N	3,65	—	3,65	—	—
O	15,65	1,25	6,26	8,14	22,32
P ₂ O ₅	0,70	—	—	0,70	—
	100,—	23,10	38,74	38,16	100,00

Die elementare Zusammensetzung des Glyceridrestes entspricht einer sauerstoffreicheren Säure. Das Glycerin wurde nur qualitativ im Destillate der wässrigen Flüssigkeit nach der Phytochlorinbestimmung mittels Lauge und Kupfersulfatlösung nachgewiesen.

Die organischen Säuren.

Es wurden bei der Hydrolyse 0,25 g Säuren erhalten, woraus eine geringe Menge fester Säure auskristallisierte, die auf einem porösen Tonscherben abgesaugt wurde. Die Menge, auf dem Porzellanschiffchen gewogen, betrug 0,0551 g. Durch Verbrennen resultierten 0,1490 g CO₂ und 0,0681 g H₂O. Es entspricht dies:

	Theorie für		
		Palmitinsäure	Ölsäure
	%	%	%
C	73,47	74,92	76,51
H	13,73	12,60	12,15
O	12,53	12,48	11,34

Es scheint dies Palmitinsäure gewesen zu sein, denn der Schmelzpunkt dieser Säure war 60° , während jener der Palmitinsäure 62° ist.

III. Mikrochemische Untersuchungen des im Handel vorkommenden Chlorophylls.

So viel uns bekannt ist, hat es noch niemand versucht, das Handelschlorophyll mikroskopisch und mikrochemisch zu untersuchen. Wir dachten daher, daß es am Platze sein wird, ein solches Präparat, welches häufig als Ausgangsprodukt für die weiteren Untersuchungen über Chlorophyll benützt wird, einer näheren Untersuchung zu unterziehen.

Wir wußten es wohl, daß dieses Präparat, das zumeist für technische Zwecke benützt wird, keinen einheitlichen Körper darstellt, sondern daß es vielmehr aus einigen Körpern zusammengesetzt ist und daß auch die Zusammensetzung dieses Rohchlorophylls je nach dem benützten Pflanzenmaterial verschieden sein wird.

Zur Untersuchung wählten wir das Präparat, welches die Firma Merck in Darmstadt unter der Bezeichnung „karotenfrei“ in den Handel bringt. Dasselbe stellt eine pastenförmige, olivgrün gefärbte Substanz dar, welche einen eigentümlichen, extraktartigen Geruch besitzt.

Wenn wir etwas von dieser Substanz zwischen 2 Gläschen möglichst stark zerdrücken und unter dem Mikroskope besichtigen, sehen wir, daß dieser Körper keineswegs homogen ist. Die Grundsubstanz, welche das meiste ausmacht, erscheint ziemlich einheitlich und ist etwa gelbgrünlich gefärbt; in derselben findet man eingebettet verschiedene Körper und zwar:

1. lange, nadelförmige oder säulchenförmige Kristalle (Taf. III, Abbildung 1).
2. undeutliche, stark lichtbrechende Oktaëder (offenbar oxalsauren Kalk (Tafel III, Abbildung 2).
3. größere Kristalle verschiedenster Gestalt, welche lebhaft an Phosphorsäure-Magnesia oder Phosphorsäure-Ammonmagnesia (Trippelphosphat) erinnern (Tafel III, Abbildung 3).
4. Sphärökristalle mit ungemein feiner Struktur, stellenweise von ziemlich lockerem Gefüge, welches aus radial angeordneten, ungemein feinen Kristallfäden zusammengesetzt ist (Tafel III, Abbildung 4).

Nicht selten finden wir mehrere von diesen Formen in größeren Klumpen vereinigt.¹⁾ Die Untersuchung dieses Präparates erfolgte zuerst in der Weise, daß wir etwas von demselben einer Sublimation unterworfen haben, indem wir eine gewisse Menge der Substanz in die Mitte eines mäßig ausgehöhlten Uhrschälchens legten und dieses dann mit einer Glasplatte bedeckten.

Diese Vorrichtung wurde auf eine Asbestplatte gestellt und darunter eine kleine Gasflamme angezündet. Schon nach kurzem Erwärmen entwichen aus der Probe die letzten Reste der Feuchtigkeit, welche das Glas beschlagen. Dieser Beschlag verschwindet später sehr rasch; bei weiterem Erwärmen wird das Glas wieder beschlagen, diesmal aber in anderer Weise als bei dem Wasserdampf. Es bildeten sich zuerst ganz kleine Tröpfchen in der Mitte des Glases, welche sich allmählich vergrößern, vereinigen und die Tendenz zeigen, am Glase auseinanderzulaufen.

Später zeigte die Substanz eine strahlförmige Anordnung und reichliche Verzweigung vom Zentrum zur Peripherie. Das Sublimat hat den charakteristischen Geruch der ursprünglichen Substanz angenommen. Unter dem Mikroskope besteht es aus großen, farblosen, oder schwach gelblich gefärbten, stark lichtbrechenden Tröpfchen von fettartigem Glanze. Diese Tröpfchen speichern mit Begierde Jod und färben sich rasch mit Sudan III und Alkannatinktur.

Nach einigen Stunden erstarren diese Tröpfchen zum Teile zumeist in der Mitte und es ließ sich unter dem Mikroskop beobachten, daß sich überaus zarte, fadenförmige, zu Büscheln geordnete Nadeln gebildet haben, welche im polarisierten Lichte einen prachtvollen Seidenglanz besitzen (Tafel III, Abbildung 8).

Es unterliegt daher keinem Zweifel, daß das Sublimat aus irgend einer Fettsäure besteht.

Um den Nachweis zu erbringen, daß es sich tatsächlich um eine Fettsäure handelt, wurde ein Teil des Sublimates auf einen Objektträger übertragen und mit 10prozentiger Kalilauge versetzt. Sofort nach Zusatz der Kalilauge trübte sich die Masse und es bildeten sich stark lichtbrechende Tropfen und Kugeln, sowie auch unregelmäßige Massen, welche sich alsbald zu den schönsten Myelinformen auswuchsen (Tafel III, Abbildung 6 und 7). Später erstarrten die Massen kristallinisch und wurden durch Verseifung undurchsichtig.

Nach den Erfahrungen, welche einer von uns gelegentlich seiner Studien über Myelinformen gemacht hat²⁾, handelt es sich hier mit größter Wahrscheinlichkeit um Ölsäure.

Eine weitere Frage, welche uns besonders interessierte, war die, ob unser Präparat (Rohchlorophyll) auch Cholin enthält, und ob dasselbe frei oder gebunden vorkommt. Nach Zusatz von einer starken Jodjodkaliumlösung zu dem Präparate können wir beob-

¹⁾ Frisch bereitete, grüngefärbte Chlorophyllpräparate sind homogen und enthalten keine kristallisierte Beimengungen.

²⁾ Emanuel Senft, Über die Myelinformen bildende Substanz in Ginghoh-Samen. Pharmazeutische Post, 1907.

achten, daß die Substanz das Jod mit Begierde speichert, daß sich dagegen aber keine Kriställchen bilden. Somit ist also das Cholin in freiem Zustande nicht vorhanden. Wir haben es daher versucht, das in dem Präparat eventuell vorhandene Cholin in Freiheit zu setzen. Zu diesem Zwecke kochten wir etwas der Substanz etwa mit 2 cm³ verdünnter Schwefelsäure (1 : 5).

Es erfolgte sogleich eine Lösung und ein Teil des Körpers blieb ungelöst und schied sich in Form von Schmiere ab.

Beim Kochen entwickelte sich ein charakteristischer Geruch, welcher jedoch ungemein schwer zu beschreiben ist. Nach längerem Kochen ließ sich ein Nebengeruch wahrnehmen, welcher etwa an Fische erinnert und den wir anlässlich unserer Studien über Myelinformen bei der Spaltung der Lecithine durch Schwefelsäure häufig zu beobachten Gelegenheit hatten.

Zu dem Filtrate wurde etwas starke Jodjodkalilösung zugesetzt. Nach längerer Zeit bildeten sich unregelmäßige und ziemlich leicht zufließende, jedoch genug charakteristische Kriställchen der Jodcholinverbindung. Die ganze Reaktion verlief recht träge und wir nahmen an, daß die Abspaltung des Cholins keine vollkommene war. Um daher eine stärkere Abspaltung des Cholins zu bewirken, haben wir ein Gramm des Rohchloropylls mit einer Mischung aus 30 Tropfen Salzsäure, 30 Tropfen Schwefelsäure und 5 ccm Wasser etwa $\frac{1}{4}$ Stunde gekocht, indem wir das verdunstete Wasser ersetzten, und filtrierten dann die gewonnene Lösung (Aufschwemmung). Das Filtrat war schmutzig, gelbgrün gefärbt; dasselbe wurde auf etwa 1 ccm eingeeengt und von diesem Rückstande wurde dann ein Tropfen auf einen Objektträger gebracht, eine starke Jodjodkaliumlösung zugesetzt und das Präparat rasch mit einem Deckgläschen bedeckt. Es bildete sich sofort eine Trübung und etwa in 5 Minuten zeigten sich die ersten Kriställchen. Die Kristalle entwickelten sich erst ungefähr in 10 Minuten (Tafel III, Abbildung 9). Sie besaßen eine mahagonibraune Farbe, waren zu meist nur klein und zerflossen bald.

Neben diesen fanden wir aber manchmal recht ansehnliche Kristalle, welche sehr unbeständig waren und kaum, daß sie vollkommen ausgebildet waren, wieder rasch zerflossen. Bei der Auflösung der großen Kristalle bildeten sich ganz eigentümliche Spindel-formen. Die Auflösung erfolgte nämlich allmählich von den Kristallenden ausgehend und die Mitte blieb am längsten erhalten.

Bei den Untersuchungen, welche wir anlässlich der Studien über Myelinformen angestellt haben, wurde nachgewiesen, daß das Lecithin nicht nur durch anorganische Säuren, sondern auch durch organische Säuren, Weinsäure, Oxalsäure, nach längerer Zeit Cholin abspaltet, und es wurde die Vermutung ausgesprochen, daß offenbar auch andere Pflanzensäuren nach längerer Einwirkung das Lecithin zu spalten vermögen.

Das Lecithin wird bekannterweise auch durch verdünnte Alkalien und wie wir konstatieren konnten, sogar schon durch das saure phosphorsaure Natrium (welches allerdings auch alkalisch reagiert) nach längerer Zeit gespalten.

Wir wollten uns, von unseren Erfahrungen über die Spaltung des Lecithins ausgehend, davon überzeugen, wie weit sich auch das Rohchlorophyll dem Lecithin analog verhalten wird. Zu diesem Zwecke versetzten wir eine bestimmte Menge der Chlorophyllpasta in einer Eprouvette mit einer 10prozentigen Lösung von saurem phosphorsaurem Natrium. Das Chlorophyll ging zum Teile ziemlich rasch in Lösung über und die Flüssigkeit färbte sich schmutzig gelbgrün.

Nach 10 Tagen hatte sich das Chlorophyll schon zum größten Teile aufgelöst und die Flüssigkeit nahm eine etwa olivbraune Farbe an. Die mikroskopische Untersuchung zeigte uns jedoch, daß es sich nicht um eine vollkommene Lösung, sondern bloß um eine Suspension handelt.

Das Chlorophyll wurde durch das saure phosphorsaure Natrium allmählich gequollen und kleine Partikelchen, welche sich davon abgelöst hatten, zeigten die schönsten Myelinformen. Durch Bewegung des Glases sowie auch durch Strömen der Flüssigkeit weggetragene Myelinformen zogen ungemein zarte lange Fäden nach, welche so dünn sind, daß sie selbst bei der stärksten Vergrößerung nur mehr schwach wahrnehmbar waren, denn ihre Dicke beträgt nur kleine Bruchteile eines μ .

Außer diesen Gebilden begegneten wir in dem Präparate zu Bündeln geordneten, überaus dünnen Fettsäurenadeln. Es handelte sich also hier ebenfalls, wie beim Lecithin, um eine Saponifikation.

Einen weiteren Versuch machten wir mit Weinsäure, indem wir etwas der Chlorophyllpasta mit einer 10prozentigen Lösung von Weinsäure versetzten und einige Tage stehen ließen.

Schon nach einigen Tagen konnte unter dem Mikroskope durch Zugabe von starker Jodjodkaliumlösung die Bildung der Florenz'schen Kriställchen (Cholin-Dijodid) nachgewiesen werden.

Dasselbe gilt auch von der Oxalsäure, mit welcher es uns ebenfalls gelungen ist, aus der Chlorophyllpasta nach längerer Zeit Cholin abzuspalten.

Im allgemeinen haben wir die mikrochemischen Reaktionen so durchgeführt, daß wir bei schwacher Vergrößerung auf dem Objektträger die Flüssigkeit mit dem Reagens versetzten, ohne die Probe mit einem Deckgläschen zu bedecken, welches Verfahren sich zur Orientierung sehr praktisch erwiesen hat, denn die Probe konnte rasch ausgeführt werden. Außerdem schieden sich die überaus leichten Kriställchen der Cholinverbindung auf der Oberfläche des Tröpfchens ab.

Bei positivem Ausfalle überzeugten wir uns von der Reaktion nochmals in der Weise, daß wir ein wenig der zu prüfenden Flüssigkeit auf einen Objektträger brachten, mit einem Deckgläschen bedeckten und vom Rande des Gläschens aus das Reagens zufließen ließen.

Im positivem Ausfalle bildete sich an der Stelle, wo das Reagens in die Probe eingedrungen ist, ein pulveriger Niederschlag, welcher sich bei Anwesenheit von Cholin früher oder später in die charakteristischen Florenz'schen Kriställchen umwandelte.

Es ist sehr ratsam, beim Anstellen dieser Probe das Präparat

anfangs ruhig stehen zu lassen, damit sich die Kriställchen besonders dort, wo wenig Cholin zugegen ist, gut ausbilden können.

Die Florenz'schen Kriställchen, besonders die kleinen, zeichnen sich durch eine grosse Labilität aus und zerfließen bald und das umsomehr, wenn auf das Gläschen ein Stoß verübt wird.

In gleicher Weise, wie mit Säuren, behandelten wir die Chlorophyllpasta auch mit 10prozentigem Ammoniak und 10prozentiger Kalilauge. In der Probe, welche wir mit Ammoniak aufgestellt haben, konnten wir nach 14 Tagen unter dem Mikroskope folgende Gebilde beobachten:

1. Außerordentlich große, auffallend blaßgrünlich gefärbte, wenig lichtbrechende Tropfen, welche am Rande manchmal deutliche Schichtung zeigten;
2. kleinere kompaktere Fett-Tröpfchen von olivgrün bis braungrüner Farbe (Tafel III, Abbildung 10);
3. braungelb gefärbte Schollen (Tafel III, Abbildung 11);
4. vereinzelt dünne, gebogene, zu Büscheln geformte Fettsäurenadeln und
5. kleinere oder größere Gruppen von Sphaeriten, welche deutlich radial angeordnete Kriställchen zeigen und manchmal auch eine Schichtung aufweisen (Tafel III, Abbildung 12).

Die Verseifung des Chlorophylls geht also mit Ammoniak ungemein rasch vor sich.

In der Probe, welche wir mit 10prozentiger Kalilauge angestellt haben, konnten wir unter dem Mikroskope beobachten, daß die Verseifung weit nicht so rasch vor sich ging wie bei Ammoniak, denn wir konnten in der Probe sehr schöne Myelintröpfchen finden.

Nach Zusatz von starker Jodjodkalilösung zu der mit Kalilauge angesetzten Probe, welche bereits einige Tage alt war, bildete sich zuerst ein schleierförmiger Niederschlag, dann erfolgte eine Tröpfchenbildung und erst nach einigen Minuten erfolgte vom Rande des Gläschens aus die Bildung von überaus kleinen, aber ungemein charakteristischen Kriställchen der Cholinverbindung.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß die untersuchte Chlorophyllpasta ein ganz analoges Verhalten zeigt wie diejenigen Roh-Extrakte, welche die Phosphatide enthalten. Das Rohphytol, das aus dem Präparate gewonnen wurde, verhielt sich gegen Jodlösung und Farbstofflösungen ähnlich wie die ungesättigten Fettsäuren, so daß eine Unterscheidung nicht möglich war.

IV. Chemische Zusammensetzung des Chlorophylls aus der Blattsubstanz verschiedenartiger Pflanzen.

Extraktion mittels Äther.

I. *Galeopsis versicolor*.

Es wurden im Mai 1911 zuerst Versuche mit der Extraktion von Chlorophyll mittels Äther ausgeführt, um anorganische Salze, vornehmlich Phosphate, womöglich auszuschließen.

1,5 kg Blattsubstanz von *Galeopsis versicolor* wurden unter Zusatz von 50 g Kalziumkarbonat zwecks Neutralisierung der freien Säuren gemahlen, sodann zweimal mit je 2 l Äther extrahiert und ausgepreßt. Beide Extrakte wurden vereint filtriert und sodann ein Teil des Äthers überdestilliert. Die Farbe der Lösung war prachtvoll grün. Die Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Alkohol vermischt, durch Wasser die Entmischung herbeigeführt, der Alkohol dann nochmals mit Wasser aus der Ätherlösung ausgeschüttelt, sodann die Ätherlösung konzentriert und zuletzt in einer Platinschale im Vakuum eingedampft und getrocknet.

Das Chlorophyllpräparat a bildete zum Teil grünschwarze Flocken. In der Trockensubstanz waren 1,79% Asche enthalten.

