



Am grünen Ursprung des Lebens

Chlorophyll

ANNE KLAPROTH | MARIA NAJDANOVA | MIRJANA MINCEVA |
DIETER SICKER | HANS-ULLRICH SIEHL | KLAUS-PETER ZELLER |
STEFAN BERGER*

Abb. 2 Sauerklee (Gattung *Oxalis* L.) ist kein Verwandter des glückbringenden vierblättrigen Klees (Gattung *Trifolium* L.).

Dieser Beitrag setzt die Reihe zur Isolierung und Spektroskopie von Naturstoffen fort und entspringt einer Vertiefungsarbeit. Er ergänzt die Kapitel des Buchs „Classics in Spectroscopy“ von S. Berger und D. Sicker (Wiley-VCH 2009).

Chlorophyll ist ein Volltreffer der Evolution. Seit Milliarden Jahren verschafft dieser grüne Magnesium-Porphyrin-Komplex allen Lebewesen, welche die Kohlenhydrate-erzeugende Photosynthese betreiben, die dazu nötige Energie aus Licht. Faszinierend ist die strukturelle Verwandtschaft zu Häm, dem eisenhaltigen, sauerstoffbindenden tierischen Blutfarbstoff. Chlorophyll, das „Blattgrün“, bot Anlass zur Vergabe von drei Nobelpreisen. Den chiralen Hauptfarbstoff Chlorophyll a aus Spinat rein zu isolieren und zu analysieren ist auch heute eine Herausforderung. Warum, das beschreiben wir ausführlich in diesem Beitrag. Er setzt die Reihe zur Isolierung und Spektroskopie von Naturstoffen fort und entspringt mehreren studentischen Arbeiten.

Ach du Grüne Neune: Grünes, wohin man schaut!

Die Redaktion hat uns *Grünes Licht* gegeben für einen Beitrag über Chlorophyll, das *Blattgrün*. Keiner der bisher von uns beschriebenen Naturstoffe ist von derart fundamentaler Bedeutung. Denn ohne das wahrhaft uralte Chlorophyll, das am Anfang des Lebens stehend, die Photosynthese energetisch möglich machte, gäbe es die anderen alle nicht. Wir hoffen also, da wir nicht mehr *grün hinter den Ohren* sind, dass auch Sie diesem Artikel *grün sein* werden. Dann wäre *alles im grünen Bereich!* Vom Ergrünen der Natur im Frühling gehen wohl die positiven Gefühle aus, die die meisten von uns mit dieser Farbe verbinden, egal ob wir sie nach ihren feinen Nuancen noch näher als *grasgrün*, *lindgrün*, *moosgrün* oder *olivgrün* bezeichnen, lieber als *giftgrün* sind sie uns allemal. Wir denken dabei an Frische, Wachstum, Hoffnung, Zuversicht und natürlich an die Natur.

Aber vielleicht fällt Ihnen auch ein, dass immer am *Gründonnerstag* die Saison der *Frankfurter Grünen Sauce* beginnt! (Rezept am Rande). Oder eines der zitierten Lieder kommt Ihnen in den Sinn. Grün ist wirklich fundamental verankert. Es gilt im Christentum zu Ostern als Far-

CHLOROPHYLL A

(*SP-4-2*)-[(*2E,7R,11R*)-3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecenyl (3*S,4S,21R*)-9-ethenyl-14-ethyl-21-(methoxycarbonyl)-4,8,13,18-tetramethyl-20-oxo-3-phorbinepropanoato(2-)-κN²³,κN²⁴,κN²⁵,κN²⁶]-Magnesium (Koordinationsverbindung)

Synonym: Chlorophyll-1, α-Chlorophyll, Vegetable Chlorophyll, Magnesium Phäophytin a

Aus tiefgefrorenem Blattspinat (*Spinacia oleracea* L.)

C₅₅H₇₂MgN₄O₅ Molmasse 893,51 g/mol

CAS Registry Number: 479-61-8

Blauschwarze, wachsartige Nadeln, Schmp. 117–120 °C (RÖMPP)

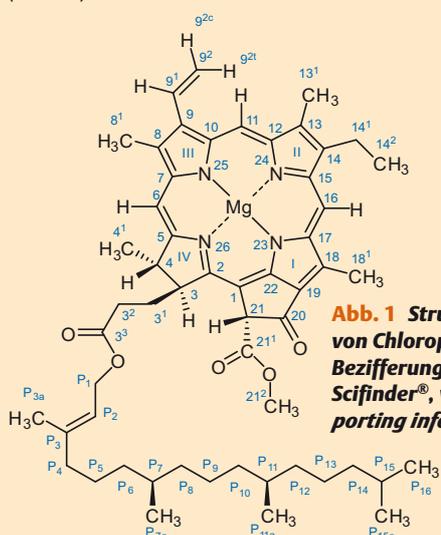


Abb. 1 Strukturformel von Chlorophyll a (Die Bezifferung folgt dem Scifinder®, vgl. die supporting information).

be der Auferstehung. Als Farbe des Islams ist es auf Flaggen wie der von Mauretanien zu finden. Uns allen gibt Grün als Signalfarbe an, dass ein Gerät eingeschaltet ist und wo wir ein Kino verlassen können, wenn uns der Film langweilt. Wir schätzen es als *Grüne Welle*, auch wenn wir nicht zu den *Grünen* gehören. Sicher ist Ihnen inzwischen noch mehr Grünes eingefallen, waren etwa *Grünspecht*, *Grünkohl* oder *Grüner Tee* dabei? Nie ist es so notwendig gewesen wegzulassen wie hier, denn über Chlorophyll gibt es dicke Bücher [1]. Es hat die Naturwissenschaften insgesamt beflügelt, seinen Entdeckern Nobelpreise eingebracht. Uns hat es jahrelang auf Trab gehalten, beim simpel anmutenden Versuch, einfach nur ganz reines Chlorophyll a (Abbildung 1) zu präparieren und zu vermessen. Aber das ist wirklich nichts für *Grünschnäbel*.

Meilensteine aus der Geschichte des Chlorophylls

Zu den Ersten, die Anfang des 19. Jahrhunderts das *Blattgrün* isolierten, gehörten die berühmten französischen Naturstoffchemiker Pelletier und Caventou. Sie führten 1818 den Namen Chlorophyll ein, der ans Griechische angelehnt ist (*chlorós* hellgrün, frisch; *phýllon* Blatt) [2].

Um 1871 befasste sich der russische Botaniker, Physiologe und Darwinist C. Timiriazeff in seiner Dissertation mit der Spektralanalyse des Chlorophylls. Er fand heraus, dass rotes Licht am effektivsten für die Photosynthese ist, da dort das Hauptabsorptionsmaximum des grünen Farbstoffs liegt. Er behauptete deswegen, dass Chlorophyll die Rolle eines optischen und chemischen Photosensibilisators der Photosynthese zukommt. Er prägte den schon damals richtungsweisenden Gedanken, dass die Lichtabsorption durch Chlorophyll dessen physikalisch-chemische Veränderung hervorruft, die weitere Reaktionen der Photosynthese induziert.

Noch heute bekannt ist der russische Botaniker M. Tswett, der die Chromatografie erfand. Sein Trenngegenstand waren die Blattfarbstoffe. Er untersuchte über 100 verschiedene in Säulen gefüllte Adsorbentien wie Calciumcarbonatpulver oder Polysaccharid-Puder daraufhin, ob sie sich als stationäre Phasen für die Trennung eignen, wenn eine Farbstofflösung über sie eluiert wird. Die sich ihm als Erstem offenbarenden grünen und gelben Ringe der unterschiedlichen Blattfarbstoffe führten ihn zum Namen *Chromatografie* („Farbschreibung“) [3a,b]. Das hat einen Hauch von Poesie, der im heutigen Labor verweht ist. Es ist ein hübscher Zufall, dass noch dazu sein Name „Tswett“ auf Russisch „die Farbe“ bedeutet.