Präparat b: Die ausgepreßten Reste des Blattpulvers wurden noch zweimal mit je 2 l Äther extrahiert, der Extrakt filtriert, konzentriert und mittels Alkohol wie beschrieben gereinigt. Die Ätherlösung wurde aber mittels Chlorkalzium getrocknet. Die Analysenresultate dieser Präparate auf Trockensubstanz berechnet waren folgende:

Tabelle VIII.

Präparat	Asche %	P ₂ O ₅ %	Organische Stoffe %	Stickstoff bestimmt nach Kjeldahl %	Phäophorbin aus dem Stick- stoff berechnet %
a	1,79	0,67	97,54	1,66	17,6
b	6,45	0,58	92,97	2,31	24,5
c	1,62	0,74	97,64	1,40	14,9

Der bedeutende Aschengehalt des zweiten Präparates ist auf Chlorkalzium zurückzuführen, was durch mikrochemische Analyse der Asche bestätigt wurde. Die Phosphorsäure wurde jedoch durch das Chlorkalzium nicht entfernt. Die Stickstoffbestimmungen wurden nach der Methode Kjeldahl ausgeführt. Wie wir uns aber überzeugt haben, läßt sich durch diese Methode im Chlorophyll der Stickstoff nicht exakt bestimmen.

Präparat c. Zur Kontrolle wurden 1,8 kg Blattsubstanz dreimal mit je 2 l Äther extrahiert, der ätherische Extrakt mittels Wasser ausgeschüttelt und konzentriert. Sodann wurde die Lösung mit Alkohol verdünnt mit Petroleumäther vermischt, mittels Wasser entmischt und ausgeschüttelt. Nach der Filtration und dem Trocknen mittels Chlorkalzium wurde die filtrierte Lösung eingedampft und im Vakuum getrocknet.

In diesem Präparat wurde der Stickstoff nach Dumas bestimmt. Dem gefundenen Stickstoffgehalt von 1,40% entsprechen 14,9% Phäophorbin. Durch Verseifung wurden gefunden:

	%
Phäophorbin	18,25
Phytol	45,90
Glyceridrest	35,11
P ₂ O ₅	0,74

Die Ätherextraktion ergibt somit nichtphosphorfreie Substanz, sondern es werden Phosphatide und Glyceride entweder in Bindung mit dem Chlorophyllfarbstoff oder zugemischt mitgelöst und lassen sich durch die Entmischung der Ätheralkohollösung nicht entfernen.

Ein Jahr später, im Juli 1912, wurden 5 kg reine Blattsubstanz von *Galeopsis versicolor* zweimal mit Äther extrahiert, die Lösung filtriert, mittels Natriumsulphat entwässert und nach nochmaliger Filtration konzentriert. Der letzte Rest des Äthers wurde frei an der Luft verdunsten gelassen. Es schieden sich dunkelgrüne Körnchen ab, die abgesaugt wurden; von neuem in Äther gelöst, schieden sich beim Verdunsten wieder weiche Körnchen aus, die nach dem Absaugen beim Verdunsten des Äthers hart wurden. Die Körnchen waren blauschwarz, zeigten keine Kristallform, doch war die Substanz einheitlich, frei von Carotenen und anderen gelben Stoffen und mit grüner Farbe in Äther löslich. Dieselbe enthielt 2,26% Asche. In der aschenfreien Trockensubstanz wurden 0,79% Phosphorsäureanhydrid gefunden.

Die Elementaranalyse ergab folgende Resultate:

- 0,1571 g des Präparates lieferten beim Verbrennen 0,3675 g Kohlendioxyd und 0,1019 g Wasser.
- 0,1945 g der Substanz verbrannten zu 0,4549 g Kohlendioxyd und 0,1244 g Wasser.
- 0,1919 g der Substanz ergaben 9,20 ccm Stickstoff bei 741 mm Druck und 20,2° C. Dies entspricht 5,63% Stickstoff.
- 0,2340 g Substanz lieferten 11,02 ccm Stickstoff bei 737 mm Druck und 18,2° C, somit 5,39% Stickstoff.

Die Analysenresultate auf aschenfreie Trockensubstanz berechnet, sind somit folgende:

	%	%
C	65,31	65,24
H	7,44	7,34
N	5,39	5,63
O	21,07	21,00
P ₂ O ₅	0,79	0,79

Der Phäophorbingehalt berechnet sich aus dem durchschnittlichen Stickstoffgehalt = 60,96%.

Sodann wurde durch Hydrolyse der Phytol- und Phäophorbingehalt bestimmt.

Die Verseifung ergab auf aschenfreie Substanz berechnet folgende Zusammensetzung:

	%
Phytol	11,34
Phäophorbin	58,49
Glyzeridrest	29,38
Phosphorsäureanhydrid	0,79

Der Glyzeridrest ist sauerstoffreich; freilich ist in der betreffenden Sauerstoffmenge auch die Summe der Analysenfehler enthalten. Jedenfalls ist das beschriebene und analysierte Präparat

jenem ähnlich, welches von Hoppe-Seyler, Gautier und Stoklasa-Brdlik dargestellt wurde und ebenfalls Phosphorglyceride enthielt.

Tabelle IX.

	Durchschnitt der Analysen %	Phytol %	Phäophorbin %	Glyceridrest %	Glyceridrest auf 100% be- rechnet. %
C	65,28	9,18	40,16	15,94	54,27
H	7,39	1,54	3,38	2,47	8,40
O	21,03	0,62	9,44	10,97	37,33
N	5,51	—	5,51	—	—
P ₂ O ₅	0,79	—	—	0,79	—
	100,00	11,34	58,49	30,17	100,—

Extraktion mittels Alkohol.

Für die folgenden Versuche wählten wir die von Willstätter angewandte alkoholische Extraktion, verbunden mit der Entmischung von Petroleumäther und Ätherlösungen, sowie mit der Fällung von Phäophytin mittels Oxalsäure.

II. Versuche mit *Lathyrus odoratus*.

Es wurde 1 kg reine Blattsubstanz von *Lathyrus odoratus* unter Zusatz von Calciumkarbonat gemahlen, mit 1½ l Alkohol übergossen und nach etwa ¼ Stunde abtropfen gelassen, filtriert, mit einem gleichen Volumen (1 Liter) Petroleumäther vermischt und durch Zusatz von 280 ccm Wasser entmischt. Die alkoholische Lösung wurde nach der Trennung von der petrolätherischen Lösung noch einmal mit ½ Liter Petroläther ausgeschüttelt; derselbe färbte sich jedoch nur sehr schwach grün. Beide Lösungen wurden vereint, mit Wasser unter Zusatz von Kochsalzlösung ausgeschüttelt, filtriert und der Äther abdestilliert. Die letzten Reste des Lösungsmittels wurden im Vakuum vertrieben. In diesem Präparate, und zwar in der Trockensubstanz, wurde der Phosphorsäuregehalt bestimmt und betrug 2,14 %.

Die alkoholische Lösung wurde dann mittels Äther extrahiert, der Äther mit Wasser ausgeschüttelt und sodann die Lösung eingedampft. Der letzte Rest des Chlorophylls wurde mittels Oxalsäurelösung gefällt, abfiltriert, mit Wasser gewaschen, sodann in Äther gelöst und in einer Schale eingedampft.

Da die Substanzmenge nur gering war, wurde bloß der Phosphorsäureanhydridgehalt bestimmt, wovon nur Spuren vorhanden waren. Wichtig für die gegebene Frage, ob neben Phäophytin noch andere organische Stoffe am Aufbau des Chlorophylls beteiligt sind, war die Ätherlösung, da durch den Petroleumäther etwa vorhandene Pflanzenfette, sowie freies Phytol zum größten Teile aufgenommen worden sein dürften.

Die ätherische Lösung lieferte nach dem Eindampfen im Sonnenlichte einen dunkelgrünen Syrup, aus welchem die Reste

des Alkohols und Wassers im Vakuum bei 100° C entfernt wurden. Das Präparat war dunkelgrün und mit grüner Farbe löslich, bräunte sich jedoch durch Hydrolyse und Oxydation beim Trocknen immer mehr. Die hier gemachte Erfahrung zeigt, daß es nicht notwendig ist, das Chlorophyll bei der Gewinnung vor Licht zu schützen, eher das Gegenteil ist der Fall. In 0,2317 g Substanz, in der 0,2164 g organischer Substanz enthalten war, wurde der Stickstoff bestimmt. Es wurden bei 20° C und 731 mm Druck 3,4 ccm Stickstoff gefunden. Sodann wurden durch Verseifung auch das Phytol und die Phytchlorine bestimmt. Die folgenden Resultate der Analyse sind alle auf reine organische Substanz berechnet.

Tabelle X.

	In der Trocken- substanz waren ent- halten in %		In aschefreier Trockensubstanz waren enthalten in %
Asche	1,52	Phytol	22,94
Phosphorsäure- anhydrid	1,34	Phäophorbin	21,55
Stickstoff nach Kjeldahl	2,05	Glyceridrest	54,15
Stickstoff nach Dumas	1,94	Phosphorsäure- anhydrid	1,36

Trotzdem bei der Darstellung dieses Präparates rasch gearbeitet wurde, ist der Phytolgehalt geringer als 33 % und auch der Phäophorbingehalt entspricht nicht dem Verhältnis Phytol: Phäophorbin = 1:2, wie es im Phäophytin gefunden wurde. Das Resultat weist außerdem darauf hin, daß eine Trennung des Chlorophyllfarbstoffes von den Phosphatiden nicht stattgefunden, aber eine engere Bindung zwischen beiden Bestandteilen wohl vorhanden ist, wie Hoppe-Seyler, Gautier und Stoklasa angenommen haben.

III. Versuche mit *Urtica urens*.

1. Es wurden 4,5 kg reiner Blattsubstanz von *Urtica urens*, die an einem schönen Tage gesammelt wurden, mit Magnesia gemahlen, mit 4,5 Liter Alkohol übergossen, nach 5 Tagen der Extrakt abgegossen und zum Teil ausgepreßt. Das Filtrat wurde mit Petroleumäther vermischt und mittels Wasser entmischt. Die Petroleumätherlösung wurde mit Chlorkalzium getrocknet und nach der Filtration eingedampft. Erhalten wurden 2,4 g Chlorophyll A.

Sodann wurde die Chlorophyll-Lösung mit 3 Liter Äther vermischt und durch Wasser unter Kochsalzlösungszusatz entmischt. Der Äther wurde mit Wasser ausgeschüttelt, dann mit Chlorkalzium getrocknet und eingedampft. Es krystallisierte keine Substanz aus, sondern es bildeten sich nur Tropfenkonglomerate. Gewonnen wurden 4,7 g Chlorophyll B, welches hauptsächlich zur Aschenanalyse verwendet wurde. Die Präparate enthielten in der aschenfreien Substanz:

	%		%
A. Phytol	51,93	B.	7,07
Phäophorbin	25,98		
Rest	21,66		
Phosphorsäureanhydrid	0,43		

Es ist somit eine Phytolabspaltung eingetreten.

2. Es wurden 3 kg Blätter von *Urtica urens* mit Kalziumkarbonat gemischt und gemahlen und mit 4 Liter Alkohol übergossen. Am zweiten Tage wurde der Extrakt an der Pumpe abgesaugt und das Filtrat (3 Liter) mit 2 Liter Petroleumäther vermischt und durch Wasserzusatz (300 ccm) entmischt. Nach einem zweiten Vermischen mit Alkohol und Entmischen mit Wasser wurde mit Chlorkalzium entwässert, filtriert und eingedampft. Gewonnen wurden 2,2 g Chlorophyll. Der Aschengehalt betrug 3,61 % in der Trockensubstanz. Der Stickstoffgehalt wurde durch Verbrennen von 0,1480 g Substanz (0,1424 g aschenfreier Substanz) ermittelt. Die Bestimmung ergab bei 18° C und 731 mm Druck 2,4 ccm Gas, was 1,60 % Stickstoff und 16,98 % Phäophorbin entspricht.

In aschefreier Trockensubstanz wurden durch Hydrolyse gefunden:

	%
Phytol	23,30
Phäophorbin	17,93
Glyceridrest	57,76
Phosphorsäureanhydrid	1,01

Es wurde somit weder der Glyceridrest noch das Phosphorsäureanhydrid entfernt. An Fettsäuren wurden 0,1484 g, das sind 40 %, gewonnen. Das Öl hatte einen Geruch nach Leinöl.

0,1003 g des Öls wurden auf das Schiffchen gebracht und in einem Exsikkator aufbewahrt. Nach einer Woche war das Gewicht auf 0,1028 g gestiegen, wahrscheinlich durch Sauerstoffaufnahme. Durch die Elementaranalyse resultierten 0,2569 g CO₂ und 0,0983 g H₂O. Dies entspricht:

Ursprüngliche Substanz		Oxydierte Substanz	
	%		%
C	70,43		68,73
H	10,89		10,63
O	18,68		20,68

Die Theorie verlangt für:

	Linolsäure	Ölsäure	Oxystearinsäure
	%	%	%
C	77,07	76,51	68,72
H	11,53	12,16	10,92
O	11,40	11,33	20,36

Diese Zusammensetzung entspricht somit einer Oxysäure, wahrscheinlich einer Oxystearinsäure. Für eine Reinigung und

Identifikation reichte das Material nicht aus. Auch ist noch eine zweite Eventualität zu erwägen, nämlich die Bildung von Peroxydsäuren durch Addition von Sauerstoff an Stelle der Doppelbindungen, analog den Säure-Ozoniden.

IV. Versuche mit *Triticum vulgare*.

Aus frischem Material.

Es wurden im Herbst 14 kg Blätter von Winterweizen mit 15 Liter Alkohol rasch extrahiert und der Extrakt ausgepreßt. Nach der Filtration wurde der Extrakt mit dem gleichen Volumen Petroleumäther vermischt und durch Wasserzusatz und Kochsalzlösung entmischt. Sodann wurde nach der Trennung beider Schichten die Petroleumätherlösung filtriert und durch Abdestillieren auf das Volumen von 2 Liter reduziert. Es schieden sich über Nacht etwas gelbe Carotenkristalle ab, die abfiltriert wurden. Dann wurde die Chlorophyll-Lösung mit dem gleichen Volumen Alkohol verdünnt und durch Wasser entmischt. Die Alkohol-Lösung war nur schwach gelblich gefärbt. Nach dem Entwässern mittels Chlorkalzium und neuer Filtration wurde die Lösung zuletzt im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz eingedampft. Es wurden 15 g Chlorophyll mit einem Aschengehalt von 7,21 % gewonnen. Das Präparat hatte beim vollständigen Trocknen eine olivgrüne Färbung angenommen. (Präparat A.)

Aus der Alkohol-Lösung wurde ein zweiter Anteil von Chlorophyll mittels Äther ausgeschüttelt und durch Wasserzusatz die Entmischung herbeigeführt. Die Ätherlösung wurde mit Wasser ausgeschüttelt, mittels Chlorkalzium und dann mit Natriumsulphat entwässert und eingedampft. Da das Präparat sehr aschenreich war, wurde es in wasserfreiem Äther gelöst, die ungelösten Salze abfiltriert, die Lösung von neuem eingedampft und zuletzt im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Trotzdem war das Präparat sehr aschenreich und besaß eine olivgrüne Färbung. (Präparat B.)

Analyse des Präparates A.

Es wurden 4,3610 g (3,709 g aschenfreier) Substanz mit methylalkoholischem Kali verseift und 0,7204 g Phytol, 0,4513 g Phytychlorine und 2,464 g Fettsäuren erhalten. Zur Kontrolle wurde eine zweite Verseifung sowie die Stickstoffbestimmung ausgeführt. 0,8076 g Substanz, in welchen 0,7494 g aschenfreier Trockensubstanz enthalten waren, wurde mittels viel Kupferoxyd in beschriebener Weise verbrannt und lieferten bei 732 mm Druck und 8° C. 8,50 ccm Stickstoff. In Prozenten ausgedrückt, entspricht dies 1,32 % Stickstoff. Die gefundene Stickstoffmenge wurde auf Phäophorbin berechnet und beträgt 14,02 %.

Die Analysenresultate waren folgende:

	I. Bestimmung %	II. Bestimmung %
Phytol	19,42	19,66
Phäophorbin	12,17	14,77
Fettsäuren	66,93	64,09
Phosphorsäureanhydrid	1,48	1,48

Es enthielt also auch dieses Präparat große Mengen an Glyceriden und Phosphatiden. Ob dieselben eine feste Lösung oder eine Verbindung mit dem Phäophorbin bzw. Phäophytin bilden, läßt sich schwer entscheiden. Die Eigenschaft, große Mengen von Chlorkalzium aufzunehmen, teilt die Substanz mit anderen Phosphatiden (Lecithinen).

Identifikation der Fettsäuren.

Aus 1,064 g Fettsäuren wurde durch Filtration in alkoholischer Ätherlösung das Natronsalz dargestellt und sodann das Silbersalz abgeschieden, filtriert, gewaschen und getrocknet. Erhalten wurden 0,45 g Silbersalz. Beim Verbrennen im Quarztiegel ergaben 0,1224 g Salz 0,0351 g oder 28,6 % Silber, woraus sich das Molekulargewicht der Säure $M. = 270$ berechnet. Zur Kontrolle wurde das Salz noch einmal mit Wasser gewaschen und dann im Vakuum getrocknet. Es ging ein Teil der Säure durch Hydrolyse verloren. Die Elementaranalyse des Silbersalzes ergab aus 0,1491 g Salz 0,2497 g Kohlendioxyd und 0,1011 g Wasser, neben 0,0455 g Silber. Die Zusammensetzung des Salzes, sowie der darin enthaltenen fraglichen Säure war also nachstehende:

	Salz %	Säure %
C	45,67	67,36
H	7,53	11,11
O	16,98	21,53
Ag	29,82	—, —

Es wurden 0,2346 g des Silbersalzes in Eisessig gelöst, sodann mit feingeriebenem Bromkalium versetzt und dann nach der Methode von Jos. Hanuš¹⁾ mittels Jodmonobromid, Eisessiglösung und Rücktitration mittels Thiosulfatlösung die Jodzahl bestimmt. Es wurden nur 0,0334 g d. i. 15,06 % Jod gebunden, was 1,93 % Hydroxylsauerstoff und 0,09 % Wasserstoff entsprechen würde. Rechnet man auch diese Sauerstoff- und Wasserstoffmenge mit, so folgt für die Säure die in der folgenden Tabelle angeführte Zusammensetzung. Dabei wird vorausgesetzt, daß es sich um eine Oxysäure $R. (OH)_2$ und nicht bloß um ein Säuredioxyd $R:O_2$ handelt.

¹⁾ Josef Hanuš, Zeitschrift f. Untersuchungen der Nahrungs- und Genußmittel, 1901, 4, 913.

	Aus der Analyse berechnet	Theorie für Dioxypalmitinsäure $C_{16}H_{32}O_4$
C	66,03 %	66,59 %
H	10,99 %	11,20 %
O	22,98 %	22,21 %

Diese elementare Zusammensetzung der Säure liegt jener der Dioxypalmitinsäure, deren Molekulargewicht 288 ist, nahe, und auch das früher bestimmte Molekulargewicht 270 steht — weil die Säure nicht vollständig oxydiert war — mit dieser Annahme nicht im Widerspruch; doch soll damit nicht behauptet werden, daß die Palmitinsäure direkt schon ein Bestandteil des Chlorophylls sein müßte, denn es ist bekannt, daß ungesättigte Säuren, zum Beispiel die Ölsäure, durch Kochen mit alkoholischen Laugen in Isoölsäure vom Schmelzpunkte 44° bis 45° übergeht und durch Oxydation eine Dioxystearinsäure vom Schmelzpunkte 78° und der Zusammensetzung $C_{18}H_{36}O_4$ liefert. Außerdem spaltet sich die Isoölsäure beim Schmelzen mit Kali in Essigsäure und Palmitinsäure. Wie sich bei der Verseifung mit konzentrierter alkoholischer Kalilauge die Linolsäure und andere ungesättigte Säuren verhalten, ist derzeit noch nicht untersucht worden und ebensowenig sind auch die Oxyde der Linolsäure $R:O_2$ näher bekannt.

Ohne Zweifel haben wir es im Glyceridrest mit einer ungesättigten und einer Oxysäure zu tun und es scheint, daß die ungesättigten Säuren dieselbe Rolle wie das Phytol spielen, indem sie die Sauerstoffpotentialdifferenz zwischen der Kohlensäure und dem Formaldehyd in Stufen zerlegen und die Reduktion erleichtern.

Hydrolyse mittels alkoholischer Salzsäure:

1,196 g Chlorophyll (1,017 g aschenfreier Substanz) wurden mit 30 ccm 4prozentiger methylalkoholischer Salzsäure 2 Stunden erwärmt; nach dem Verdünnen mit Wasser wurde filtriert, das Phytol und die Fettsäuren mit Petroleumäther extrahiert, die wässrige Lösung mit $\frac{1}{2}$ g Blutkohle entfärbt und sodann das Cholin nach der Methode von V. Staněk¹⁾ durch das Jodjodkalium abgeschieden, filtriert und nach der Methode von Kjell Dahl in Ammoniak übergeführt; es wurden 0,00055 g Stickstoff, was 0,0047 g Cholin entspricht, gefunden. Die Menge des Cholins, das sich bei der alkalischen Verseifung durch den Geruch des entstehenden Trimethylamins verriet, wäre also 0,46 %. Falls es sich um ein Lecithin handelt, so entsprächen dieser Menge 0,27 % Phosphorsäureanhydrid, während tatsächlich 1,48 % gefunden wurden. Wir schließen daraus, daß der größte Teil des Phosphorpentoxyds direkt an das Phäophytin gebunden ist.

¹⁾ V. Staněk, Über die quantitative Trennung von Cholin und Betain. (Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XLVII, Heft 1, 1906.)

Abspaltung von Phäophytin.

Von großem Interesse für die Kenntnis der Bindung der einzelnen Bestandteile des Chlorophylls war der Versuch einer Abspaltung von Phäophytin durch Oxalsäure, in alkoholischer Lösung. Es wurden 1,71 g des Präparates A in 200 ccm Alkohol gelöst, die Lösung filtriert und 2 g Oxalsäure, in 20 ccm heißem Wasser gelöst, zugesetzt. Es schied sich das Phäophytin in schwarzbraunen Flocken ab, die abfiltriert und gewaschen wurden. Sodann wurde das Phäophytin mittelst Petroleumäthers gelöst, die filtrierte Lösung in einer Platinschale eingedampft und im Vakuum getrocknet. Das alkoholische Filtrat, das die Glyceride enthielt, wurde mittels Petroleumäthers ausgeschüttelt, die Äther-Lösung mit Blutkohle entfärbt, dann der Äther vertrieben und die Substanz bis zur Gewichtskonstanz im Vakuum getrocknet.

In der so erhaltenen Substanz wurde nur Phosphorpentoxyd durch Verbrennen mittels Salpeter-Natron-Soda und durch Abscheiden als Phosphormolybdat bestimmt. Es wurden 1,23 % Phosphorsäureanhydrid gefunden, welche an Glyceridreste gebunden sind. Von Phäophytin wurden 0,259 g mit 1,37 % Asche erhalten, während die Menge der Phosphatide 0,6688 g betrug. Die Menge des Phäophytins beträgt also beiläufig 18 %, was mit dem analytisch gefundenen Mittel der Phäophorbinmenge 13,5 % (S. 204) ziemlich übereinstimmt. Bei der Hydrolyse ergaben 0,1525 g (aschefreier) Substanz 0,0429 g Phytol und 0,0931 g Phytochlorine. Die Resultate waren also folgende:

Tabelle XI.

	Phäophytin	Phosphatide	
Phytol	28,13 %	Glyceride	98,77 %
Phäophorbin	61,05 %	P ₂ O ₅	1,23 %
Glyceridrest	10,82 %		—

Das Phäophytin war also durch ca. 11 % Glyceride verunreinigt. Dies dürfte in größerem oder geringerem Maße wohl auch bei manchen von Willstätter und Oppé (Liebig's Annalen 378, 1) analysierten Phäophytinpräparaten der Fall gewesen sein; der Phytolgehalt von 28 % liegt dem theoretischen Gehalt von 33 % ziemlich nahe.

Elementaranalyse des Präparates A.

0,2178 g (0,2021 g aschefreier Trockensubstanz) ergaben 0,5252 g Kohlendioxyd und 0,1927 g Wasser, somit wies die aschenfreie Substanz folgende Zusammensetzung auf:

Tabelle XII.

	Analytische Resultate	Phytol	Phäophorbin	Differenz	Glyceridrest auf 100 % berechnet
C	70,82 %	15,73 %	8,36 %	46,73 %	69,99 %
H	10,59 %	2,64 %	0,70 %	7,25 %	10,86 %
O	15,79 %	1,05 %	1,96 %	12,78 %	19,15 %
N	1,32 %	—	1,15 %	—	—
P ₂ O ₅	1,48 %	—	—	1,48 %	—
	100,— %	19,42 %	12,17 %	68,24 %	100,— %

Aus der Zusammensetzung des Glyceridrestes in der letzten Kolonne läßt sich auf die Gegenwart einer Oxysäure schließen.

Präparat B.

Dasselbe enthielt 12,12 % Asche und die alkoholische Hydrolyse ergab auf aschefreie Substanz berechnet:

	%
Phytol	5,54
Phäophorbin	12,13
Glyceridrest	81,19
Phosphorsäureanhydrid	1,14

Es sind also auch in diesem Falle die Fettanteile nicht in den Petroleumäther übergegangen, sondern ein großer Teil blieb in der alkoholischen Lösung und ging dann in Äther über.

Sodann wurde durch Verbrennen von 0,2077 g (aschefreier) Substanz der Stickstoff bestimmt und hievon bei 18° C. und 744,5 mm Druck 1,90 ccm gefunden, was 1,03 % Stickstoff und 10,96 % Phäophorbin entspricht.

Bei der Phytolbestimmung wurden die Methylalkoholdämpfe — es wurden 30 ccm Methylalkohollauge auf 1,5603 gr (1,371 g aschefreier) Substanz verwendet — in $\frac{\text{norm}}{5}$ Salzsäure geleitet und das Trimethylamin aufgefangen. Es wurden 0,00027 g Stickstoff, gleich 0,16 % Cholin gefunden. Es enthielt also auch dieses Präparat eine geringe Menge von Lecithin zugemischt.

Weitere Versuche mit *Triticum vulgare*.

Ein Teil der Ernte wurde an der Luft getrocknet und dann mittels Alkohol und Aceton extrahiert.

A. Alkoholextraktion.

0,9 kg reine Blattsubstanz von Weizen wurden gemahlen und im Perkulator mit 4 Liter Alkohol extrahiert; von der filtrierten Lösung wurde aus 1 Liter Lösung durch Oxalsäure das Phäophytin abgeschieden, filtriert, mit verdünntem Alkohol gewaschen, dann

mittels Petroleumäther gelöst, filtriert, in einer Platinschale eingedampft und im Vakuum getrocknet.

Das Produkt war fast aschenfrei und von folgender Zusammensetzung:

	%
Phytol	27,50
Phäophorbin	16,52
Rest	55,98

Das Präparat enthielt also trotz der Fällung mittels Oxalsäure bedeutende Mengen von Glyceriden. Dieselben sind somit während der Alkoholextraktion nicht abgespalten worden.

Aus dem Reste der Lösung wurde das Chlorophyll portionsweise durch zweimal je $\frac{1}{2}$ Liter Petroleumäther aufgenommen in der Absicht, die Menge der zugemischten Glyceride zu beschränken. Die durch Entmischen gewonnene Petroleumätherlösung (ca. 1 Liter) wurde dreimal mit je $\frac{1}{2}$ Liter Alkohol vermischt und durch Wasserzusatz die Entmischung bewirkt. Die dritte Alkohollösung war nicht mehr gelb gefärbt. Nach dem Ausschütteln mit verdünnter Kochsalzlösung wurde filtriert und der Petroleumäther abdestilliert. Erhalten wurden 1,4 g Chlorophyll mit 0,56 % Asche und 3,51 % Phosphorsäureanhydrid.

Die Verseifung von 0,7195 g Substanz ergab 0,1414 g Rohphytol, in welchen durch Titration in Alkoholätherlösung auf Phenolphthalein 0,0162 gr Oxysäure¹⁾ und 0,0956 g Phytochlorin bestimmt wurde.

Es ist also die Zusammensetzung auf aschenfreie Substanz berechnet folgende:

	%
Phytol	17,48
Phäophorbin	10,56
Glyceridrest	68,45
Phosphorsäureanhydrid	3,51

Die Menge von Phosphatiden hat also bei der beschriebenen Arbeitsweise zugenommen, eine Entfernung derselben sowie der Glyceride gelang nicht. In Äther war das Produkt zum Unterschied von Phäophytin löslich.

B. Acetonextraktion.

Während bis dahin die Extraktion mittels Alkohol ausgeführt wurde, unternahmen wir den Versuch durch Extrahieren mittels Aceton, um einerseits die Lecithine auszuschließen, andererseits die gelöste Fettmenge herabzudrücken. Das Chlorophyll ist in Aceton leicht löslich, doch wird das Aceton bei der Entmischung von Petroleumäther in bedeutender Menge zurückgehalten.

Es wurden 0,9 kg getrockneter Blattsubstanz von Weizen mit 3 Liter Aceton übergossen und der Extrakt nach der Filtration

¹⁾ Dies wurde bei allen späteren Versuchen ausgeführt.

fraktionsweise mit zweimal je $\frac{1}{2}$ Liter Petroleumäther vermischt und durch 100 ccm Wasser die Entmischung herbeigeführt. Die Petroleumätherlösung wurde dann dreimal mit je $\frac{1}{2}$ Liter Alkohol vermischt und unter Zusatz von etwas konzentrierter Kochsalzlösung durch Wasser entmischt. Zuletzt wurde die Lösung mit destilliertem Wasser ausgeschüttelt, filtriert, abdestilliert und zuletzt im Vakuum getrocknet.

Das Präparat hatte eine olivgrüne Farbe, war wachsartig, ätherlöslich und enthielt 0,20% Asche.

Die Zusammensetzung des Präparates war nachstehende:

	%
Phytol	26,31
Phäophorbin	30,01
Säurerest	41,54
Phosphorsäureanhydrid	2,14

Bei der Verseifung machte sich kein Geruch nach Trimethylamin bemerkbar, das Präparat war also frei von Lecithin, und dieses ist somit kein integrierender Bestandteil des Chlorophylls der Pflanze, sondern nur accessorisches zugemischt, doch könnte ein genetischer Zusammenhang zwischen Chlorophyll und Lecithin vorhanden sein. Das Phytol enthielt etwas Oxysäure, deren Menge 0,0216 g von dem Gewicht des Phytols abgezogen worden ist.

Von den Oxysäuren wurden 28,3% gewonnen und bei der Filtration 2,6 ccm $\frac{n}{5}$ -NaOH auf 0,1773 g verbraucht, woraus sich das Molekulargewicht 305 bedeutend größer als früher berechnete. Auch in diesem Falle wurde ein bedeutender Gehalt an Phosphatiden gefunden.

Die Elementaranalyse ergab von 0,1643 g Substanz 0,4118 g Kohlendioxyd und 0,1680 g Wasser, was 68,48% Kohlenstoff und 11,39% Wasserstoff entspricht. Das Präparat war frei von Caroten.

Versuch einer Reinigung des Präparates a.

Da sich in der Masse mit der Zeit feste Flocken bildeten, wurde der Versuch gemacht, den flüssigen Anteil auf einem porösen Tonteller abzusaugen. Die Substanz wurde zweimal mit etwas Methylalkohol befeuchtet und nach dem Trocknen analysiert. Die Resultate waren folgende:

	%
Phytol	26,33
Phäophorbin	19,04
Rest	54,63

Es hatte somit die Phäophorbinmenge abgenommen.

Präparat b. Ein Teil des Präparates wurde in Chloroform gelöst, die Lösung filtriert und dann Alkohol zugesetzt. Es schied sich kein Phäophytin ab, sondern erst nach Zusatz von etwas Wasser bildeten sich braune Flocken, die abgesaugt und auf einem porösen Tonteller im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet wurden. Die Zusammensetzung war folgende:

	%
Phytol	33,3
Phäophorbin	30,0
Rest	36,7

Auf diese Weise wurde demgemäß der Glyceridrest nicht entfernt und auch das Verhältnis zwischen Phytol und Phäophorbin entsprach nicht dem Verhältnisse 1:2. Die Verluste bei dieser Reinigungsweise waren sehr bedeutende und die gewonnene Menge der Substanz gering; sie betrug 0,1530 gr.

Chlorophyll aus Gras, bestehend aus junger Vegetation von *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Lolium italicum*.

4 kg frischen Grases wurden mit Kalziumkarbonat gemahlen, im Perkolator mit Aceton übergossen und während der Nacht abtropfen gelassen. Der Extrakt (3 Liter) wurde portionsweise zweimal in je $\frac{1}{2}$ Liter Petroleumäther aufgenommen und die Entmischung mittels Wasser und etwas Kochsalzlösung bewirkt. Sodann wurde die Petroleumätherlösung dreimal mit Alkohol gemischt und durch Wasser entmischt. Dadurch wurden die gelben und roten Stoffe vollständig entfernt — es zeigte sich am eingetauchten Fließpapierstreifen kein gelber Rand über dem grünen — dann wurde der Petroleumäther abdestilliert, im Vakuum bei 90° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Das Präparat von olivgrüner Farbe, die erst in der letzten Trocknungsperiode eintrat, enthielt 2,78% Asche und hatte folgende Zusammensetzung:

	%
Phytol	15,46
Phäophorbin	21,12
Rest	60,80
Phosphorsäureanhydrid	2,62

Die Stickstoffbestimmung ergab 3,8 ccm Stickstoff bei 733,5 mm Druck und 190° C, was 1,85% Stickstoff oder 19,6% Phäophorbin entspricht.

Abscheidung von Phäophytin.

Der Versuch einer Abscheidung von Phäophytin mittels Oxalsäure aus der Acetonlösung lieferte ein Produkt in Flocken von brauner Farbe, die abgesaugt wurden, mit Aceton, welchem 20% Wasser dem Volumen nach zugesetzt worden war, gewaschen und zuletzt in Petroleumäther aufgenommen wurden. Die Trockensubstanz enthielt 2,8% Asche und

	%
Phytol	15,17
Phäophorbin	15,89
Glyceridrest	68,94

Somit läßt sich auch hier der Glyceridrest nicht von dem Phäophorbin abspalten, was darauf hinweist, daß die Phosphorsäure nicht am stickstoffhaltigen Radikal gebunden sein kann. Es liegt wahrscheinlich eine Esterbindung vor.

Die im Präparate enthaltenen Säuren wurden größtenteils mit Petroleumätherdämpfen flüchtig und ungesättigt. Der weniger flüchtige Rest, 48 %, erstarrte zu fester Substanz, welche nur 4,7 % Jod aufnahm, während die Gesamtsäure 26 % absorbierte.