1915 erhielt der geniale R. Willstätter den Nobelpreis für Chemie für seine „Untersuchungen der Farbstoffe im Pflan-



Abb. 3 Fichte mit Maitrieb.

zenreich, vor allem des Chlorophylls“. Was mag sich dabei wohl seine Mutter gedacht haben, die ihm als Schüler mit der Bemerkung „Richard, aus Dir wird nix!“ Beine machen wollte. Auch Willstätter wies dem Chlorophyll eine wesentliche Rolle in der Photosynthese zu.

Den nächsten auf Naturfarbstoffe bezogenen Nobelpreis erhielt 1930 Hans Fischer für seine Arbeiten „über den

Frankfurter Grüne Sauce (Grie Soß), eine kalte Kräutersauce

Zutaten für 3 Portionen

1 Päckchen Kräuter dafür (Sauerampfer, Kerbel, Schnittlauch, Petersilie, Pimpernelle, Kresse und Borretsch)

2 hartgekochte Eier

3 EL Weinessig

6 EL Öl

1 TL mittelscharfen Senf

3 EL süße Sahne, Creme fraiche oder Sauerrahm

1 kleine gewürfelte Zwiebel

Salz, Pfeffer, Zucker

7 Kräuter gehören in diese Sauce. Die Kräuter mit einem Küchenmesser klein schneiden und vorher möglichst von den ganz dicken Stängeln befreien. Nicht im Mixer pürieren. Das Eigelb durch ein Sieb streichen, mit den Zwiebelwürfeln, Senf, Salz und Pfeffer, dem Essig und Öl mit etwas Zucker eine Sauce rühren. Die gehackten Kräuter und das klein geschnittene Eiweiß unterrühren. Die süße Sahne oder Creme fraiche usw. nach Geschmack begeben. Dazu Tafelspitz oder anderes mageres Rindfleisch und frische Salzkartoffeln.

Nach: <http://www.chefkoch.de/rezepte/429061133924705/Frankfurter-gruene-Sauce.html> (5.3.2016)



Abb. 4 Brennnesseln, Vorsicht beim Anfassen!

strukturellen Aufbau der Blut- und Pflanzenfarbstoffe und für die Synthese des Hämins“. Fischer, der sich zunächst mit der Konstitution der „Pyrrolfarbstoffe“, zu denen die Gallenfarbstoffe Biliverdin und Bilirubin gehören, befasst hatte, gelang 1938 die Synthese des Blutfarbstoffs Hämin, der der sauerstoffbindende Teil des Hämoglobins ist. Er nahm Willstätters Arbeiten über Chlorophyll wieder auf, erkannte die strukturellen Verwandtschaften und publizierte eine enorme Zahl von Arbeiten dazu. 1940 konnte er die Konstitution von Chlorophyll a und b aufklären [4] und erste Beiträge zur Konfiguration liefern. Die absolute Konfiguration von Chlorophyll a und b (kurz: Chl a und Chl b) wurde endgültig von H. Brockmann jr. 1971 aufgeklärt [5]. Sie wurde gleichermaßen mit klassischen chemischen Abbaubersuchen und modernen spektroskopischen Methoden ermittelt. Chl a und Chl b kommen häufig im Verhältnis von etwa 3:1 vor. Als chlorophyllreich und geeignet zur Isolierung gelten z.B. Brennnesseln oder Spinat. Sie enthalten 185 mg bzw. 95 mg Chl a in 100 g frischen Blättern. Die Isolierung ist anspruchsvoll, wie hier und in der *supporting information* noch geschildert werden wird.

1965 erhielt einer der berühmtesten Naturstoffsynthetiker des letzten Jahrhunderts, R. B. Woodward, schließlich den Nobelpreis für Chemie „für Arbeiten auf dem Gebiet der Naturstoffsynthesen“, unter denen sich die Totalsynthese des Chlorophylls a befand [6], die Fischers Struktur bestätigte.

Struktur und Eigenschaften von Chlorophyll a

Werfen wir als Nächstes einen strukturellen Blick auf das blaugrüne Chlorophyll a, von dem sich das gelbgrüne Chlorophyll b nur dadurch unterscheidet, dass sich an C-13 anstelle der Methyl- eine Aldehydgruppe -CHO befindet (Frage E).

Woraus besteht das Molekül und welche Eigenschaften rufen seine Teile hervor? Chl a ist eine Komplexverbindung des Zentralions Mg^{2+} mit einem vierzähligen 16-gliedrigen, makrocyclischen Liganden. Vier N-Atome lagern insgesamt vier Bindungselektronenpaare in die Orbitale des Mg^{2+} -Ions ein (vgl. Fragen B und C). Der Ligand leitet sich von Porphyrin ab, dessen Chlorin genannte 2,3-Dihydroform er darstellt (Abbildung 6). Im Liganden liegt ein nach der Hückel-Regel aromatisch stabilisierter Makrocyclus vor. Die Hückel-Regel besagt, dass ein planares, cyclisch durchkonjugiertes Molekül mit $[4n+2]$ - π -Elektronen stabiler ist als ein analoges offenkettig konjugiertes System. Berühmt ist das energe-

O Tannenbaum

O Tannenbaum, o Tannenbaum,
wie treu sind deine Blätter!
Du grünst nicht nur zur Sommerzeit,
nein, auch im Winter, wenn es schneit.
O Tannenbaum, o Tannenbaum,
wie treu sind deine Blätter!

Ernst Anschütz (1780-1861)

tisch stark stabilisierte Benzol mit $n = 1$. Bei Chl a ist $n = 4$, d.h. es sind im inneren Perimeter 9 Elektronenpaare in cyclischer Konjugationen, also 18 π -Elektronen, insgesamt sind es sogar 20 π -Elektronen. Der Chlorin-Ligand ist energetisch stabilisiert, vor allem aber absorbieren seine konjugierten π -Elektronen einen Teil des sichtbaren Lichts, weshalb Chlorophyll a blaugrün aussieht (Details dazu beim UV/vis-Spektrum).

Der Ligand hat im Makrocyclus drei Chiralitätszentren an C-3, C-4 und C-21. Die Nomenklatur ist nicht trivial, zumal es mehrere Bezeichnungssysteme gibt. Wir folgen wie immer der Bezeichnung von Scifinder®, der größten Chemie-Datenbank. Die zwei Carbonsäurereste an C-21 und C-3 sind verestert, einer mit Methanol, der andere mit dem chiralen Diterpen-Alkohol *trans*-Phytol, den als erster Willstätter 1909 bei der Hydrolyse von Chlorophyll isolierte. Phytol ist hoch hydrophob. Diese Eigenschaft überträgt sich auf Chlorophyll, das deswegen auch nicht wasserlöslich ist. Das ist biologisch sinnvoll, um den Farbstoff im Blatt zu belassen. Daher kocht z.B. grünes Gemüse nicht grün ab. Es ist unmöglich, mit Chlorophyll in wässriger Lösung etwas grün zu färben. Das Ansinnen eines TV-Senders an einen der Autoren, vor Ostern „mal kurz vorbeizukommen, damit Sie uns vor der Kamera Ostereier mit Chlorophyll grün färben!“ kann daher nur als ebenso nette wie naive Idee gelten.

Aber es löst sich gut in Ethanol, Aceton oder Ether. Reine Chlorophylle sind wachsartig - eine makroskopisch erlebbare Konsequenz der Phytol-ester-Struktur. Wer einmal auf einer Wiese hingefallen ist, weiß, dass sich schmierige grüne Grasflecke nicht mit Wasser auswaschen lassen.

An C-21 besitzt Chl a ein CH-acides Zentrum, an dem es nach Keto-Enol-Tautomerie bei Re-Isomerisierung der Enolform nicht nur zur Rückbildung von Chlorophyll a sondern auch zur Bildung des epimeren Chlorophyll a' kommen kann, das an C-21 die (S)-Konfiguration aufweist [7] (Abbildung 7).