Chlorophyll aus *Tanacetum vulgare* L.

Es wurden 3 kg Blattsubstanz von frischen, zur Mittagszeit bei vollem Sonnenlicht gesammelten Blättern mit Kalziumkarbonat gemahlen und mittels Aceton extrahiert. Das Chlorophyll wurde dann in Petroleumäther aufgenommen und dreimal mittels Alkohol rasch gereinigt. Die Entmischung wurde durch verdünnte Kochsalzlösung ausgeführt. Nach der Filtration wurde mit Natriumsulfat entwässert, sodann filtriert, der Petroleumäther abdestilliert und das Produkt im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz bei 90° C. getrocknet. Es enthielt 1,41 % Asche und in aschenfreier Substanz:

	%
Phytol	2,38
Phäophorbin	16,59
Glyceridrest	78,26
Phosphorsäureanhydrid	2,77

Der Phytolgehalt ist also ein sehr geringer, dafür der Glyceridgehalt sehr bedeutend.

Die Elementaranalyse ergab bei 23,5° C. und 745 mm Druck aus 0,7089 g (0,6977 g aschenfreier) Substanz 8,6 ccm Stickstoff. Dies entspricht 1,36 % Stickstoff und 14,71 % Phäophorbin.

Ein Teil der Säuren wurde in Ätheralkohollösung mittels Kalihydratlösung titriert, das Silbersalz abgeschieden, abfiltriert und gewaschen, sodann auf einem Tonteller und zuletzt im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Es färbte sich braun. Aus 0,0903 g des Salzes wurden 0,0289 g, das sind 32,01 %, Silber erhalten. Somit wäre das Molekulargewicht der Säure 230.

Die Säure war ungesättigt. 0,1973 g Säure absorbierten, nach der Methode von J. Hanuš bestimmt, 0,2733 g Jod; es ist also die Jodzahl 138,5. Diese Resultate, welche freilich nur annähernd sind, da eine Reinigung der Säure nicht vorgenommen werden konnte, entsprechen einer Säure $C_{14}H_{24}O_2$, deren Molekulargewicht 224 wäre und die eine den Sauerstoff depolarisierende und übertragende Rolle spielt, wie sie sonst wohl dem Phytol zukommt. Wir beabsichtigen diesen Fall noch näher in größerem Umfange zu studieren.

Chlorophyll aus reiner Blattsubstanz von Waldahorn (*Acer pseudoplatanus*).

1. Es wurden 2 kg Ahornblätter am 9. Mai gesammelt, mittels Aceton extrahiert, das Chlorophyll portionsweise mit zweimal je

$\frac{1}{2}$ Liter Petroleumäther aufgenommen und die Entmischung mittels verdünnter Kochsalzlösung bewirkt. Der Petroleumätherextrakt wurde zweimal mit reinem Alkohol vermischt und entmischt. Die ursprünglich braungrüne Farbe der Lösung ging in reingrüne mit roter Fluoreszenz über. Der Extrakt wurde mit Wasser ausgeschüttelt, filtriert, durch schwefelsaures Natrium entwässert und dann der Petroleumäther zuletzt im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand von öliger Beschaffenheit wurde im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Eine Probe im Schiffchen für die Elementaranalyse 3 Stunden, in einer von Wasserdampf umspielten evakuierten Röhre, nachgetrocknet, zeigte keinen Gewichtsverlust. Das Präparat war in Äther vollständig löslich und eine Trennung von Glyceriden von dem Phäophytin auf diese Weise nicht möglich. Der Aschengehalt betrug 2,28 % und die aschenfreie Trockensubstanz enthielt:

	%
Phytol	15,64
Phäophorbin	11,64
Glyceridrest	70,53
Phosphorsäureanhydrid	2,19

Ein Geruch nach Trimethylamin wurde bei der Verseifung nicht beobachtet, somit war die Substanz lecithinfrei. Die Elementaranalyse ergab:

a) Bei der Stickstoffbestimmung 3,85 ccm Stickstoff bei 22° C. und 740 mm Druck aus 0,3403 g (0,3326 g aschefreier) Substanz. Dies entspricht 1,26 % Stickstoff, das sind 13,36 % Phäophorbin.

b) Die Kohlenstoff- und Wasserstoff-Bestimmung ergab beim Verbrennen von 0,2577 g (0,2518 g aschefreier) Substanz 0,6171 g Kohlendioxyd und 0,2014 g Wasser. Die Resultate sind also:

Tabelle XIII.

	Elementare Zusammen- setzung	Phytol o/o	Phäophor- bin o/o	Glycerid o/o	Glycerid auf 100 o/o	$(C_{14}H_{24}O_2)_2$ C_3H_5O
C	66,05 %	12,67	9,17	44,21	64,24	65,10 %
H	8,89 %	2,13	0,77	5,99	8,71	9,71 %
O	21,61 %	0,84	2,16	18,61	27,05	25,19 %
N	1,26 %	—	1,26	—	—	—
P ₂ O ₅	2,19 %	—	—	2,19	—	—
	100,— %	15,64	13,36	71,00	100,—	100,— %

Die Säuren sind ziemlich flüchtig, es wurden nur 44,8 % gewonnen. Ihr mittleres Molekulargewicht wurde durch Titration mittels Kalilauge in alkoholätherischer Lösung gleich 256 ermittelt. Das Silbersalz, welches ausfiel, ergab in 0,1015 g Salz 0,0313 g Silber, d. s. 30,84%, woraus das Molekulargewicht 243 resultiert. Es könnte auch eine Multiplum sein, wenn es sich um eine mehrbasische Säure handelte, dem aber widerspricht die Flüchtigkeit der Säuren. Die Säure war nicht vollständig gesättigt, die Jod-

zahl wurde gleich 48,5 J. gefunden. Des Molekulargewicht entspricht etwa einer Säure $C_{14}H_{24}O_2 = M. 224$, deren Silbersalz 32,59 % Silber enthalten würde und die zum Teil als Oxyderivat vorhanden wäre. Es würde dies mit der Elementarzusammensetzung des Glyceridrestes ziemlich übereinstimmen. Vielleicht bieten diese Säuren in Gegenwart stickstoffliefernder Substanzen auch das Baumaterial für den Blattfarbstoff.

2. Aus 2 kg Ahornblätter, welche am 9. Juli gesammelt wurden, wurde das Chlorophyll in der gleichen Weise wie bereits geschildert, mittels Aceton extrahiert. Bei der zweiten Reinigung mittels Alkohol schied sich eine schwarze Substanz, welche die Entmischung verhinderte, aus. Dieselbe wurde, da deren Menge bedeutend war, abfiltriert. Die petroleumätherische Chlorophyll-Lösung wurde dann noch einmal mittels Alkohol gereinigt.

Aus dem Petroleumäther wurden nur 0,6828 g Substanz gewonnen. Die schwarze Substanz löste sich in Alkohol mit blaugrüner Farbe, wurde von Äther aufgenommen und nach dem Entwässern der Ätherlösung mittels Natriumsulfat durch Abdestillieren in festem Zustande erhalten. Die Menge dieses an Phäophorbin reichen Anteiles betrug 2,2846 g. Aus diesem Präparate wurden 16,5 % Fettsäuren gewonnen, welche die Jodzahl 65,9 aufwiesen. Die Analyse ergab auf aschenfreie Substanz berechnet:

	%
Phytol	12,18
Phäophorbin	34,83
Glyceridrest	52,40
Phosphorsäureanhydrid	0,59

Der Anteil, welcher aus dem Petroleumäther durch Eindampfen gewonnen wurde, enthielt 3,76 % Asche und seine Zusammensetzung war folgende:

	%
Phytol	29,08
Phäophorbin	17,42
Glyceridrest	52,11
Phosphorsäureanhydrid	1,39

Demnach ging das abgespaltene Phytol und die Phosphatidanteile in Petroleumäther über, doch trat keine vollständige Trennung des phosphatidhaltigen und freien Chlorophylls ein. Da das aus der Ätherlösung gewonnene Präparat Phytol und Phäophorbin in einem Verhältnis wie 26 : 74 enthält, so fand eine Abspaltung des Phytols statt. Berechnet man aus der Summe der Mengen beider Präparate den Phytolgehalt, so stellt sich derselbe, wie Willstätter und Oppé gefunden haben, gegenüber dem Phäophorbin nahe wie 1 : 2.

3. Endlich wurden aus 2 kg reiner Blattsubstanz von Ahornblättern, die am 9. Oktober gesammelt wurden, zwei Chlorophyllpräparate gewonnen. Die Extraktion erfolgte wieder mittels Aceton, die Isolierung durch Entmischung des Petroleumäthers und dann der Ätherlösung durch Wasser. Um festzustellen, ob

die Braunfärbung in den Endstadien der Trocknung durch Hydrolyse stattfindet, wurden diese Lösungen über 14 Tage durch Chlorcalcium getrocknet. Die Präparate blieben bis zur vollständigen Trocknung dunkelgrün, enthielten aber viel Asche. Auch Glycerin wurde nachgewiesen.

Das Präparat aus Petroleumäther enthielt 8,18 % Asche und ergab bei der Verseifung auf aschefreie Substanz berechnet:

	%	%
Phytol	32,84	31,48
Phäophorbin	20,03	
Glyceridrest	45,66	
Phosphorsäureanhydrid	1,47	1,47

Bei der Elementaranalyse ergaben bei 19° C. und 745 mm Druck 0,3398 g Substanz 5,2 ccm Stickstoff; dies entspricht 1,89 % Stickstoff, das sind 20,03 % Phäophorbin. An Phytochlorinen wurden, auf aschenfreie Substanz berechnet, 20,86 % gefunden.

0,2193 g (0,2013 g aschefreier) Substanz verbrannten zu 0,1712 g Wasser und 0,5123 g Kohlendioxyd, was 68,96 % Kohlenstoff und 9,45 % Wasserstoff entspricht. Somit ist die Zusammensetzung der aschenfreien Substanz folgende:

Tabelle XIV.

	%	Phytol %	Phäophorbin %	Rest %	Rest auf 100 % be- rechnet
C	68,96	26,60	13,75	28,61	62,67
H	9,45	4,47	1,16	3,82	8,36
O	18,23	1,77	3,23	13,23	28,97
N	1,89	—	1,89	—	—
P ₂ O ₅	1,47	—	—	—	—
		32,84	20,03	45,66	100,—

An Säuren wurden nur 22 % gewonnen, der Rest verflüchtigte sich mit dem Petroleumäther. Auf 0,1012 g der Säuren wurden 1,55 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH verbraucht, was einem Molekulargewicht der Säure von 326 entspricht, so daß mit Rücksicht auf den großen Sauerstoffgehalt, der aus der obigen Analyse resultiert, eine Oxysäure vorhanden ist.

Die Jodzahl wurde ebenfalls bestimmt: es wurden 0,1473 g der Säuren mit titrierter Jodmonobromidlösung versetzt und mit Thiosulfatlösung zurücktitriert. Die Jodzahl belief sich auf 80,04. Dies entspricht, falls man das oben ausgeführte Molekulargewicht der Säure in Betracht zieht, etwa 2 Atomen Jod und somit einer Doppelbindung.

Das Silbersalz, welches aus der alkoholischen Lösung nach der Titration abgeschieden wurde, wurde abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet. Es ergaben 0,0785 g desselben 0,0223 g oder 28,41 % Ag, so daß das Molekulargewicht der Säure 276 wäre.

Aus 2,393 g Substanz (2,22 g aschefreier) Substanz wurde noch eine zweite Hydrolyse ausgeführt. b)

Die gewonnenen Säuren erstarrten. Der Schmelzpunkt der Säure, welche am porösen Teller abgesaugt und im Vakuumexsikator getrocknet war, wurde gleich 52° gefunden. Das Silbersalz ergab aus 0,0524 g durch Verbrennen 0,0158 g Silber, d. s. 30,15 %, woraus das Molekulargewicht 251 für die Säure resultiert. Bei der Titration der Säure ergab sich das Molekulargewicht 274.

Die Elementaranalyse lieferte folgende Resultate:

0,1530 g Salz ergaben 0,2669 g CO_2 und 0,0936 g H_2O . Dies entspricht nachstehender Zusammensetzung:

	Salz %	Freie Säure %	Theor. für $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_4$ %
C	47,57	67,83	65,06
H	6,79	10,08	10,15
O	15,49	22,09	24,79
Ag	30,15	—	—
	100,—	100,—	100,—

Dies entspricht ungefähr der Formel $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_4$ für die Säure und das Molekulargewicht wäre 258.

Ing. F. Černý, Adjunkt der Abteilung für Wein- und Obstuntersuchung, fand in der Lösung nach der Bestimmung des Phäophorbins durch Hydrolyse im ersten Falle 7,07% und 6,77% Glycerin, im zweiten Falle 6,15% Glycerin, was bei einem Molekulargewicht der Säure einem Di-Glycerid entspricht und einer Bindung an Phosphorsäure (die jedoch nicht ausreicht) oder Phäophorbin erwarten läßt.

b) Der aus der ätherischen Lösung gewonnene Anteil von Chlorophyll war sehr schön dunkelgrün, jedoch sehr reich an Asche, die 13,80% betrug. Es bräunte sich das Präparat an Stellen, wo es in dünner Schicht aufgetragen war, erst nach längerer Zeit. Die Asche enthielt neben Magnesiumoxyd Chlorkalcium. Bei der Analyse wurden folgende Resultate gewonnen:

	%
Phytol	22,94
Phäophorbin	20,61
Glyceridrest	54,23
Phosphorsäureanhydrid	2,22

Die Molekulargröße der Säure wurde gleich 250 gefunden. Das Präparat unterscheidet sich von dem in der Petroleumätherlösung nur dadurch, daß ein Teil von Phytol abgespalten worden war und in die Petroleumätherlösung überging.

Aus dem großen Aschengehalt folgt, daß eine Addition von Chlorkalzium eingetreten ist, dafür wurde jedoch die Hydrolyse der Substanz durch die letzten Spuren von Wasser beim Endtrocknen verhindert, weshalb die ursprüngliche schöne grüne Farbe erhalten

blieb. Aus dieser Erfahrung läßt sich schließen, daß die Phosphatide in gebundenem Zustande im Molekül des Chlorophylls vorhanden sind, erst nach der Spaltung das Phäophytin entsteht und seine braune Färbung den Präparaten verleiht.

Verdünnte Lösungen von Phäophytin und Phosphatiden, deren Farbe ebenfalls gelb ist, färben Filtrierpapier gelb und zwar in derselben Nuance, wie sie die Blätter beim herbstlichen Farbenwechsel annehmen.

Chlorophyll, welches zum größten Teile intakt ist, färbt Filtrierpapier grün, wie das in den beiden letzten Fällen überhaupt, in den früheren vor der Endtrocknung der Fall war. Das aus *Galeopsis versicolor* gewonnene und phäophorbidreiche Präparat hatte eine blaugrüne Färbung.

Der herbstliche Farbenwechsel in gelb ist auf folgende Prozesse zurückzuführen:

1. Oxydation der Säuren in Oxysäuren.
2. Abspaltung der Glyceridphosphorsäure und des Phytols unter Mitwirkung der Chlorophyllase, wie Willstätter und Stoll festgestellt haben, verbunden mit der Bildung von freiem Phäophorbin und Phäophytin von gelbbrauner Farbe.
3. Durchdringen der Farbe von Xantophyll und Caroten.

Ob eine Oxydation von Phäophorbin im Sinne eines Chinonimids vorliegt, wie es nach der von Willstätter und Hocheder festgestellten Formel möglich wäre, oder ob es sich um eine phthaleinartige Umwandlung des Phäophorbins handelt, ist eine noch offene Frage.

Bei der Extraktion von Chlorophyll mittels Alkohol findet wohl unter Mitwirkung von Chlorophyllase und schwacher Alkalien¹⁾ nicht nur die Abspaltung von Phytol und Ersatz durch den Alkohol statt, sondern auch eine Abspaltung der Phosphorsäureglyceride, wie auf S. 206 nachgewiesen wurde.

Absorptionsspektren.

Von den Präparaten aus *Galeopsis versicolor*, sowie von dem in Äther und Petroleumäther löslichen Chlorophyllanteilen aus Ahornblättern wurden die Spektren mittels eines Quarzspektrographen von Hilger & Co. und einer Nernstlampe, sowie einer Quecksilberquarzlampe als Lichtquelle ermittelt.

Während das Chlorophyll aus *Galeopsis versicolor*, welches ca. 30% Phäophorbin enthielt, im Spektrum, das mittelst der Nernstlampe erhalten wurde, alle 5 (respektive 6) Absorptionsbänder und die Endabsorption in Blau besitzt, zeigen die Spektren der Ahornblattchlorophylle nur das starke Absorptionsband in orangeröt zwischen $\lambda = 680-640$, wie es auch Tschirch, Willstätter

¹⁾ J. Hanuš, Die Äthylesterzahl der Fette. (Königl. Gesellschaft der Wissenschaften in Prag. 1908, 8. Z. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. 1908.)

und Hocheder gefunden haben. Die übrigen Absorptionsbänder sind verschwunden. Die Konzentrationen der Lösungen waren:

1. Die Lösung von Chlorophyll aus *Galeopsis versicolor* enthielt in 100 ccm des Lösungsmittels 0,116 g Substanz.

2. 100 ccm der ätherischen Lösung von Chlorophyll aus Ahornblättern enthielten 0,066 gr Substanz.