Chl a und Chl b sind reaktionsfähig und empfindlich gegenüber Säuren, Basen sowie oxidierenden und reduzierenden Stoffen [8]. So wird durch Säuren das Magnesium herausgelöst. Dabei wechselt die Farbe des metallfreien Liganden bei Chl a von blaugrün nach olivgrün und bei Chl b von gelbgrün nach bordeauxrot (!). Unter basischen Bedingungen wird der die Methylesterfunktion tragende Cyclopentenonring geöffnet. Dieser fünfte Ring bildet einen markanten Unterschied zum Häm-Liganden im Blutfarbstoff. Durch Verseifung werden aus den Estern Methanol und Phytol abgespalten. Im Unterschied zum achiralen Blutfarbstoffliganden Häm ist der Ligand von Chl a und Chl b optisch aktiv, so dass auch ein CD-Spektrum messbar ist (s. dort).

Das Porphyrin-Ringsystem – ein früher Volltreffer der Evolution

Der Gedanke, dass „die Natur“ bereits in der Frühzeit der Evolution den vierzähligen Porphyrin-Liganden als etwas Nützliches „empfunden“ hat, aus dem sich Verschiedenes



Abb. 5 Entengrütze.

ABB. 6 | PORPHYRIN-DERIVATE

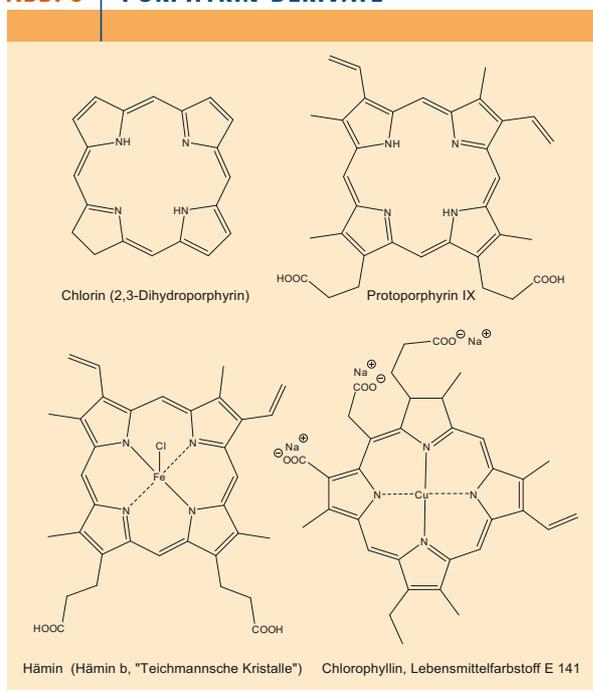
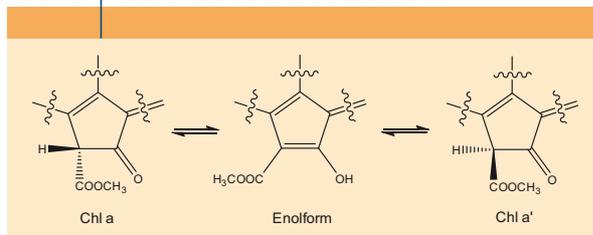


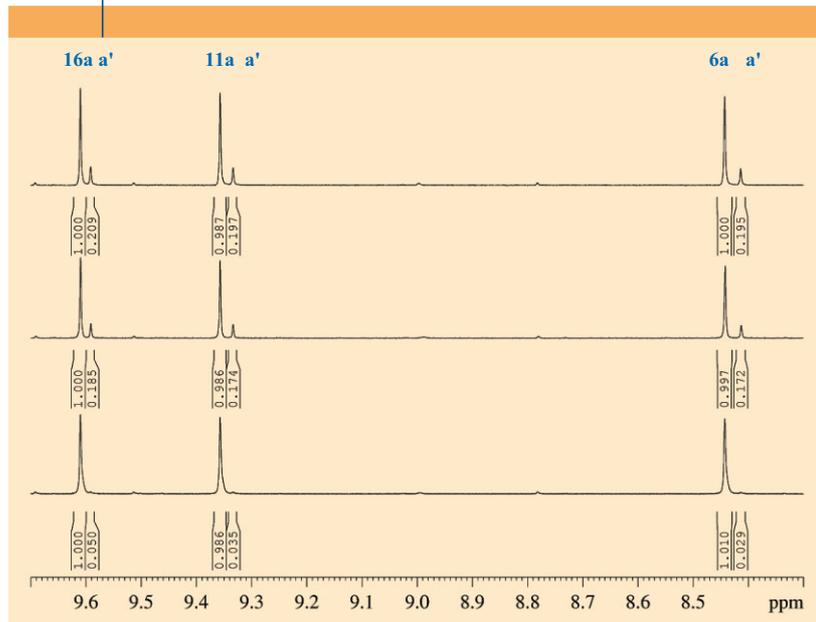
ABB. 7 | KETO-ENOL-TAUTOMERIE ...



... beim Chl a, die zu Chl a' führt (als Substruktur)

entwickeln lässt, liegt beim Vergleich des Chlorins aus dem Blattgrün mit dem Häm aus dem Blutfarbstoff nahe. So kamen Photosynthese treibende Organismen zu ihrem Lichtsammelpigment und Tiere zu ihrem Sauerstofftransporter. Im ersten Fall ist die Farbigkeit essentiell, im zweiten ist sie

ABB. 8 | EPIMERIE-GLEICHGEWICHT ...



... von Chlorophyll a und a'. Untere Spur: Startspektrum des mit counter current Chromatographie isolierten Chlorophylls a in THF-d₈; Mittlere Spur: Spektrum nach 23 h bei 295K; Obere Spur: Spektrum nach 52 h. Siehe die supporting information für den Gegenversuch mit Chlorophyll a' als Startmaterial.

strukturell zwar ebenso gegeben, wird aber nicht zur Lichtabsorption benötigt, da die Bindung von O₂ an das Fe²⁺-Ion ohne Licht erfolgt. Es gibt auch einen gemeinsamen biochemischen Vorläufer für beide Liganden, das Protoporphyrin IX (Abbildung 6). Er wird in beiden Fällen biosynthetisch durchlaufen.

Alltagsanwendungen für Chlorophyllin

Selbstverständlich ist eine derart allgemein in der Natur vorkommende Stoffklasse wie die Chlorophylle auf ihre Anwendbarkeit hin untersucht worden. Wenig lichtecht und wenig robust, eignen sie sich zum Färben nicht! Aber darauf kommt es in der Natur ja auch nicht an, da sie jedes Jahr neu entstehen. Ein Derivat, das Chlorophyllin, wird in der Dermatologie als Wundheilungsmittel eingesetzt, da es granulationsanregend und epithelisierend wirkt. Chlorophyllin wirkt auch desodorierend. Hätten Sie das gedacht? Es verringert die Aktivität bestimmter eiweißspaltender Enzyme. So wirken „Chlorophyll-Tabletten“ geruchsneutralisierend gegen Mund- und Körpergeruch. Mit ihnen wird das Trinitriumsalz des Chlorophyllins, eingenommen (Lebensmittelfarbstoff E 141).



Abb. 9 Immergrüner Efeu.

Dabei handelt es sich um chemisch abgewandeltes Chlorophyll, das nach Spaltung des Phytolesters gut wasserlöslich ist (Abbildung 6). Außerdem ist das Zentralion Mg²⁺ gegen Cu²⁺ ausgetauscht. Das stabilisiert den Komplex und erhöht bei intensiv grüner Farbe die Lichtechtheit in Farbstoffanwendungen.

Blut und Blätter – Wie fest muss eine chemische Bindung sein?

Diese Austauschbarkeit zeigt, dass die Evolution selbst viele chemische Bindungen eben nicht maximal fest, sondern gerade „fest genug“ haftend, also optimal, gewählt hat. Das gilt für das Eisenion im Hämoglobin - es wird als wertvolles Spurenelement beim Abbau eines roten Blutkörperchens weitgehend recycelt. Ebenso „genügt“ das Mg-Ion im Blattgrün, denn auch Chlorophyll wird im Herbst abgebaut, was sollte die Natur mit nicht zerfallenden Blättern? Das Mg²⁺ wird partiell recycelt. Auch das O₂-Molekül wird „gerade fest genug“ an Hämoglobin gebunden. Es muss ja in der Zelle möglichst leicht wieder „entbunden“ werden können. Toxisches Kohlenmonoxid wird 300-mal fester gebunden, quasi irreversibel fest.

Zur Biosynthese von Chlorophyll

Die Biosynthese von Chlorophyll a und b ist im Detail aufgeklärt worden. Zugunsten unserer Absicht, die Isolierung und Spektroskopie von Chlorophyll a ausführlich darzustellen, unterlassen wir es, seine Biosynthese Schritt für Schritt zu beschreiben. Dafür verweisen wir auf die Kapitel 10–18 in [1], die ebenso auf den Abbau des Chlorophylls und auf die Evolution der Chlorophylle und der Photosynthese-Reaktion eingehen. Erwähnen wollen wir lediglich einige markante Eckpunkte. 5-Aminolävulinsäure ist die acyclische Vorstufe der vier Pyrrole, die im vierzähligen Liganden der Porphyrinbiosynthese benötigt werden. Im Zuge dieser Tetrapyrrolbiosynthese gelangt die Natur an eine Protoporphyrin IX genannte zentrale Zwischenstufe, von der aus es nach Abwandlung möglich ist, sowohl zu den Chlorophyllen als auch zum Häm zu kommen, also wenn man so will ins Pflanzen- oder Tierreich (Abbildung 6).

Ein Blick ins Blatt: Chlorophylle und Photosynthese

Werfen wir noch einen Blick auf die Rolle der Chlorophylle in der Photosynthese, ohne wie [1] in die Tiefe gehen zu können. Durch Photosynthese werden mittels Lichtenergie energiereiche Stoffe aus energiearmen erzeugt. Das können Pflanzen, Algen und einige Bakterien sein. Durch die

se Assimilation von Kohlendioxid entstehen in den Chloroplasten Kohlenhydrate als unsere Energiequelle, z.B. in einem Blatt. Die Bruttogleichung dafür ist:



Es handelt sich um eine Redoxreaktion. Kohlendioxid wird zu Kohlenhydraten reduziert. Der Sauerstoff im Wasser wird zu elementarem Sauerstoff oxidiert. O in H₂O liefert also die als Reduktionsmittel notwendigen Elektronen und Wasser ist die Quelle des Luftsauerstoffs.

Die Photosynthese als Basis des Lebens läuft in einem gigantischen Umfang ab. Etwa 150 Milliarden Tonnen pflanzliche Biomasse werden jährlich so gebildet (berechnet als Trockenmasse). Dabei entsteht etwa ebenso viel Sauerstoff! Jeglicher Sauerstoff, den wir atmen, ist biologischen Ursprungs. Vor dem Zustandekommen dieser Reaktion war die Atmosphäre sauerstofffrei. Betrachten wir es im Vorstellbaren: Ein großer Laubbaum assimiliert an einem Sommertag etwa 10 m³ Kohlendioxid und setzt dafür 10 m³ Sauerstoff frei (!). Das ist der Tagesbedarf von drei Menschen. Außerdem werden ca. 12 kg „Biomasse“ erzeugt.

Die Photosynthese bietet eine biochemische Aufbauleistung, die das „Wunder der Energieversorgung“ durch Licht nutzt. Der Wundertäter heißt Chlorophyll. Die Verteilung von Chlorophyllmolekülen in einem Blatt ist nicht zufällig wie die von Rosinen in einem Kuchen, sondern perfekt organisiert als Teile einer zellulären Maschinerie, die Energie einsammelt, überträgt und in chemische Energie umwandelt. Wie funktioniert diese Maschinerie, ganz grob und von außen betrachtet?

Es gibt zwei Arten der Photosynthese, die anoxygene (ohne dass O₂ entsteht) und die oxygene (O₂ entsteht). Die anoxygene Variante entstand evolutionär zuerst, vor 3,5 Mrd. Jahren; die oxygene später, vor etwa 3 Mrd. Jahren. Solange schon gibt es Chlorophylle! Interessant ist auch, dass erst Sauerstoff das Entstehen einer Ozonschicht ermöglichte. Es laufen prinzipiell drei Schritte ab:

- Die Absorption elektromagnetischer Strahlung (Licht) durch Farbstoffe wie Chlorophylle;
- die Umwandlung von Strahlungsenergie in chemische Energie. Dabei wird energiereiches Adenosintriphosphat (ATP) als Überträger und kurzfristiger Speicher von biochemisch nutzbarer Energie synthetisiert.
- Die Biosynthese organischer Stoffe, die als Baumaterial und Energielieferanten für alle Organismen der Nahrungsketten dienen, auch die ohne eigene Photosynthese.

Die beiden ersten Schritte werden Lichtreaktion genannt. Bei Pflanzen laufen sie im Photosynthese-System I (PS I) und Photosynthese-System II (PS II) ab. Der dritte Schritt ist lichtunabhängig.

Pflanzliche Chlorophylle, die Licht absorbieren, werden in diesem Zusammenhang als „Chromophore“ bezeichnet. Sind sie in Chromoproteinen gebunden, so nennt man sie hier „Pigmente“ (beide Begriffe sind mehrdeutig). Das kon-

*Mädel ruck ruck ruck an meine grüne Seite
i hab di gar so gern, i kann di leide
Bist so lieb und gut, schön wie Milch und Blut
Du mußt bei mir bleiben, mir die Zeit vertreiben
Mädel ruck ruck ruck an meine grüne Seite
i hab di gar so gern, i kann di leide.*

Schwäbisches Volkslied, 1. Hälfte des 19. Jahrhunderts

jugierte π -System wird bei Lichtabsorption angeregt. Es werden aber nicht alle Teile des sichtbaren Spektrums absorbiert, sondern von Chl a und Chl b bevorzugt blaues und rotes Licht, was zu einer „Grünlücke“ führt, die wir als „Blattgrün“ sehen können. Angeregtes Chlorophyll kann nun ein angeregtes Elektron auf einen Elektronenakzeptor übertragen. Es verbleibt ein positiv geladenes Chlorophyllradikal (Chl⁺). Über eine Elektronentransportkette gelangt das übertragene Elektron am Ende zum Chlorophyll zurück. Dabei bewirkt es aber die Verfrachtung von Protonen durch die Membran (Protonenpumpe). Lichtenergie wird dabei

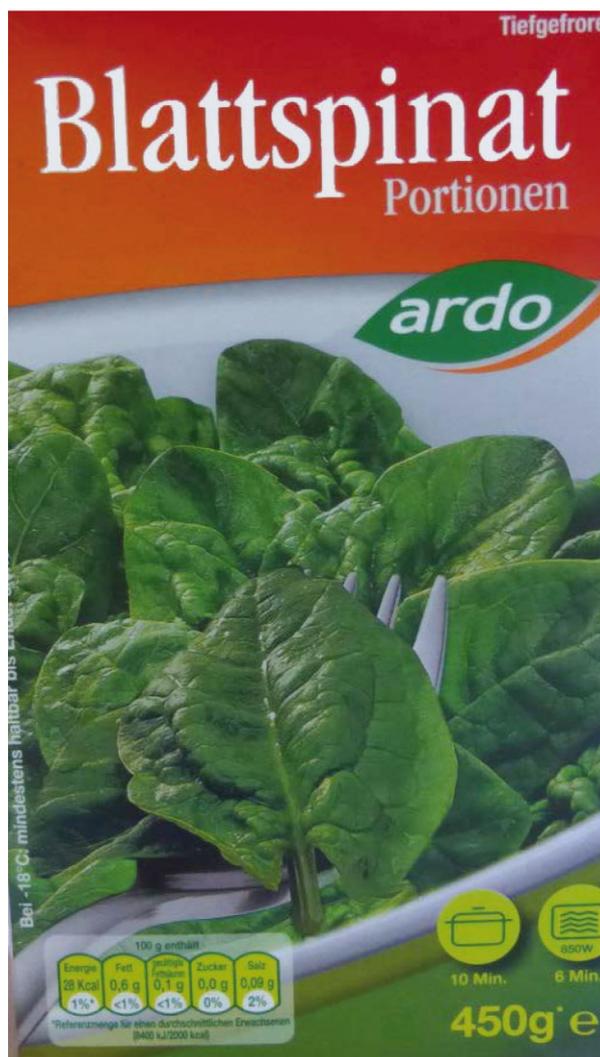


Abb. 10 Unser Ausgangsstoff.