3. Die Lösung von Chlorophyll aus Ahornblättern in Petroleumäther enthielt 0,092 g auf 100 ccm des Lösungsmittels berechnet. Die Konzentration der verdünnteren Lösung war $\frac{1}{5}$ dieses Wertes.

Die Messung wurde mit einer Glasküvette von 10 mm Schichtdicke, beziehungsweise mittels einer Epruvette aus Quarzglas ausgeführt.

Das mittels der Quecksilberquarzlampe erhaltene Spektrum der Chlorophylle zeigt, daß die meisten der Linien des Spektrums der Quecksilberquarzlampe im ultravioletten Teil absorbiert sind, ein Beweis, daß das Chlorophyll die chemisch-aktiven Strahlen absorbiert und in chemische Reduktionsarbeit umsetzt. Charakteristisch für das Chlorophyllspektrum sind die hellen Linien von λ — 578 und 547. (Siehe Tafel IV.)

Noch bedeutend interessanter als die etwas zu kleinen Spektren des Spektrographen sind die mittels des Spektrophotometers von Schmidt & Haentsch erhaltenen Spektrogramme. (Siehe Tafel V.)

Dieselben sind in der beigefügten Tafel V graphisch dargestellt, indem auf die Abszissenachse die Wellenlängen, auf die Ordinaten die relativen Lichtintensitäten aufgetragen sind. Die Messung wurde mit einer Glasküvette von einer Schichtdicke von 10 mm mit Hilfe des Schulzschen Körpers ausgeführt. Die Wellenlängenkurve wurde mittels folgender Spektrallinien festgelegt:

Li	$\lambda = 675$	rot
	$\lambda = 610$	orange-gelb
Na	$= 590$	gelb
	589	
Tl	$= 535$	grün
Hg	$= 491$	blau
	436	indigo
	405	violett

Die Lösung des Chlorophylls aus den Blättern von *Galeopsis versicolor* ließ von den Spektrallinien der Quecksilberquarzlampe folgende sichtbar erscheinen:

violett (schwach)	$\lambda = 436$
blau	$= 492$
grüngelb (hell)	$= 546$
gelb	$= 559$
	568
gelb (sehr hell)	$= 577$
	579
orange-gelb (hell)	$= 589$
	590
rot	$= 656$

In den Spektrophotogrammen zeigt das Chlorophyll aus *Galeopsis versicolor* folgende Absorptionsbänder:

	Chlorophyllan von Tschirch	Chlorophyll von Willstätter u. Hocheder	Unsere Messungen
Band I	680—640	688—640	668—640
Band II	620—590	622—597	618—600
Band III	570—560	569—556	586—578
	—	bezw. 551	566—556
Band IV	550—530	542—525	540—528
Band V	513—590	515—488	512—594
Endabsorption	von 470 an	von 479 an	von 470 an

Die Präparate aus Waldahornblättern (*Acer pseudoplatanus*) weisen nur zwei Absorptionsbänder auf, die übrigen sind nur schwach angedeutet und verschoben. Wir finden folgende Wellenlängen für die Absorptionsbänder:

	Petroleumäther		Ätherlösung
	konzentriert	verdünnt	
Band I	686—670	666—650	660—640
Band V	494—486	466—464	
Endabsorption	von 470 an	von 460 an	von 468 an

Der Unterschied zwischen den beiden Spektren von *Galeopsis versicolor* und von Ahorn (*Acer pseudoplatanus*) ist bedeutend und findet keine Erklärung durch die analytischen Resultate.¹⁾ Der Grund dürfte darin liegen, daß das Chlorophyllpräparat aus *Galeopsis versicolor* Magnesiumphäophorbid enthält, während jene aus Waldahornblättern (*Acer pseudoplatanus*) neben Phäophitiden Chlorolecithine enthalten.

Chlorophyll aus Kiefernadeln.

Es wurden 2 kg gemahlener Kiefernadeln in 3 Partien nacheinander dreimal mit je 1·5 l Alkohol, welcher immer 1/4 Stunde in Berührung gelassen wurde, extrahiert. Das Chlorophyll wurde nur zum Teil extrahiert und ein großer Teil blieb in den Nadeln zurück. Der Extrakt war intensiv dunkelgrün gefärbt und wurde dreimal durch Vermischen mit Alkohol und Entmischen durch verdünnte Kochsalzlösung gereinigt, sodann mittels Natriumsulfat entwässert und hierauf der Äther verdampft. Das Präparat wurde bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Ein Teil der frischen Lösung, enthaltend 0,083 g Trockensubstanz in 100 cm³ der Lösung, wurde zur Feststellung des Spektrums verwendet, welches in der Tafel V dargestellt ist: Dasselbe ist ähnlich jenem aus Ahorn in Petroleumäther.

¹⁾ Phytollösungen haben ein Absorptionsspektrum, wie die Lösungsmittel allein, jedoch mit dem starken Absorptionsband in rot.

Aus einem Teile des Chlorophyllpräparates wurde durch Lösen in Chloroform und Fällen mit alkoholischer Oxalsäure ein grün-schwarzer Niederschlag abgeschieden, welcher abgesaugt, mit Chloroform-Alkohol gewaschen, in Äther gelöst, eingedampft und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurde. Die Zusammensetzung desselben war folgende:

	%
Phytol	23,72
Phytochlorine	63,25
Rest	13,03

Das Phytol enthielt etwas Säure. Aus der Analyse folgt, daß der Niederschlag, dessen Menge nur gering war (7%) und wahrscheinlich dem zersetzten Anteile entsprach, zum größten Teile aus Phäophytin, welches durch eine geringe Menge des ursprünglichen Chlorophylls verunreinigt war, bestand.

Der Rest des Chlorophyllpräparates, welches olivbraun gefärbt war und, wie aus dem Geruche bemerkbar war, Terpene enthielt, wurde ebenfalls der Analyse unterworfen. Der Aschengehalt betrug 0,66% und in der aschenfreien Trockensubstanz wurde durch Hydrolyse gefunden:

	%
Phytol	15,42
Phytochlorine	28,73
Differenz	55,13
P ₂ O ₅	0,72

Somit waren auch hier die Glyceridphosphorsäure und die Glyceride, sei es gebunden oder zugemischt, nicht entfernt worden; doch ist hier das Verhältnis zwischen Phytol und den Phytochlorinen nahezu gleich 1:2, wie es von Willstätter und Stoll gefunden worden ist.

Es wurden zur Feststellung, ob die Präparate nur Magnesiumoxyd enthalten, oder ob auch Kalzium- und Kaliumoxyd vorhanden ist, eine Reihe von Chlorophyllpräparaten vorsichtig verascht und die Asche analysiert. Die Resultate sind auf Trockensubstanz berechnet und in der folgenden Tabelle enthalten.

Tabelle XV.

Präparat	CaO %	MgO %	K ₂ O %	Na ₂ O %
Merk	0,11	0,34	1,43	0,61
Reine Blattsubstanz von <i>Galeopsis versicolor</i> A (Petroleumäther)	0,18	0,56	0,13	Spuren
<i>Galeopsis versicolor</i> B (Äther)	0,79	0,14	0,16	0,05
<i>Lathyrus odoratus</i> B	0,18	0,53	0,10	—
<i>Urtica urens</i> (Petroläther)	1,07	0,42	0,14	0,15
<i>Urtica urens</i> B (Äther)	0,62	0,33	0,28	0,26
<i>Scrofularia</i> (Äther)	0,26	0,13	0,03	—

Die Asche enthält somit stets neben MgO auch gewisse Mengen von Calciumoxyd und Kaliumoxyd (von den mittels CaCl₂ entwässerten Präparaten wird da abgesehen). Die Analysen wurden in Platingefäßen oder in Gefäßen aus Jenaer — kalifreiem — Glase ausgeführt. Es dürfte somit das K₂O mit in den Chlorophyllen enthalten sein, um so mehr, als Kalisalze in organischen Lösungsmitteln fast unlöslich, Calcium und Magnesiumsalze meist ziemlich leicht löslich sind.

Bestimmung des Phäophorbins in den Präparaten.

Das Phäophorbin wurde nach der Verseifung der Chlorophyllpräparate mittels methylalkoholischer Kalilauge und siebenmaliger Ausschüttelung des Phytols mittels Äther, in der mit warmem Wasser verdünnten und durch dasselbe Filter, durch welches die ätherische Phytollösung filtriert worden war, filtrierten Seifenlösung bestimmt. Die Lösung wurde mit Salzsäure angesäuert, dann mittels Petroleumäther dreimal die Fettsäuren ausgeschüttelt, der Extrakt durch ein gewogenes Filter filtriert und mit Petroleumäther nachgewaschen. Die wässrige saure Lösung, stets durch etwas Phytochlorin blau gefärbt, wurde dann durch dasselbe Filter geschickt und der Niederschlag mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Menge, welche in der sauren Lösung gelöst blieb, ist, wie wir uns durch Extraktion mittels Äther überzeugten, ganz unbedeutend. Die Resultate waren, mit jenen aus der Stickstoffbestimmung verglichen, folgende:

Tabelle XVI.

Provenienz des Präparates	Phäophorbin aus Stickstoff berechnet %	Phytochlorinchlorhydrat %	Verhältniszahl %
<i>Urtica urens</i> II	16,99	17,93	0,946
Gras	19,60	21,12	0,929
<i>Triticum vulgare</i> (frisch)	14,02	14,77	0,948
<i>Triticum vulgare</i> (B)	10,96	12,13	0,883
<i>Tanacetum vulgare</i> L.	14,71	16,59	0,887
<i>Galeopsis versicolor</i>	60,96	58,49	1,042
Mittel	—	—	0,94

Aus den Resultaten, welche nicht allzu sehr differieren, wenn man die komplizierte Bestimmungsweise sowie die Möglichkeit verschiedener Phytochloringemenge in Erwägung zieht, läßt sich als Faktor für das Phäophorbin wohl die Zahl 0,94 annehmen mit einem wahrscheinlichen Fehler $\pm 8\%$ des Wertes.

Analyse des Phytochlorinniederschlages aus *Galeopsis versicolor*: Aus 0,1097 g Substanz wurden beim Verbrennen 0,0935 g Wasser und 0,2876 g Kohlendioxyd erhalten. Sodann lieferten 0,1796 g Substanz 8,3 cm³ Stickstoff bei 16° C und 750 mm Druck. Diese Resultate entsprechen der Zusammensetzung:

	%
C	71,50
H	9,43
N	7,05
O	12,02

Die Substanz war also nicht reines Phytochlorin, sondern enthielt auch Phytorhordine und wahrscheinlich geringe Mengen an Fettsäuren.

IV. Über den Einfluß der sich im Minimum befindenden Vegetationsfaktoren, Magnesium und Phosphor, auf die Entwicklung der Vegetation von *Polygonum fagopyrum* und *Zea Mais*.

Es ist gewiß von großem Interesse, die Frage zu studieren, welchen Einfluß Magnesium und Phosphor, wenn sie sich im Minimum befinden, bei Gegenwart aller anderen Vegetationsfaktoren, die im Optimum vertreten sind, auf die Vegetation ausüben. Das Gesetz vom Minimum nach Justus v. Liebig besagt in der notwendig erweiterten Fassung von Mitscherlich¹⁾:

„Der Pflanzenertrag richtet sich nach demjenigen Vegetationsfaktor, welcher verhältnismäßig am meisten im Minimum ist.“

In unserem Falle wurden die Versuche so angeordnet, daß die Vegetationsfaktoren Magnesium und Phosphor in der Nährlösung überhaupt nicht vorhanden waren, so daß die Pflanzen nur an jene Mengen von Magnesium und Phosphor angewiesen waren, welche im Embryon und Endosperm der Samen zugegen sind.

Die ausgesuchten angefeuchteten Samen von *Polygonum fagopyrum* und *Zea Mais*, welche annähernd das gleiche Gewicht besaßen, gaben wir in einem Linhart'schen Keimapparat, welcher mit von sterilem Brunnenwasser angefeuchteten, sterilem Sande gefüllt war. — Sobald die Keimlinge der angewendeten Pflanzen, abgesehen von der Hauptwurzel und der Plumula, noch einige, mehrere Zentimeter lange Nebenwurzeln ausgebildet hatten, nahmen wir sie vorsichtig aus dem Keimapparat heraus, spülten sie mit sterilisiertem destilliertem Wasser sehr sorgfältig ab und brachten sie mit Hilfe der Wasserkultur-Methode zur weiteren Entwicklung.

Die Pflanzen züchteten wir in einer Nährlösung, welche ab und zu erneuert wurde. In 1000 ccm destillierten Wassers der Nährlösung waren enthalten:

I. Nährlösung mit allen Nährstoffen.

1,— g Calciumnitrat,
0,25 g Kaliumchlorid,

¹⁾ Eilh. Alfred Mitscherlich, Arbeiten aus dem landw. Institute der Universität Königsberg i. Pr. (Abteilung f. Pflanzenbau. Landw. Jahrbücher u. Landwirtschaftliche Versuchsstationen 1912 und 1913.)

0,02 g Natriumchlorid,
 0,25 g Magnesiumsulfat,
 0,50 g Dikaliumphosphat,
 0,10 g Ferrophosphat und
 0,25 g Calciumsilikat.

II. Nährlösung ohne Magnesium.

1,— g Calciumnitrat,
 0,25 g Kaliumchlorid,
 0,02 g Natriumchlorid,
 0,25 g Kaliumsulfat,
 0,50 g Dikaliumphosphat,
 0,10 g Ferrophosphat und
 0,25 g Calciumsilikat.

III. Nährlösung ohne Phosphor.

1,— g Calciumnitrat,
 0,25 g Kaliumchlorid,
 0,25 g Magnesiumsulfat,
 0,01 g Ferrosulfat,
 0,02 g Natriumchlorid,
 0,25 g Calciumsilikat.

Es sei hier noch ausdrücklich bemerkt, daß alle angewandten chemischen Verbindungen speziell umkristallisiert wurden und chemisch rein waren.

Versuche mit *Polygonum fagopyrum*.

Die Vegetationsgefäße, deren Glaswände mit einer Paraffinschicht versehen waren, hatten einen Inhalt von 3500 ccm und wurden in folgende 3 Gruppen geteilt: Bei der I. Gruppe, welche 10 Vegetationsgefäße umfaßte, befanden sich in der Nährlösung alle Nährstoffe. Bei der II. Gruppe, die aus 20 Vegetationsgefäßen bestand, war in der Nährlösung kein Magnesium vorhanden und bei der III. Gruppe, 30 Vegetationsgefäße umfassend, war in der Nährlösung kein Phosphor zugegen.

Die Versuche wurden am 7.—13. Mai begonnen. Durch die Vegetationsgefäße aller drei Gruppen wurde täglich frische Luft durchgeleitet und die Nährlösung immer nach 30 Tagen erneuert. Die Vegetationszeit bei der I. und II. Gruppe dauerte 70—80 Tage. Bei der III. Gruppe starben die Pflanzen schon nach 40—50 Tagen ab.

Schon nach 23—30 Tagen bot sich uns ein interessantes Bild. Ohne Magnesium in der Nährlösung waren die Pflanzen ziemlich gut entwickelt, jedoch nicht so gut, wie bei Gegenwart aller Nährstoffe in der Nährlösung. Die Blätter hatten eine schöne grüne Farbe, und durch die mikroskopische Untersuchung ließ sich konstatieren, daß die Palisadenzellen besonders chlorophyllreich waren und die Chlorophyllkörner eine normale

grüne Farbe besaßen. Bei Abwesenheit von Phosphor in der Nährlösung entwickelten sich die Pflanzen nur sehr kümmerlich. Die Pflanzen waren anfangs grün, aber schon nach 30 Tagen nahmen sie eine rötlichbraune Farbe an, wie Chlorophyll beim Zerfalle durch Hydrolyse, und starben nach 40—50 Vegetationstagen ab.

Wir nahmen auch an diesen Blättern eine mikroskopische Untersuchung vor, jedoch noch bevor sich die rötlichbraune Farbe an den Blättern zeigte, also solange sie noch grün waren; dies war ungefähr nach 20 tägiger Vegetationszeit noch der Fall. Der Querschnitt durch diese Blätter zeigte, daß die Palisadenzellen ungemein arm an Chlorophyllkörnern waren, welch' letztere eine abnormale grüne Farbe besaßen.

Das Gewicht einer ganzen Versuchspflanze von *Polygonum fagopyrum* ist in den folgenden Tabellen XVII, XVIII und XIX angegeben.

Tabelle XVII enthält die Resultate betreffs des Gewichtes einer ganzen Pflanze in der Trockensubstanz als Durchschnitt von 10 Vegetationsgefäßen.

In Tabelle XVIII ist das Gewicht einer ganzen Pflanze in der Trockensubstanz als Durchschnitt von 20 Vegetationsgefäßen verzeichnet.

Aus Tabelle XIX ist das Gewicht der ganzen Pflanze in der Trockensubstanz als Durchschnitt von 30 Vegetationsgefäßen ersichtlich.

Als Durchschnittsgewicht von 10 Pflanzen wurden bei der I. Gruppe, wo alle Nährstoffe in der Nährlösung vorhanden waren, 13,842 g erzielt.

Bei der II. Gruppe, wo sich in der Nährlösung kein Magnesium befand, betrug das Durchschnittsgewicht von 20 Vegetationsgefäßen, auf 10 Pflanzen berechnet, 4,199 g.

Bei der III. Gruppe, wo in der Nährlösung Phosphor fehlte, belief sich das Durchschnittsgewicht von 30 Vegetationsgefäßen, auf 10 Pflanzen berechnet, auf 0,5533 g.