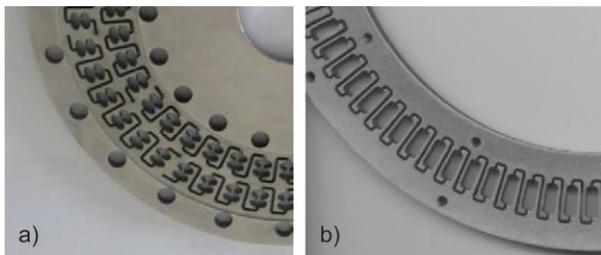


Abb. 11 Aufnahme einer Ringscheibe einer hydrostatischen Anlage unterschiedlicher Hersteller: a) Armen Instruments (mode TCPC250); b) Kromaton Technologies (FCPC250).

in Form einer „chemiosmotischen Kopplung“ in ein elektrisches und osmotisches Potential umgewandelt. Das PS II bietet ein starkes Oxidationsmittel zur Oxidation von Wasser. Das PS I liefert ein starkes Reduktionsmittel zur Re-

duktion von NADP^+ . So spaltet Licht Wasser, wobei O_2 und das starke Reduktionsmittel NADPH entstehen:



Energieresiches ATP wird aus ADP und Phosphat aufgebaut: $3 \text{ADP} + 3 \text{P}_i (+ \text{ADP-Synthase}) \rightarrow 3 \text{ATP} + 3 \text{H}_2\text{O}$

Als chlorophyllvermittelte Lichtreaktion ergibt sich daraus: $2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{NADP}^+ + 3 \text{ADP} + 3 \text{P}_i \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{NADPH}/\text{H}^+ + 3 \text{H}_2\text{O}$

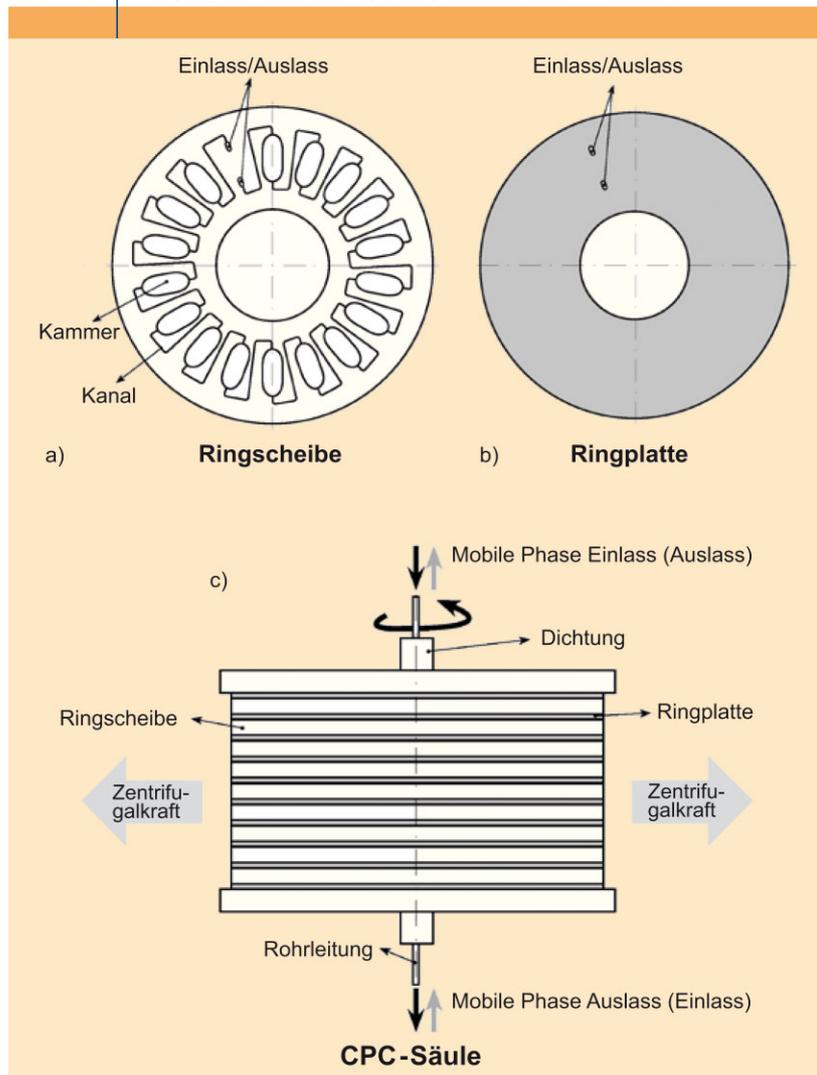
Faszinierend ist die strukturelle Anordnung von Chlorophyllen in Lichtsammelkomplexen, mit der wir den „Blick ins Blatt“ abschließen wollen. Lichtsammelkomplexe von Pflanzen befinden sich in der (inneren) Thylakoidmembran der Chloroplasten, die die Photosynthese betreiben. Sie absorbieren Licht und leiten diese Energie zum Reaktionszentrum der o.a. Lichtreaktion. Als Chromophore sind darin neben Chlorophyllen auch Carotinoide und Xanthophylle enthalten, die Licht absorbieren, aber auch emittieren können. Im Lauf der Evolution wurden Lichtsammelkomplexe zu Antennen geformt, was sie sehr viel effektiver als einzelne Pigmente macht. Denn in Antennen, die um ein Reaktionszentrum liegen, ist der Querschnitt größer und der Absorptionsbereich ist breiter.

Chlorophylle erfüllen mehrere Aufgaben. Indem sie für Lichtabsorption und Weiterleiten der absorbierten Energie sorgen, wirken sie als Photosensibilisatoren. Lichtsammelkomplexe sind so gebaut, dass sie eine große Fläche formen und einen „energetischen Trichter“ bilden, aus dem Energie ins Reaktionszentrum abfließt. Dort dienen zwei Chl a, das *special pair*, als Energieakzeptoren, die eine Ladungstrennung vollziehen können, mit der die Photosynthese beginnt. Der Energietransfer erfolgt im Pikosekundenbereich. All dies ist und wird im Detail untersucht mit dem Ziel, Sonnenenergie einmal in künstlicher Photosynthese zu nutzen.

Flüssig-Flüssig-Chromatographie

Die Flüssig-Flüssig-Chromatographie (engl. Liquid-liquid chromatography; LLC), auch Gegenstrom-Verteilungschromatographie (engl. Countercurrent Chromatography, CCC) oder zentrifugale Verteilungschromatographie (engl. Centrifugal partition chromatography, CPC) wurde bereits in den 1960er Jahren von Ito entwickelt [9, 10]. Die LLC grenzt sich von den anderen flüssig-chromatographischen Trenntechniken dadurch ab, dass nicht nur die mobile, sondern auch die stationäre Phase flüssig ist. Als stationäre und mobile Phase werden die beiden Phasen eines zweiphasigen Lösungsmittelsystems verwendet, das durch Mischen von mindestens zwei Lösungsmitteln hergestellt wird. Eine der beiden Phasen, die obere oder untere, wird durch ein Zentrifugalfeld in einer speziell konzipierten, rotierenden Säule zurückgehalten (stationäre Phase), während die andere mobile Phase durch diese hindurchgepumpt wird. Die eigentliche Trennung basiert auf der unterschiedlichen Ver-

ABB. 12 GRUNDLEGENDER AUFBAU EINER RINGSCHLEIBE ...



... mit Kammern und Kanälen b) Ringplatte aus Teflon c) Modulare Kassettenbauweise einer CPC-Säule, die aus Ringscheiben und Ringplatten besteht

teilung der Zielkomponenten zwischen den beiden flüssigen Phasen.

Die LLC wird seit ihren Anfängen vor allem für die Trennung und Aufreinigung von Naturstoffen eingesetzt [11–13]. Ihr breites Anwendungsspektrum umfasst die Trennung von pharmazeutischen Wirkstoffen, Vitaminen, Pigmenten, Herzgiften, Pestiziden und Elementen.

Die LLC ist derzeit die einzige chromatographische Trenntechnik, bei der ein Anwender sowohl mobile als auch stationäre Phase in einem Schritt vorbereiten muss, da beide nicht unabhängig voneinander gewählt werden können. Zusammen mit den fast unzähligen Auswahlmöglichkeiten an Lösungsmittelzusammensetzungen ist dies der Grund, warum die Trenntechnik äußerst vielseitig ist und für das jeweilige Trennproblem maßgeschneiderte stationäre und mobile Phasen ermöglicht. Die Tatsache, dass es sich bei der stationären Phase um eine trägerlose Flüssigkeit handelt, bringt erhebliche Vorteile mit sich. Das gesamte Volumen der stationären Phase, das meist etwa 60–80 % des gesamten Säulenvolumens einnimmt, ist hierbei für die Trennung zugänglich. Dies ermöglicht eine sehr hohe Säulenbeladung und Trennleistung. Außerdem ermöglicht die Abwesenheit von irreversibler Adsorption eine vollständige Probenrückgewinnung und eine hohe Reproduzierbarkeit der Trennung.

Die Anlagengrößen variieren von 5 ml bis 18 l und es wird grundsätzlich zwischen zwei möglichen Designs unterschieden: hydrodynamisch und hydrostatisch.

Neben den ursprünglichen zweiachsigen hydrodynamischen Apparaten etablierte sich im Lauf der Jahre die hydrostatische einachsige Bauweise, welche von uns benutzt wurde. Von dem prinzipiellen Aufbau her unterscheiden sich heutige moderne Anlagen nur sehr geringfügig von den ersten Prototypen. Hydrostatische Anlagen sind hauptsächlich durch den einachsigen Antrieb des Rotors mit

dem daraus resultierenden konstanten Zentrifugalfeld, so wie die typische Bauweise mit Kammern und Kanälen charakterisiert (Abbildung 11b) [14]. In den Kammern, die durch schmale Kanäle miteinander verbunden sind, durchfließt die mobile Phase die zurückgehaltene stationäre Phase und es findet der gewünschte Stoffaustausch statt. Je nach Hersteller haben die Kammern unterschiedliche geometrische Formen und können einzeln oder gepaart in Form von „Twin-Cells“ (dt. Zwillingszellen) vorliegen (Abbildung 11a).

Die Kammern sind in eine Scheibe aus Teflon, rostfreiem Stahl oder PTFE gefräst, wodurch eine modulare Bauweise ermöglicht wird. Je nach geforderter Kapazität können mehrere identische Scheiben übereinander gelegt werden und die Kammern zweier übereinanderliegender Scheiben miteinander verbunden werden. Hierbei ist die letzte Kammer einer vorausgehenden Scheibe jeweils mit der ersten Kammer der nächsten benachbarten Scheibe verknüpft. Um eine Verbindung zwischen diesen zu ermöglichen, sind in den Ringplatten, die zur physikalischen Trennung benachbarter Scheiben eingesetzt werden, zwei Bohrungen vorgesehen (Abbildung 12b). Mehrere Ringscheiben mit benachbarten Ringplatten werden durch eine modulare Kassettenbauweise zu einem Rotor verbaut, von denen wiederum einer oder mehrere in der Anlage existieren (Abbildung 12c).

ABB. 13 UV/VIS-SPEKTRUM VON CHLOROPHYLL A IN ETHANOL

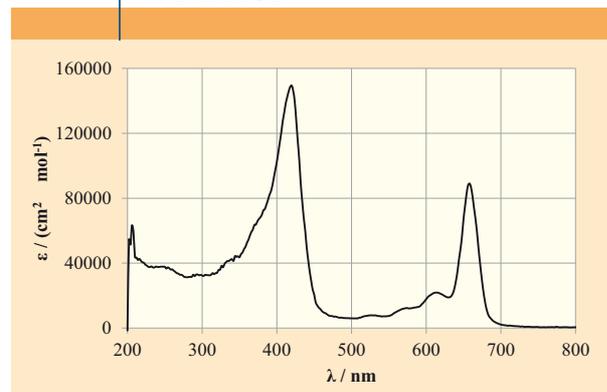
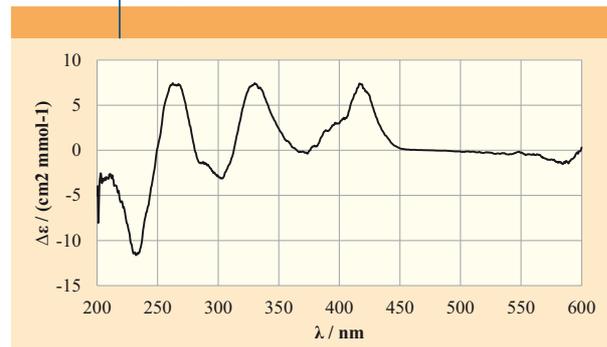


ABB. 14 CD-SPEKTRUM VON CHLOROPHYLL A IN ETHANOL



Mit dem grünen Lautenbände
»Schad um das schöne grüne Band,
Daß es verbleicht hier an der Wand,
Ich hab das Grün so gern!«
So sprachst du, Liebchen, heut zu mir;
Gleich knüpf ich's ab und send es dir:
Nun hab das Grüne gern!
Ist auch dein ganzer Liebster weiß,
Soll Grün doch haben seinen Preis,
Und ich auch hab es gern.
Weil unsre Lieb ist immergrün,
Weil grün der Hoffnung Fernen blühn,
Drum haben wir es gern.
Nun schlinge in die Locken dein
Das grüne Band gefällig ein,
Du hast ja's Grün so gern.
Dann weiß ich, wo die Hoffnung wohnt,
Dann weiß ich, wo die Liebe thront,
Dann hab ich's Grün erst gern.