B. Versuche mit Zea Mais.

Diese Versuche wurden in derselben Weise ausgeführt wie jene mit *Polygonum fagopyrum* und ebenfalls in drei Gruppen arrangiert.

Bei der I. Gruppe, die aus 10 Vegetationsgefäßen bestand, befanden sich in der Nährlösung alle Nährstoffe.

Die II. Gruppe umfaßte 20 Vegetationsgefäße. In der Nährlösung war kein Magnesium zugegen.

Bei der III. Gruppe, 30 Vegetationsgefäße umfassend, war in der Nährlösung kein Phosphor vorhanden.

Diese Versuche wurden am 2.—7. Mai angefangen. Durch die Vegetationsgefäße aller vorerwähnter Gruppen wurde jeden Tag

frische Luft durchgeleitet und nach 20 Tagen die Nährlösung immer erneuert. Die Vegetationszeit dauerte bei den Vegetationsgefäßen der I. und II. Gruppe 125—128 Tage. Die Pflanzen in den Vegetationsgefäßen der III. Gruppe, wo also in der Nährlösung Phosphor nicht anwesend war, sind schon nach 40—65 Vegetationstagen gänzlich zu Grunde gegangen.

Was das Aussehen der Vegetationen anbelangt, so waren die Pflanzen, wo in der Nährlösung alle Nährstoffe zugegen waren, sehr gut entwickelt; jene, wo sich in der Nährlösung kein Magnesium befand, blieben im Vergleiche zu den Normalpflanzen in ihrer Entwicklung zurück. Durch die mikroskopische Untersuchung der Blätter aus der II. Gruppe wurde nachgewiesen, daß das Mesophyll normal entwickelte Palisadenzellen hatte, welche reich an Chlorophyllkörnern waren. Auch der Farbstoff war normal grün. In dem Nährmedium ohne Phosphor waren die Blätter nur kümmerlich entwickelt, in den Palisadenzellen nur äußerst wenige Chlorophyllkörner vorhanden und die grüne Farbe der Blätter ging sehr bald in braune über. Aus dem Habitus der ganzen Pflanze ließ sich auf einen pathologischen Zustand der Pflanze schließen; dies war auch tatsächlich der Fall, denn die Pflanzen starben schon nach 40—65 Vegetationstagen ab.

Das Gewicht einer ganzen Pflanze ist in den folgenden Tabellen XX, XXI, XXII, XXIII, XXIV und XXV angeführt.

Tabelle XX.

Versuche mit *Polygonum fagopyrum*.

Nährlösung mit allen Nährstoffen.

No. des Vegetationsgefäßes	Durchschnittliches Gewicht der ganzen Pflanze in d. Trockensubstanz in g	Abweichung vom Mittel
I	1,384	± 0,000
II	1,216	— 0,168
III	1,408	+ 0,024
IV	1,254	— 0,130
V	1,663	+ 0,279
VI	1,230	— 0,154
VII	1,206	— 0,178
VIII	1,307	— 0,077
IX	1,732	+ 0,348
X	1,442	+ 0,058
Summa:	13,842 g	
Mittel:	1,384 g	

Tabelle XXI.

Versuche mit *Polygonum fagopyrum*. Nährlösung ohne Magnesium.

No. des Vegetationsgefäßes	Durchschnittliches Gewicht (von 2 Vegetationsgefäßen) einer ganzen Pflanze in der Trockensubstanz in g	Abweichung vom Mittel
I—II	0,406	— 0,0139
III—IV	0,417	— 0,0029
V—VI	0,421	+ 0,0011
VII—VIII	0,411	— 0,0089
IX—X	0,416	— 0,0039
XI—XII	0,386	— 0,0339
XIII—XIV	0,457	+ 0,0371
XV—XVI	0,416	— 0,0039
XVII—XVIII	0,503	+ 0,0831
XIX—XX	0,366	— 0,0539
Summa:	4,199 g	
Mittel:	0,4199 g	

Tabelle XXII.

Versuche mit *Polygonum fagopyrum*. Nährlösung ohne Phosphor.

No. des Vegetationsgefäßes	Durchschnittliches Gewicht (von 3 Vegetationsgefäßen) einer ganzen Pflanze in der Trockensubstanz in g	Abweichung vom Mittel
I—II—III	0,0563	+ 0,0010
IV—V—VI	0,0573	+ 0,0020
VII—VIII—IX	0,0586	+ 0,0033
X—XI—XII	0,0433	— 0,0120
XIII—XIV—XV	0,0632	+ 0,0079
XVI—XVII—XVIII	0,0607	+ 0,0054
XIX—XX—XXI	0,0434	— 0,0119
XXII—XXIII—XXIV	0,0538	+ 0,0015
XXV—XXVI—XXVII	0,0661	+ 0,0108
XXVIII—XXIX—XXX	0,0505	— 0,0048
Summa:	0,5533 g	
Mittel:	0,0553 g	

Tabelle XXIII.

Versuche mit *Zea Mais*. Nährlösung mit allen Nährstoffen.

No. des Vegetationsgefäßes	Durchschnittliches Gewicht einer ganzen Pflanze in d. Trockensubstanz in g	Abweichung vom Mittel
I	6,236	+ 0,2409
II	6,034	+ ,00389
III	6,113	+ 0,1179
IV	6,133	+ 0,1379
V	5,534	— 0,4611
VI	6,084	+ 0,0889
VII	6,053	+ 0,0579
VIII	5,651	— 0,3441
IX	6,274	+ 0,2789
X	5,839	— 0,1561
Summa:	59,951 g	
Mittel:	5,9951 g	

Tabelle XXIV.

Versuche mit *Zea Mais*. Nährlösung ohne Magnesium.

No. des Vegetationsgefäßes	Durchschnittliches Gewicht (aus 2 Vegetationsgefäßen) einer ganzen Pflanze in der Trockensubstanz in g	Abweichung vom Mittel
I—II	1,038	— 0,2081
III—IV	1,236	— 0,0101
V—VI	1,007	— 0,2391
VII—VIII	1,239	— 0,0071
IX—X	1,266	+ 0,0199
XI—XII	1,738	+ 0,4919
XIII—XIV	1,284	+ 0,0379
XV—XVI	1,222	— 0,0241
XVII—XVIII	1,408	+ 0,1619
XIX—XX	1,023	— 0,2231
Summa:	12,461 g	
Mittel:	1,2461 g	

Tabelle XXV.

Versuche mit *Zea Mais*. Nährlösung ohne Phosphor.

No. des Vegetationsgefäßes	Durchschnittliches Gewicht (aus 3 Vegetationsgefäßen) einer ganzen Pflanze in der Trockensubstanz in g	Abweichung vom Mittel
I—II—III	0,138	+ 0,0041
IV—V—VI	0,147	+ 0,0131
VII—VIII—IX	0,111	— 0,0229
X—XI—XII	0,125	— 0,0089
XIII—XIV—XV	0,163	+ 0,0291
XVI—XVII—XVIII	0,118	— 0,0159
XIX—XX—XXI	0,129	— 0,0049
XXII—XXIII—XXIV	0,143	+ 0,0091
XXV—XXIV—XXVII	0,159	+ 0,0251
XXVIII—XXIX—XXX	0,106	— 0,0279
Summa:	1,339 g	
Mittel:	0,1339 g	

Wir lassen hier noch 2 Tabellen folgen (siehe Tabelle XXVI und XXVII), wo die Fehlerwahrscheinlichkeitsrechnung vorgenommen wurde. Aus dem wahrscheinlichen Fehler, beziehungsweise aus der wahrscheinlichen Schwankung läßt sich folgern, inwieweit die Resultate richtig sind. Für die Beurteilung der Größe dieser Abweichungen und des Wertes des Mittels gibt der wahrscheinliche Fehler einen Anhaltspunkt.

Tabelle XXVI.

Fehlerwahrscheinlichkeitsrechnung bei den Versuchen mit
Polygonum fagopyrum

Art der Nährlösung	Mittlerer Ertrag	Wahrscheinlicher Fehler
Vegetationsgefäße mit allen Nährstoffen	1.384	$\pm 0,0395$
Vegetationsgefäße ohne Magnesium	0,4199	$\pm 0,0080$
Vegetationsgefäße ohne Phosphor	0,0553	$\pm 0,0016$

Tabelle XXVII.

Fehlerwahrscheinlichkeitsrechnung bei den Versuchen mit *Zea Mais*.

Art der Nährlösung	Mittlerer Ertrag	Wahrscheinlicher Fehler
Vegetationsgefäße mit allen Nährstoffen	5.9951	$\pm 0,05206$
Vegetationsgefäße ohne Magnesium	1,2461	$\pm 0,046097$
Vegetationsgefäße ohne Phosphor	0.1339	$\pm 0,0042$

Wie aus den vorstehenden Daten ersichtlich ist, beträgt bei der I. Gruppe, also dort, wo im Nährmedium alle Nährstoffe vorhanden waren, das Gewicht einer ganzen Pflanze in der Trockensubstanz als Durchschnitt von 10 Vegetationsgefäßen 59,95 g.

Bei der II. Gruppe, wo in der Nährlösung kein Magnesium zugegen war, bezifferte sich das Durchschnittsgewicht von 20 Vegetationsgefäßen, auf 10 Pflanzen berechnet, auf 12,461 g.

Als bei der III. Gruppe in der Nährlösung Phosphor fehlte, belief sich das Durchschnittsgewicht von 30 Vegetationsgefäßen, auf 10 Pflanzen berechnet, auf 1,339 g. Aus den mit *Polygonum fagopyrum* und *Zea Mais* angestellten Versuchen geht hervor, daß sich die Pflanzen in der Nährlösung, woselbst alle Nährstoffe vertreten waren, sehr gut entwickelten, jene, wo sich in der Nährlösung kein Magnesium befand, im Vergleiche zu ersteren in ihrer Entwicklung entschieden zurückblieben und diejenigen, wo in der Nährlösung Phosphor fehlte, sich nur ganz kümmerlich entwickelten und schon nach kurzer Vegetation zu Grunde gingen. In den angeschlossenen Photographien (siehe Tafel VI—XII) sind die wesentlichen Unterschiede in der Entwicklung der Pflanzen aus den einzelnen Gruppen veranschaulicht.

Nun schreiten wir zur

Bilanz.

I. *Polygonum fagopyrum*.

Das Gewicht von 10 geschälten Samen von *Polygonum fagopyrum* in der Trockensubstanz betrug 0,184 g. In der Trockensubstanz dieses Samens befanden sich

P_2O_5	1,37 ‰
MgO	0,39 ‰

in Gramm ausgedrückt:

P_2O_5	0,0025 g
MgO	0,00071 g

I. Gruppe: Nährlösung mit allen Nährstoffen:

Das durchschnittliche Gewicht der aus 10 Vegetationsgefäßen geernteten Pflanzenmasse belief sich auf 13,842 g.

Die Trockensubstanz der Pflanzenmasse wies auf:

P_2O_5	0,496 ‰
MgO	0,106 ‰

folglich befanden sich in der aus 10 Vegetationsgefäßen geernteten Pflanzenmasse:

P_2O_5	0,0686 g
MgO	0,0146 g

Subtrahiert man nun die in dem geschälten Samen vorhandene Menge an P_2O_5 und MgO von den in der Pflanzenmasse gefundenen Phosphorsäure- und Magnesiumoxyd-Quantitäten, so erfährt man, wieviel Phosphorsäure und Magnesiumoxyd von dem Wurzelsystem der Pflanzen aus der Nährlösung assimiliert wurden. In unserem Falle wurden pro 10 Pflanzen

P_2O_5	0,0661 g
MgO	0,0139 g

aus der Nährlösung assimiliert.

Nun kommen wir zur II. Gruppe, woselbst in der Nährlösung Magnesiumoxyd fehlte. Hier betrug das durchschnittliche Gewicht der Pflanzenmasse von 10 Pflanzen 4,199 gr.

In der Trockensubstanz dieser Pflanzenmasse waren enthalten:

P_2O_5	0,591 ‰
MgO	0,029 ‰

Demgemäß befanden sich in der geernteten Pflanzenmasse im Gewichte von 4,199 g

P_2O_5	0,0248 g
MgO	0,0012 g

Ziehen wir nun die in dem geschälten Samen vorhandene Phosphorsäure- und Magnesiumoxydmenge von jener, die in der Pflanzenmasse ermittelt wurde, ab, so finden wir, daß pro 10 Pflanzen

P_2O_5	0,0223 g
MgO	0,0005 g

aus der Nährlösung assimiliert wurden. Diese geringe Menge von MgO, welche als Plus in der Pflanzenmasse gefunden wurde, findet darin ihre Erklärung, daß das Wurzelsystem der Pflanzen infolge seiner eklektiven Eigenschaften die nicht nachweisbaren Spuren von MgO in destilliertem Wasser und wahrscheinlich auch in den Nährsalzen assimiliert hat.

Bei der III. Gruppe, woselbst sich in der Nährlösung kein Phosphor befand, betrug das durchschnittliche Gewicht der Pflanzenmasse von 10 Pflanzen 0,5533 g.

In der Trockensubstanz dieser Pflanzenmasse waren enthalten:

P ₂ O ₅	0,473 ‰
MgO	0,15 ‰

Die geerntete Pflanzenmasse im Gewichte von 0,5533 g wies also auf:

P ₂ O ₅	0,0026 g
MgO	0,00082 g

Nach Abzug der in den geschälten Samen vorhandenen Phosphorsäure- und Magnesiumoxydmenge von der in der Pflanzenmasse gefundenen ergibt sich, daß von dem Wurzelsystem pro 10 Pflanzen

P ₂ O ₅	0,0001 g
MgO	0,0001 g

aus der Nährlösung assimiliert wurden.

Nun kommen wir auch bei den Versuchen mit *Zea Mais* zur Bilanz.

In der Trockensubstanz dieses geschälten Samens waren durchschnittlich enthalten:

P ₂ O ₅	1,38 ‰
MgO	0,48 ‰

Das Gewicht von 10 geschälten Samen von *Zea Mais* in der Trockensubstanz beträgt 0,654 g.

In der Trockensubstanz dieses Samens sind

P ₂ O ₅	0,009 g
MgO	0,003 g

vorhanden.

I. Gruppe, wo alle Nährstoffe in der Nährlösung zugegen sind.

Das durchschnittliche Gewicht von 10 ganzen Pflanzen beträgt 59,951 g.

In der geernteten Pflanzenmasse befinden sich:

P ₂ O ₅	1,16 ‰
MgO	0,44 ‰

Infolgedessen sind in der von 10 Pflanzen geernteten Pflanzenmasse enthalten:

P ₂ O ₅	0,6954 g
MgO	0,2637 g

Zieht man jetzt die in dem geschälten Samen gefundene P_2O_5 - und MgO -Menge von der in der Pflanzenmasse gefundenen ab, so ergeben sich die von dem Wurzelsystem pro 10 Pflanzen aus der Nährlösung assimilierten P_2O_5 - und MgO -Mengen. Hier betragen diese:

P_2O_5	0,6864 g
MgO	0,2607 g

II. Gruppe: Nährlösung ohne Magnesium.

Das durchschnittliche Gewicht von 10 ganzen Pflanzen in der Trockensubstanz betrug 12,46 g.

In der geernteten Pflanzenmasse waren enthalten:

P_2O_5	1,18 ‰
MgO	0,035 ‰

Infolgedessen befanden sich in der Pflanzenmasse:

P_2O_5	0,147 g
MgO	0,0043 g

Nach Abzug der in dem geschälten Samen vorhandenen Quantitäten an P_2O_5 und MgO von den in der Pflanzenmasse ermittelten finden wir, daß von dem Wurzelsystem pro 10 Pflanzen aus der Nährlösung

P_2O_5	0,138 g
MgO	0,0013 g

assimiliert wurden.

Es wurden also immerhin noch aus der reinen Nährlösung vom Wurzelsystem der Pflanzen 0,0013 g MgO aufgenommen.

III. Gruppe: Nährlösung ohne Phosphor:

Das durchschnittliche Gewicht von 10 ganzen Pflanzen beläuft sich auf 1,339 g.

In der Trockensubstanz dieser Pflanzenmasse befinden sich:

P_2O_5	1,02 ‰
MgO	0,59 ‰

Demgemäß waren in der Trockensubstanz der Pflanzenmasse enthalten:

P_2O_5	0,0136 g
MgO	0,0079 g

Subtrahieren wir die in dem Samen vorhandenen P_2O_5 - und MgO -Quantitäten von den in der Pflanzenmasse gefundenen, so finden wir, daß von dem Wurzelsystem der Pflanzen aus der Nährlösung aufgenommen wurden:

P_2O_5	0,0046 g
MgO	0,0049 g

Hier ergibt sich also an assimilierter Phosphorsäure ein Plus von 0,0046 g, welcher wieder nur durch die eklektive Eigenschaft

des Wurzelsystems der Pflanzen aufgenommen wurde, und nichts anderes als nichtnachweisbare Spuren an Phosphorsäure im destillierten Wasser und in den Nährsalzen ist. Natürlich ist diese Zahl so klein, daß sie schon in der Grenze eines Versuchsfehlers liegt.

Wir gelangten bei unseren diesbezüglichen Vegetationsversuchen, die uns ganz gut gelungen sind, zu folgenden Schlüssen:

I. Unsere Versuche dokumentieren, daß sich die Pflanzen in dem Nährmedium ohne Phosphor nicht entwickeln können. Wenn also der Vegetationsfaktor Phosphor im Minimum vorhanden ist, so sinkt der Pflanzenertrag ganz bedeutend. Es könnte da freilich der Einwand gemacht werden, daß dies ebensogut der Fall sein kann, wenn sich beispielsweise Kalium oder Calcium im Minimum befindet. Wie wir uns aber bei unseren Untersuchungen überzeugten, befand sich bei Abwesenheit von Kalium oder Calcium im Nährmedium die Vegetation von *Zea Mais* und *Polygonum fagopyrum* niemals in solch kümmerlichem Zustande wie ohne Phosphor in der Nährlösung. Auch unsere sorgfältig ausgeführten Wasserkulturversuche ergaben, daß nur bei Abwesenheit von Phosphor und Stickstoff die Vegetation bald zu Grunde geht.

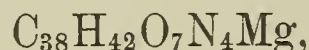
Die Pflanzen vegetieren eben nur so lange, bis der Phosphor, welcher im Embryo und Endosperm der Samen vorhanden ist, verbraucht ist; dieser Phosphorgehalt der absterbenden Pflanzenorgane zirkuliert dann wieder in neu gebildete Organe, namentlich in die Chlorophyllpräparate, und dieser Prozeß wiederholt sich so lange, bis die Mechanik des Stoffaustausches versagt. In unseren beiden Fällen schien eine Mehraufnahme von Phosphor in Form von Phosphat-Ion stattgefunden zu haben. Im ersten Falle *Polygonum fagopyrum* war ein Plus an P_2O_5 von 0,0001 g, bei *Zea Mais* ein solcher von 0,0046 g zu verzeichnen. Diese ganz geringen Phosphorsäure-Quantitäten können selbstredend gar nicht in Betracht gezogen werden. Die Palisadenzellen waren hier arm an Chlorophyllkörnern, durch welche Beobachtung man den Eindruck gewinnen konnte, daß sich ohne Phosphor die Chlorophyllkörner überhaupt nicht entwickeln können. Magnesium vermag den Phosphor nicht zu ersetzen.

II. Ganz andere Verhältnisse herrschen bei der Vegetation, wo sich in der Nährlösung kein Magnesium befand. Die Pflanzen blieben allerdings gegenüber den Normalpflanzen in ihrer Entwicklung zurück, jedoch waren ihre Blätter ziemlich gut entwickelt und sehr schön grün gefärbt. Auch die Palisadenzellen waren reich an Chlorophyllkörnern. Überhaupt ließ das Aussehen der Pflanzen darauf schließen, daß sie sich nicht, wie dies bei jenen in der Nährlösung ohne Phosphor der Fall war, in einem pathologischen Zustande befinden.

III. Aus unseren Befunden läßt sich folgern, daß der Phosphor einen Anteil an dem Aufbau des Chlorophylls in der Pflanzenzelle hat. Züchten wir also die Pflanzen in einem phosphorfreien Nährmedium, so können sich die Blätter nicht entwickeln und die photosynthetische Assimilation des Kohlendioxyds, sowie die Bildung der Zellbausteine nicht vor sich gehen. Aus diesem Grunde ist dann auch die weitere Entwicklung der Pflanzen unmöglich. In

Anbetracht dessen können wir mit Recht behaupten, daß sich die Chlorophyllorgane ohne Phosphor nicht bilden können.

Es könnte da freilich eingewendet werden, daß sich die Pflanzen ohne Phosphor im Nährmedium deshalb so mangelhaft entwickeln, weil bekanntlich der Phosphor ein Bestandteil der formativen und plastischen Stickstoffverbindungen, wie Eiweißstoffe und Nucleine ist, welch' erstere die Grundlage des Protoplasma bilden, und welch' letztere hauptsächlich in den Zellkörnern vorkommen. Aber dieser Einwand wäre durchaus nicht stichhaltig. Willstätter behauptet in seiner Arbeit, daß nicht Phosphor sondern Magnesium im Chlorophyll vertreten ist und gibt dem kristallisierten Chlorophyll die Formel



in welchem 3,53% Magnesium enthalten sind.

Berechnen wir nun jetzt, wieviel Magnesium zur Bildung des Chlorophylls in den Blättern von *Zea Mais* (die ein bestimmtes Gewicht aufweisen) in unserem Falle gebraucht wird. Wir haben noch eine Reihe von Versuchen mit *Zea Mais* in einer Nährlösung ohne Magnesium angestellt, um genügend Material von Blättern zu erhalten. Unsere diesbezüglichen Versuche wurden in 48 Vegetationsgefäßen ausgeführt und die Resultate sind auf 100 Pflanzen berechnet. Das Gewicht von 100 ganzen Pflanzen, auf Trockensubstanz berechnet, betrug 137,9 g.

In der Nährlösung von Magnesium haben sich bei 100 Pflanzen von *Zea Mais* 75,6 g Blatt-Trockensubstanz gebildet.

Wir können annehmen, daß in der Blatt-Trockensubstanz von *Zea Mais* durchschnittlich 1,4% Chlorophyll vorhanden sind. Folgedessen befinden sich in 75,6 g Blatt-Trockensubstanz 1,058 g Chlorophyll. Nehmen wir nun an, daß das Chlorophyll 3,53% Magnesium enthält, so ist für den Chlorophyllaufbau in der Zelle der Blätter 0,0373 g Magnesium erforderlich. Wir fanden in der reinen Blatt-Trockensubstanz 0,036% Magnesiumoxyd, oder 0,0217% Magnesium.

In der reinen Blatt-Trockensubstanz im Gewichte von 75,6 g sind also 0,0272 g Magnesiumoxyd oder 0,0164 g Magnesium vorhanden.

Nach Willstätters Behauptungen wären 0,0373 g Magnesium für den Aufbau des Chlorophylls erforderlich. Wir fanden aber bloß 0,0164 g.

Wenn das Gewicht der Blatt-Trockensubstanz 75,6 g beträgt, so muß die ganze Menge von Magnesium, die sich auf 0,0164 g beläuft, nicht ausschließlicly im Chlorophyll vorhanden sein, vielmehr verteilt sich dieselbe auch auf andere Zellbausteine.

Es sei noch erwähnt, daß *Zea Mais* eine Pflanze ist, welche nicht nur für die Entwicklung der Blätter, sondern auch der anderen Organe verhältnismäßig viel Magnesium braucht.

Willstätter sagt in seinen Arbeiten „Über das Leben der Pflanze“ folgendes:¹⁾

„Das Leben der chlorophyllhaltigen Pflanzen ist vorwiegend synthetisierend. Während die Biologie bisher auf eine Erklärung der chemischen Funktion des Chlorophylls verzichtete, erlaubt nun der Nachweis des Magnesiums im Chlorophyll aller Pflanzenklassen wohl die Folgerung, daß die Assimilation der Kohlensäure eine Reaktion des basischen Metalles Magnesium ist; das seine große Verbindungsfähigkeit bekanntlich auch in komplexen organischen Molekülen aufweist. Die Kohlensäureaufnahme ist wahrscheinlich ein Prozeß wie die Grignard'schen Synthesen.“

Wenn die Hypothese von Willstätter richtig sein soll, wie könnten sich in einem Nährmedium ohne Magnesium bei 100 Pflanzen 137,9 g Pflanzenmaterie (in der Trockensubstanz) bilden? Wir haben in der Trockensubstanz der ganzen Pflanze 45,7% Kohlenstoff gefunden, also würden sich in 137,9 g Pflanzenmaterie 63,02 g Kohlenstoff befinden, welche zur Synthese der Zellbausteine der Pflanzen dienen. Die gefundenen Kohlenstoffquantitäten repräsentieren aber nicht die Gesamtmenge des Kohlenstoffs, welcher in Form von Kohlendioxyd aus der Luft assimiliert wurde. Die Pflanze benötigt für ihren Atmungsprozeß während der ganzen Vegetationsperiode große Mengen abbaufähiger Kohlenhydrate. Nimmt man nun an, daß in unserem Falle ca. 32 g Kohlenstoff in Form von Kohlensäure ausgeatmet werden, so beträgt die von 100 Pflanzen assimilierte Gesamtmenge des Kohlenstoffs in Form von Kohlendioxyd während der ganzen Vegetation 95,02 g. Wir sehen also, was für eine große assimilatorische Kraft das Chlorophyll, selbst wenn sich Magnesium im Minimum und andere Vegetationsfaktoren im Optimum vorfinden, besitzt.

Zu Willstätters Hypothese ist noch zu bemerken, daß es nicht notwendig ist, die Wirkungsweise des Chlorophylls nur durch die Grignardsche Synthese zu erklären, es genügt und entspricht auch den tatsächlichen Verhältnissen in der chlorophyllhaltigen Zelle, daß es sich hier um eine Sauerstoffübertragung handelt. Durch Magnesium, Kalium-, Natrium-Ionen werden diese Prozesse in der gleichen Weise beschleunigt, wie dies bei der Entwicklung der belichteten photographischen Platte durch die genannten Ionen der Fall ist.

Unsere mit größter Sorgfalt ausgeführten Versuche dokumentieren, daß nicht nur Magnesium, sondern auf alle Fälle Phosphor und vielleicht auch Kalium zum Aufbau des Chlorophylls notwendig ist.

Wir lassen hier auch die Abbildungen unserer Wasserkulturversuche mit *Polygonum fagopyrum* und *Zea Mais* folgen.

Versuche mit *Polygonum fagopyrum*.

In Tafel VI, Gruppe I befanden sich in der Nährlösung alle Nährstoffe.

¹⁾ R. Willstätter. Untersuchungen über Chlorophyll. (Annalen der Chemie. Bd. 350.)

In Tafel VII, Gruppe II waren in der Nährlösung alle Nährstoffe mit Ausnahme von Magnesium vertreten.

In Tafel VIII, Gruppe III fehlte in der Nährlösung Phosphor.

Die Pflanzen aus Gruppe I und II wurden nach 60 Vegetationstagen, jene aus Gruppe III nach 40 Vegetationstagen photographiert.

Versuche mit *Zea Mais*.

In Tafel IX sind alle 3 Gruppen veranschaulicht.

Im Vegetationsgefäße aus Gruppe I befanden sich in der Nährlösung alle Nährstoffe.

Im Vegetationsgefäße aus Gruppe II waren in der Nährlösung alle Nährstoffe vertreten, nur Magnesium fehlte.

Im Vegetationsgefäße aus Gruppe III waren in der Nährlösung alle Nährstoffe bis auf Phosphor vorhanden.

Die photographische Aufnahme von den Pflanzen aus der I. und II. Gruppe wurde nach 105 Vegetationstagen, aus der III. Gruppe nach 45 Vegetationstagen vorgenommen.

Nicht uninteressant sind auch die Abbildungen von *Zea Mais* aus der I. und II. Gruppe nach 65tägiger Entwicklung in Tafel X und XI. Man ersieht daraus, daß die Unterschiede in der Entwicklung der Pflanzen aus der I. und II. Gruppe nicht bedeutend sind. Erst später entwickelten sich die Pflanzen aus der I. Gruppe, wo also alle Nährstoffe in der Nährlösung vorhanden waren, stärker und jene aus der II. Gruppe (ohne Magnesium in der Nährlösung) blieben im Vergleiche zu ersteren zurück. Die Wasserkulturen aus der III. Gruppe (ohne Phosphor im Nährmedium) (siehe Tafel XII) waren gleich vom Anfange an eine nur kümmerliche Vegetation. Die photographische Aufnahme von diesen Pflanzen erfolgte nach 45 Vegetationstagen.

Resumé.

1. Der Phosphor dient nicht nur zur Bildung des Cytoplasmas und Karyoplasmas, sondern auch zum Aufbau des Chlorophylls in der chlorophyllhaltigen Zelle. Bei dem Aufbau des Chlorophylls in der Pflanzenzelle ist dem Phosphor eine hochwichtige Rolle zugewiesen.

2. Das Chlorophyll besteht aus drei verschiedenen Arten von Verbindungen:

a) Dem Phäophorbin und dessen Metallverbindungen, die von Willstätter und seinen Mitarbeitern festgestellt wurden. Dieselben sind in Alkohol und Äther, nicht in Petroläther löslich.

b) Dem Phäophytin und den Phäophytiden, die in Äther fast unlöslich, in Alkohol und Petroläther löslich sind.

c) Die Chlorolecithinen oder Phäophorbinphosphatide, das sind Verbindungen von Phäophorbin oder Phäophytin

mit Phosphoglyceriden, wie Hoppe-Seyler, Gautier und Stoklasa angenommen haben. Dieselben sind ebenso wie deren Metallverbindungen in allen drei Lösungsmitteln löslich. Vielleicht kommen auch Phäophytin-Glyceridester, ohne Phosphorsäuregehalt, Chlorophyllane vor.

3. Die Phosphorsäure ist an Glyceridreste von ungesättigten Säuren oder Oxysäuren gebunden. Im Frühjahr und Sommer bilden sich die ungesättigten Säuren, daneben verläuft eine Oxydation zu Oxysäuren, die auch am Präparate, sowie an den aus demselben gewonnenen Säuren weiter fortschreitet.

Dabei spielt wahrscheinlich das Phäophorbin die Rolle eines Katalysators und zwar im Sonnenlichte eines im Sinne der Reduktion, im Dunkeln im Sinne einer Oxydation.

4. Die Metallverbindungen enthalten vorwiegend Magnesium, doch ist auch Calcium und Kalium zugegen. Das Magnesium muß man als treuen Begleiter des Phosphors bei dem Bau und Betriebsstoffwechsel der Pflanzen ansehen.¹⁾

5. Es wurde eine Methode ausgearbeitet, welche die annähernde Bestimmung von Phäophorbin neben Phytol ermöglicht und eine teilweise Isolation der Säuren zuläßt.

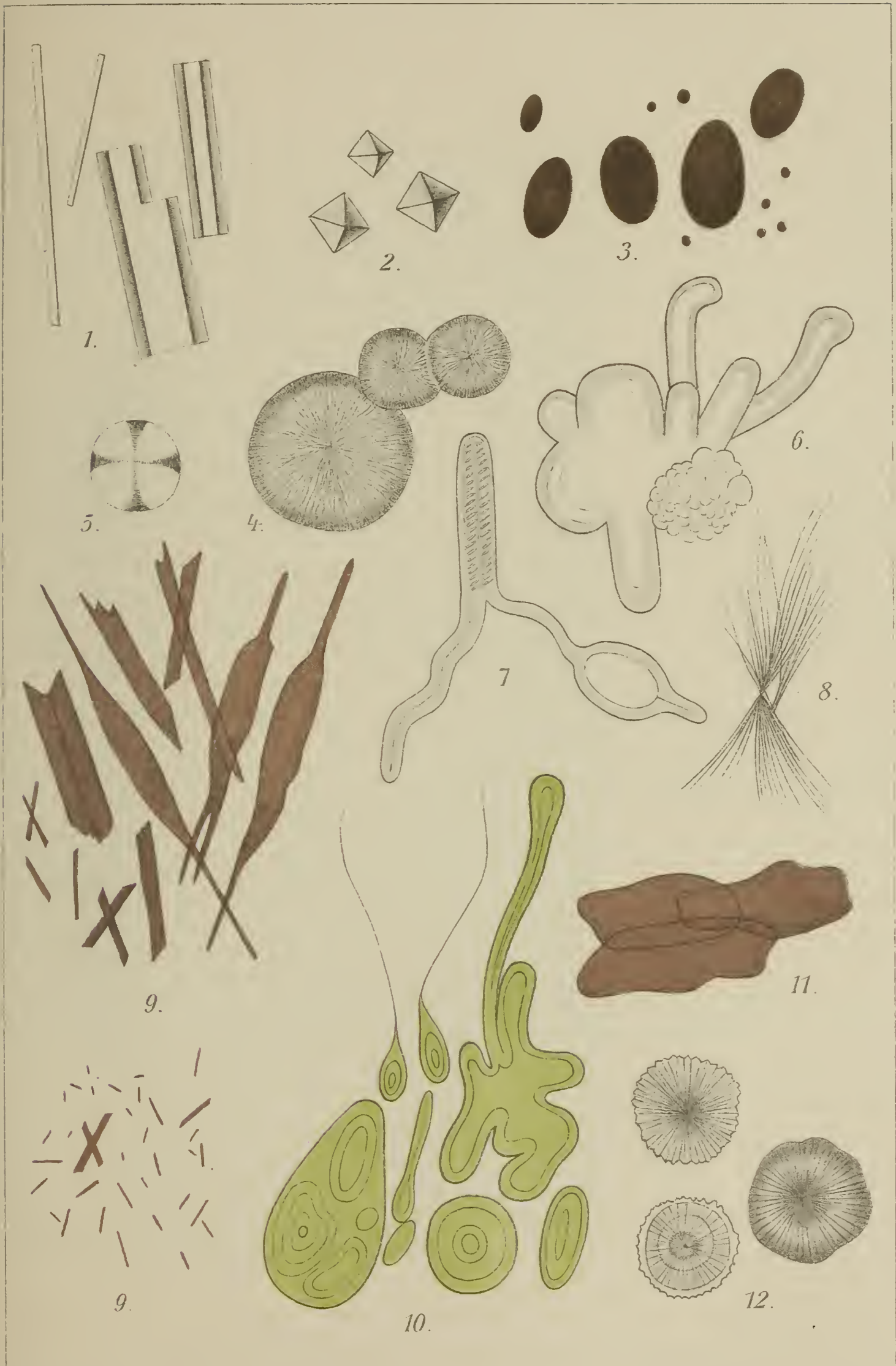
6. Die Farbenänderung des Blattes im Herbst ist auf hydrolytische Spaltung des Chlorophylls und Entstehung von Phäophytin und Phosphatiden zurückzuführen; diese Stoffe, selbst bräunlich gefärbt, lassen die gelbe und rote Farbe des Xantophylls und der Carotene zur Geltung kommen. Diese Frage werden wir noch weiter studieren.