Wilhelm Müller (1794–1827) Die schöne Müllerin, Vertonung
F. Schubert siehe www.youtube.com/watch?v=IDwHrflaKM8

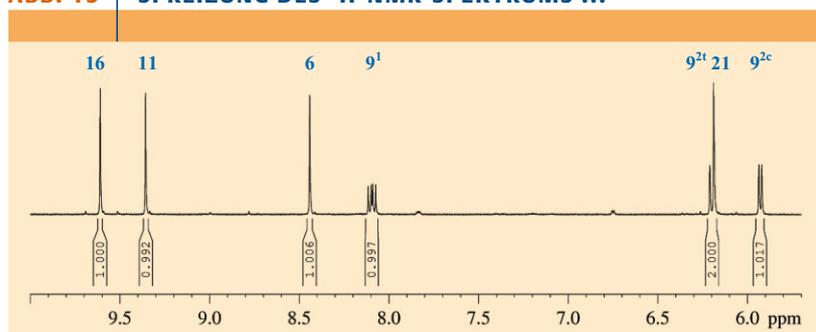
UV/vis- und CD-Spektren

Die intensivste Bande bei 425 nm (blauer Wellenlängenbereich) wird nach ihrem Entdecker Jaques-Louis Soret (1883) als Soret-Bande bezeichnet. Sie liegt fast genau im spektra-

len Maximum des terrestrischen Sonnenlichts. Darüber hinaus finden sich mehrere Banden zwischen 555 und 700 nm mit einem Maximum bei 660 nm, also im roten Wellenlängenbereich. Diese Bande wird als Q-Bande bezeichnet, sie absorbiert auch die langwelligen Bestandteile des Sonnenlichts. Da Chlorophyll die blauen und roten Anteile des Sonnenlichts absorbiert, ist es als Photorezeptor hervorragend angepasst und erscheint unserem Auge als tiefgrüne Substanz. Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich mit der quantenmechanischen Deutung dieser $\pi-\pi^*$ -Übergänge im Phorbinsystem sowie mit ihrem Fluoreszenz-Polarisationsgrad [15, 16].

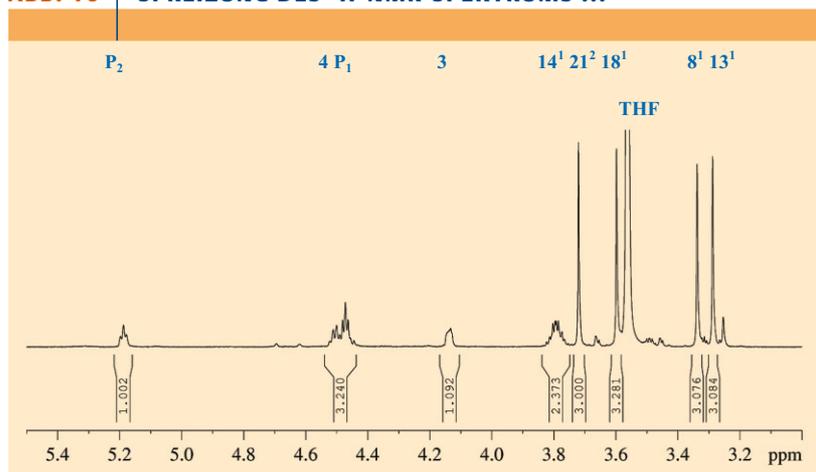
Die Absorptionsbande Q des Chlorophylls bei 660 nm zeigt einen negativen Cotton-Effekt, der in dem abgebildeten CD-Spektrum (Abbildung 14) allerdings nicht zu sehen ist, da dieses nur bis 600 nm aufgenommen wurde. Zu niedrigeren Wellenlängen werden von positiv (420, 330 und 265 nm) zu negativ (375, 300 und 240 nm) alternierende Cotton-Effekte beobachtet, deren chemische Interpretation schwierig erscheint, zumal auch in dieser Lösung die Gleichgewichtsanteile des Epimeren Chlorophyll a' vorhanden waren. Eine detaillierte Diskussion der CD-Spektren findet sich bei Houssier [17].

ABB. 15 | SPREIZUNG DES ¹H-NMR-SPEKTRUMS ...



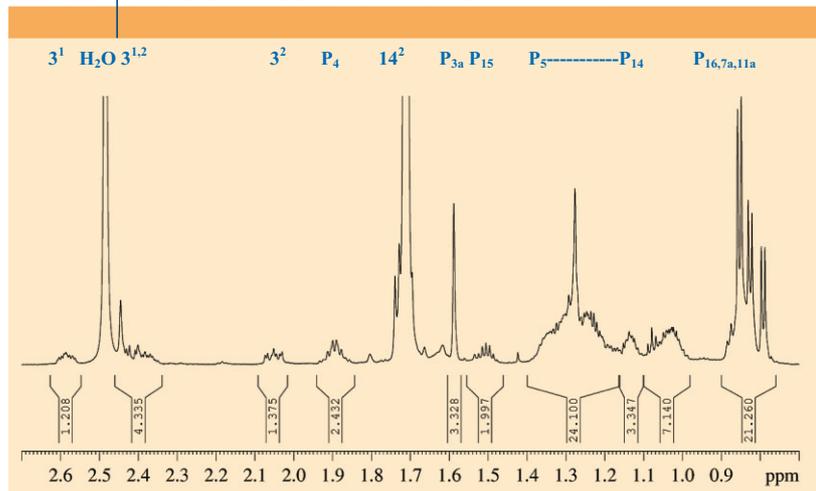
... von Chlorophyll a im olefinisch/aromatischen Bereich

ABB. 16 | SPREIZUNG DES ¹H-NMR-SPEKTRUMS ...



... von Chlorophyll a im olefinisch/aliphatischen Bereich

ABB. 17 | SPREIZUNG DES ¹H-NMR-SPEKTRUMS ...



... von Chlorophyll a im aliphatischen Bereich

NMR-Spektren

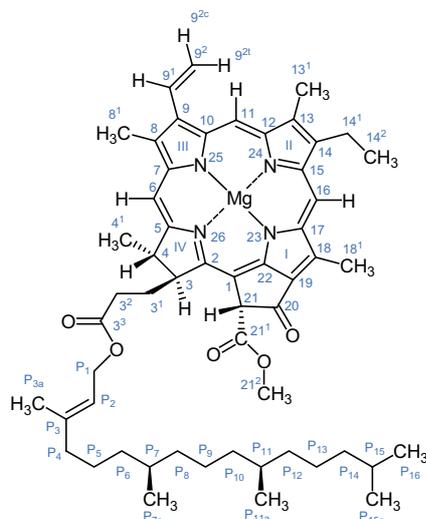
Alle in diesem Artikel besprochenen NMR-Spektren sind auch als Originaldaten unter dem Link http://nmrshiftdb.nmr.uni-koeln.de/molecule/20252966/dataset/ChiuZ_Tetrahydrofuran-D8+%28THF-D8%2C+C4D4O%29 zugänglich.

Alle NMR-Spektren [19–23] wurden bei 700 MHz in THF-d₈ aufgenommen und sind auf TMS bezogen. Die ¹H, ¹⁵N-HMQC-Spektren benutzen die Ξ -Skala mit der in der Strukturbiologie gebräuchlichen Referenzierung. ²⁵Mg-NMR Spektren in Lösung konnten nicht erhalten werden.

Die Analyse der NMR-Spektren von Chlorophyll a stellt eine formidable Aufgabe dar, was bei einer Summenformel von C₅₅H₇₂MgN₄O₅ nicht unerwartet ist. Störend hinzu kommt das Epimerengleichgewicht an C-21, welches für a:a' in THF-d₈ bei 295 K ca. 100:20 beträgt. Einzig mit der Gegenstromverteilungschromatographie (counter current chromatography) [9, 10] gelang es uns, Chlorophyll a von b, b' und gleichzeitig von a' zu trennen, so dass wir in Anlehnung an die Arbeit von Jubert und Bailey [18] ein epimerenreines ¹H-NMR Startspektrum von Chlorophyll a erhalten konnten. Im Laufe von 24 h in THF-Lösung stellt sich jedoch das Epimerengleichgewicht an C-21 wieder ein.

Das ¹H-NMR-Spektrum von Chlorophyll a (Abbildung 15) zeigt im stark entschirmten olefinischen Bereich drei scharfe Singulets bei $\delta_H = 9,61, 9,36$ und $8,44$, welche gemeinsam sofort den Protonen 6, 11, und 16 des Porphyrinrings zugeordnet werden können.