7. Die farblosen Lecithine, Cholinderivate sind nicht mit dem Chlorophyll in Bindung, sondern kommen nur zugemischt vor. Vielleicht stehen dieselben in genetischem Zusammenhange mit den Chlorolecithinen.

Unsere Untersuchungen bezüglich des chemischen Charakters des Chlorophylls setzen wir weiter fort, wobei es sich uns hauptsächlich darum handelt, größere Quantitäten von kristallisiertem Chlorophyll von verschiedenartigen Pflanzen zu Vergleichszwecken zu gewinnen.

¹⁾ Nach den Untersuchungen von Luigi Bernardini und Giuseppe Morelli. O. Loew, L. Bernardini u. G. Corso, L. Bernardini u. A. Sincalchi. Plato u. J. Tribot (siehe Atti, R., Accad. dei Lincei 1912; Comp. rend. d. l'Acad. des Sciences, Tome 148; Staz. sperim. agrar. ital. Bd. 41, 42 u. 43; Landw. Jahrbücher 1902; Landw. Versuchsst. 1892) ist anzunehmen, daß das Magnesium im Pflanzenorganismus dazu bestimmt ist, die Phosphorsäure in die Nucleoproteide des Zellkerns, sowie in die Chlorophyllorgane einzuführen, weil die Phosphorsäure am leichtesten aus Magnesiumphosphat abspaltbar ist.

26 AUG. 1913







Nernstlampe.

Petroleumäther.

Chlorophylllösung.

*Absorptionsspektrum der Hg-
Strahlen.*

*Spektrum der Quecksilberquarz-
lampe.*

Kalium und Natriumspektrum.

Äther.

Chlorophyll aus Galeopsis.

„ *(verdünnt).*

Äther.

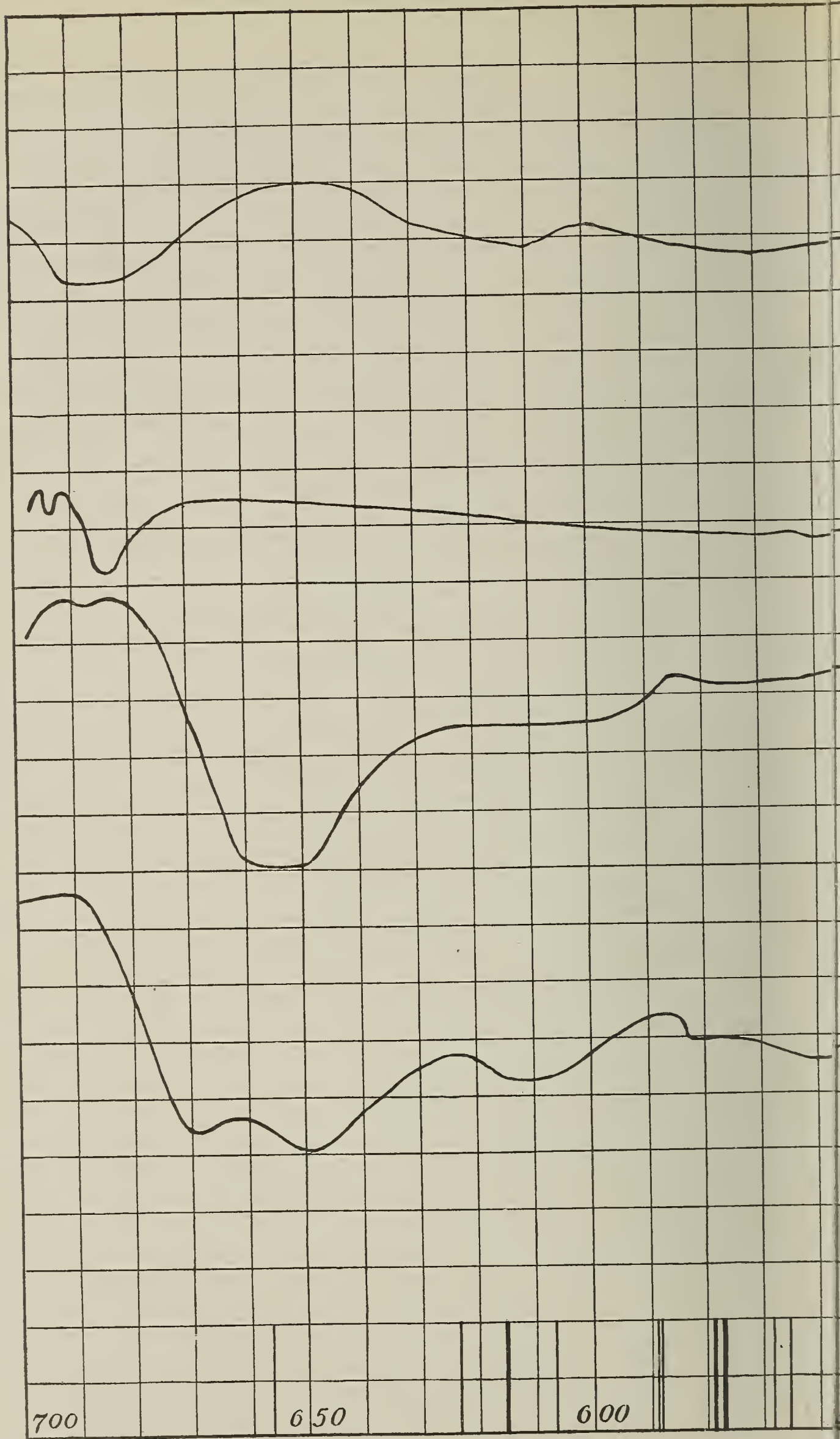
Chlorophyll aus Ahorn.

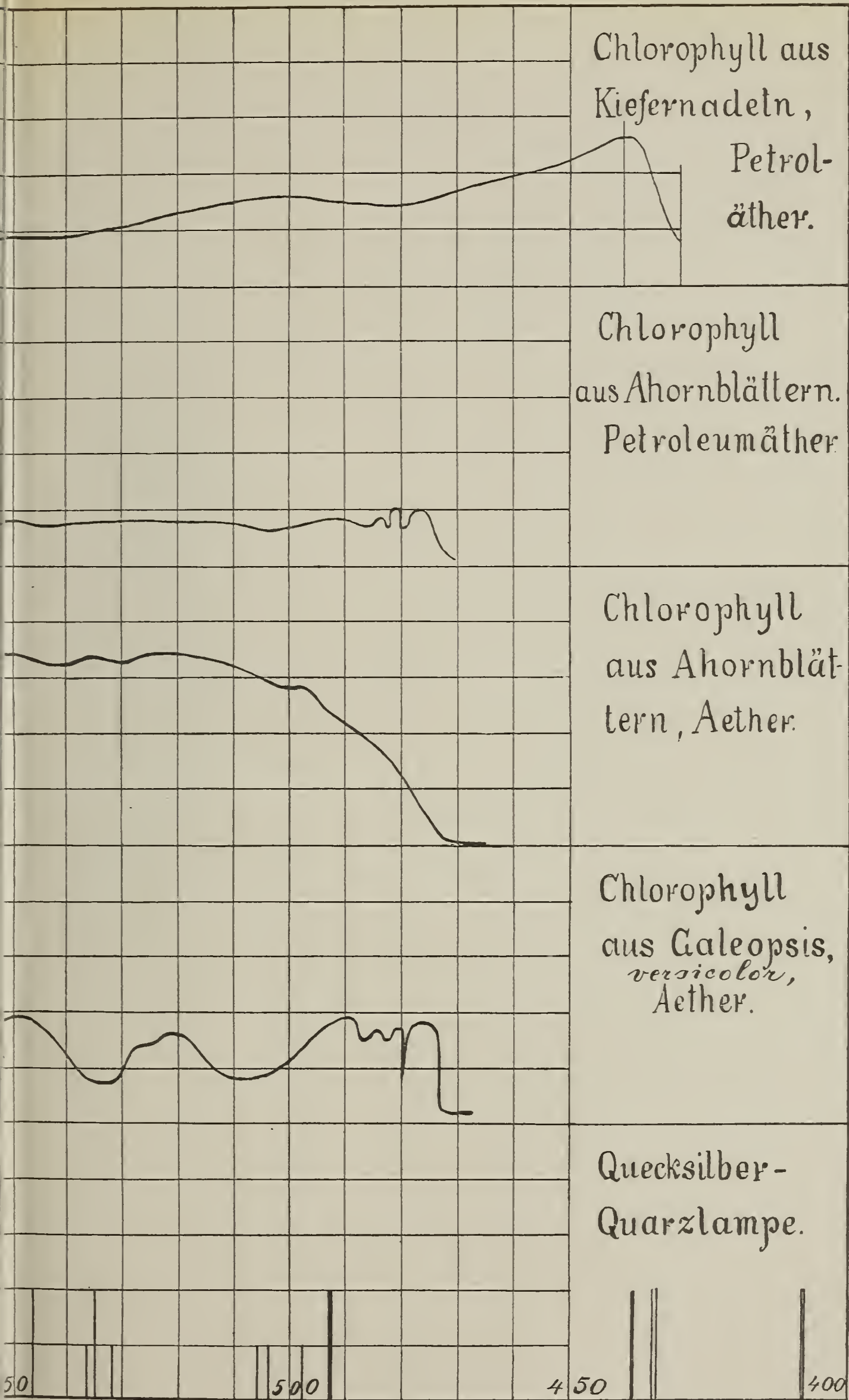
„ *Absorption der Hg-
Strahlen.*

Phytol.









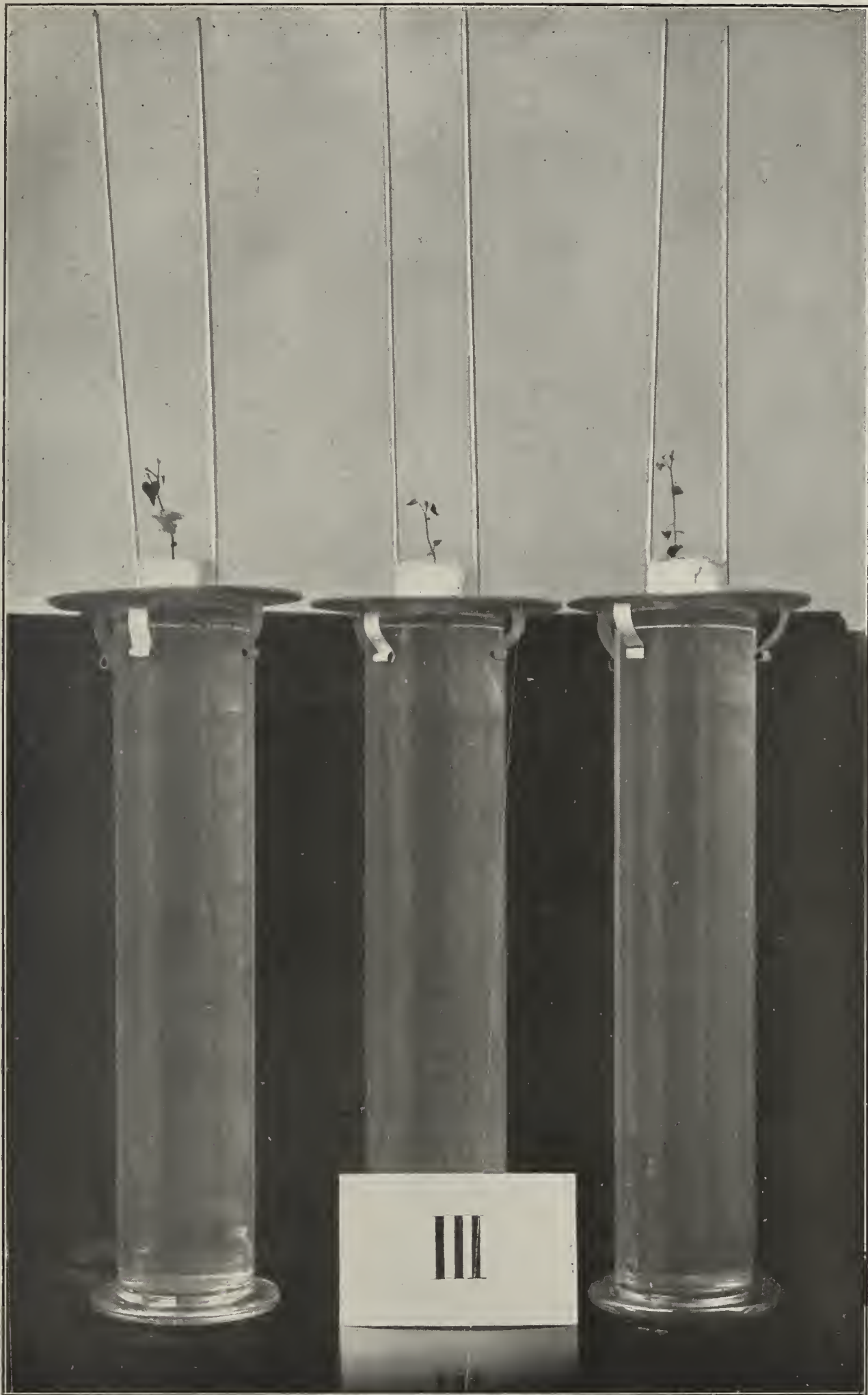
















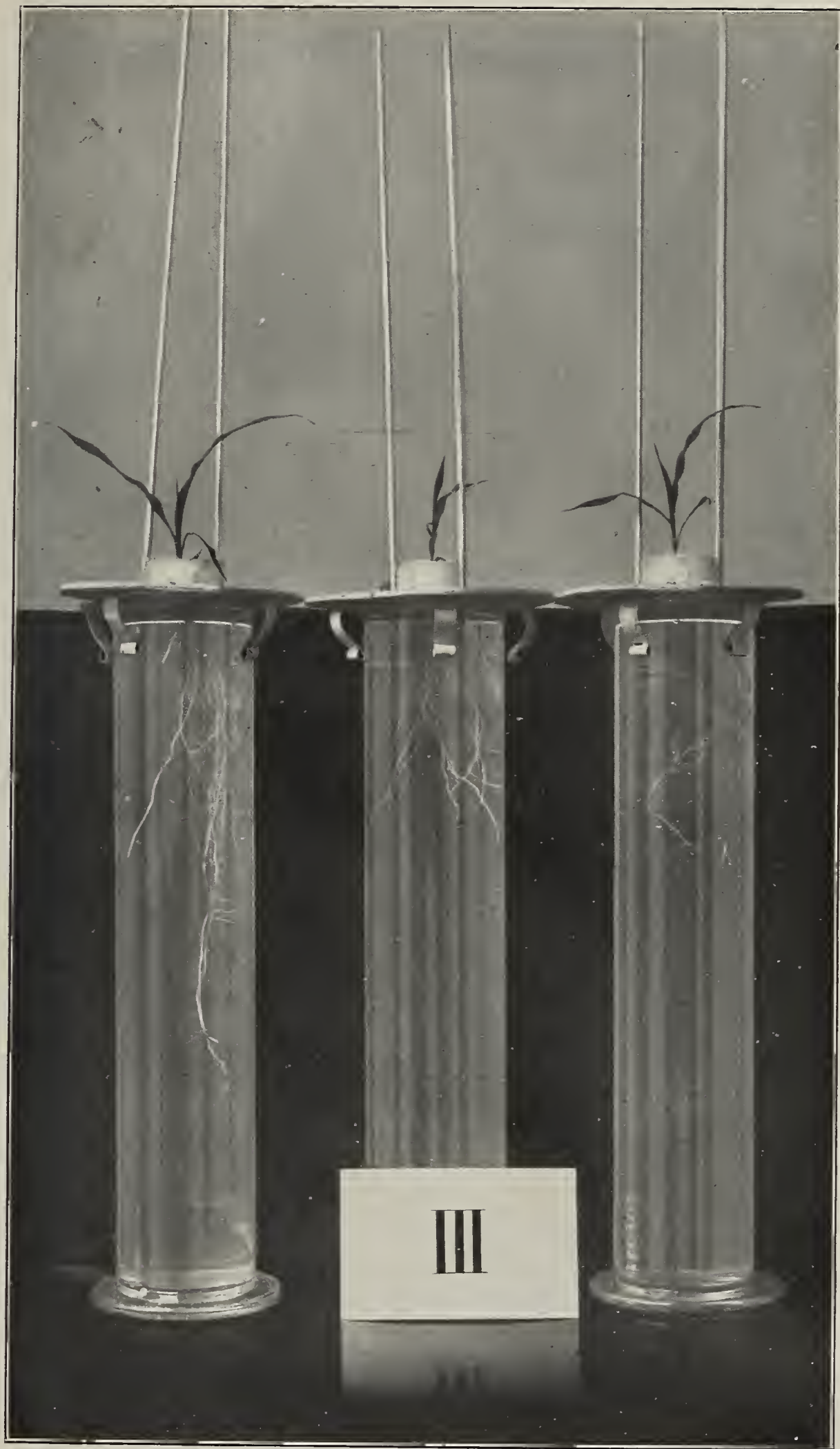












ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Botanisches Centralblatt](#)

Jahr/Year: 1913

Band/Volume: [BH_30_1](#)

Autor(en)/Author(s): Stoklasa Julius, Senft Emanuel, Sebor Johann

Artikel/Article: [Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung des Chlorophylls.
167-235](#)