Ihre Einzelzuordnung benötigt jedoch die Auswertung des NOESY-Spektrums. Bei $\delta_H = 8,10$ erscheint ein Doppeldublett-Signal mit den Kopplungen von 11,5 und 17,8 Hz, welches daher dem H-9¹ Atom der Vinylgruppe zugewiesen werden muss. Die Signale der beiden zugehörigen end-



ständigen Vinylprotonen findet man leicht bei $\delta_H = 6,2$ (H-9^{2b}) und $\delta_H = 5,93$ (H-9^{2c}). Dem Ersteren dieser beiden Signale ist ein weiteres Proton als Singulett überlagert.

Nach Auskunft des HSQC-Spektrums ist dieses Signal bei $\delta_H = 6,19$ an ein Kohlenstoffatom mit der Verschiebung $\delta_C = 66,4$ gebunden, also ein C-Atom mit sp³-Hybridisierung. Daher wird es dem Proton H-21 zugeordnet. Seine relativ starke Entschirmung ist bedingt durch die beiden flankierenden C=O-Gruppen und zeigt die CH-Acidität dieses Protons an. Diese erklärt die leichte Epimerisierung des Moleküls.

In Abbildung 16 sehen wir bei $\delta_H = 5,19$ ein Triplett eines olefinischen Protons ($\delta_C = 119,7$) welches daher P₂ zugeordnet wird. Es folgen zwei Multipletts bei $\delta_H = 4,50$ (1H, $\delta_C = 50,2$) und $4,47$ (2H, $\delta_C = 61,5$). Im COSY-Spektrum koppelt ersteres mit einem Methylgruppensignal bei $1,74$ und wird daher H-4 zugewiesen. Das zweite zeigt im COSY-Spektrum eine Verknüpfung zu dem Proton P₂ und gehört daher eindeutig zu den Protonen P₁. Das nächste Signal bei $\delta_H = 4,14$ (1H, $\delta_C = 51,8$) koppelt mit einem Multiplett bei $\delta_H = 2,39$ und wird daher H-3 zugeordnet.

Ein Multiplett von zwei Protonen bei $\delta_H = 3,79$ ($\delta_C = 20,3$) koppelt mit einem Methylgruppensignal bei $\delta_H = 1,73$, ($\delta_C = 18,1$), welches weitgehend vom Signal des Lösungsmittels überdeckt ist. Diese Resonanzen werden der Ethylgruppe an C-14 zugeordnet. Es folgen 4 Methylgruppensignale als Singulets bei ($\delta_H = 3,72/\delta_C = 52,2$; $\delta_H = 3,60/\delta_C = 12,6$ $\delta_H = 3,34/\delta_C =$ und $\delta_H = 3,29/\delta_C = 11,2$). Das erste kann von seiner ¹³C-chemischen Verschiebung eindeutig der Methoxygruppe H-21² zugeordnet werden. Die übrigen drei liegen entsprechend ihren Verschiebungswerten jeweils an einer Doppelbindung und werden später mit Hilfe des NOESY- und HMBC-Spektrums geklärt.

Ein Multiplett eines Protons bei $\delta_H = 2,57$ gehört laut COSY und HSQC zusammen mit dem Multiplett bei $\delta_H = 2,39$ zum gleichen C-Atom bei $\delta_C = 30,7$ und wird den Protonen H-3¹ zugeschrieben. Entsprechend gehört das Multiplett bei $\delta_H = 2,42$ sowie das bei $\delta_H = 2,05$ mit dem zugehörigen C-Atom bei $\delta_C = 31,2$ zu H-3². Das COSY-

Spektrum zeigt das typische Bild einer -CH₂-CH₂-Verknüpfung.

Das Multiplett bei $\delta_H = 1,90$ $\delta_C = 40,6$ wird der allylischen Methylengruppe P₄ zugeschrieben. Das COSY-Spektrum verweist auf die Methylengruppe P₅ bei $\delta_H = 1,36$.

NOESY-Spektrum

Das entschirmteste Proton des Porphyrinrings bei $\delta_H = 9,61$ zeigt zwei deutliche NOE-Kreuzsignale zu den Protonen 14¹ und zur Methylgruppe bei $\delta_H = 3,6$ (siehe Abbildungen S7 und S8 in der *supporting information*). Dieser Befund legt seine Zuordnung als H-16 und die der Methylgruppe als H-18¹ fest. Das nächste Porphyrinringproton bei $\delta_H = 9,36$ zeigt drei NOE-Kreuzsignale zu den Protonen H-9¹, H-9^{2t} und zu dem Methylgruppensignal bei $\delta_H = 3,29$. Dies legt wiederum seine Zuordnung als H-11 und die der Methylgruppe als H-13¹ fest. Auch das dritte Porphyrinringproton bei $\delta_H = 8,44$ zeigt drei Kreuzrelaxationen zu H-4, zur Methylgruppe bei $\delta_H = 3,34$ und zu H-4¹. Wiederum ist dies bezeichnend für seine Zuordnung als H-6 und die der Methylgruppe als H-8¹.

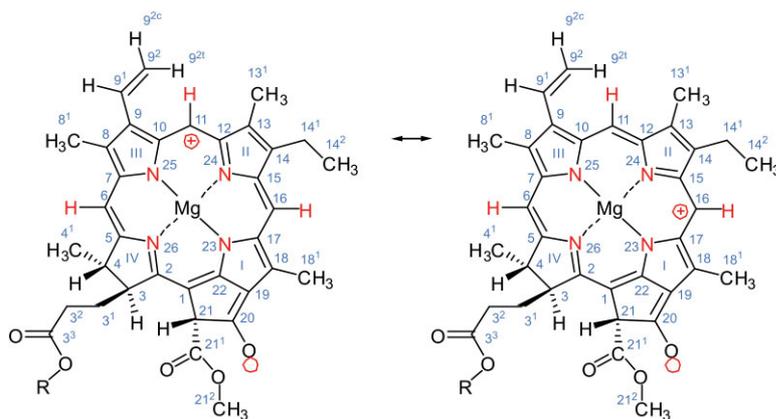
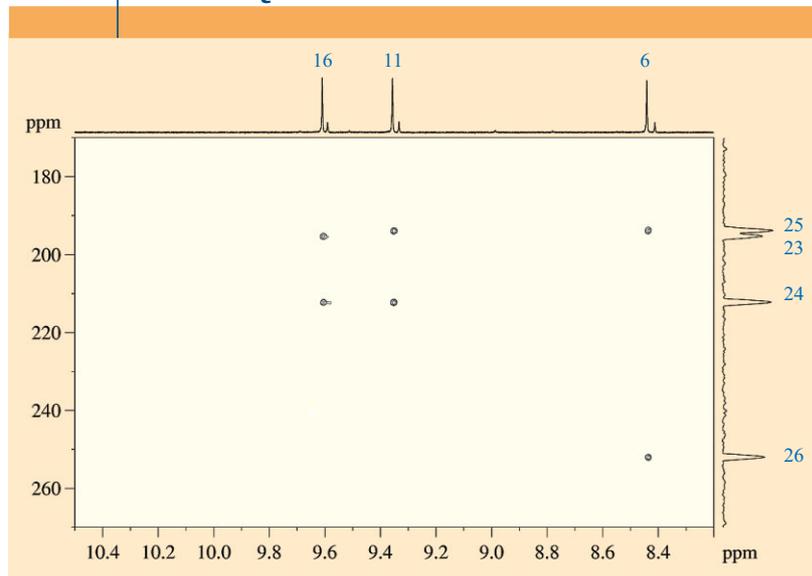


ABB. 18 ¹H¹⁵N-HMOC-SPEKTRUM VON CHLOROPHYLL A



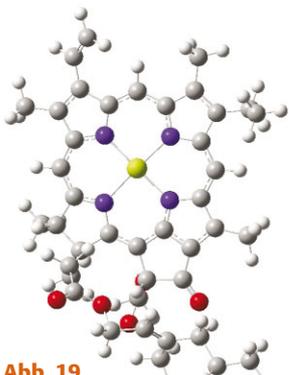


Abb. 19
3D Struktur von Chlorophyll a berechnet mit DFT-Methoden.

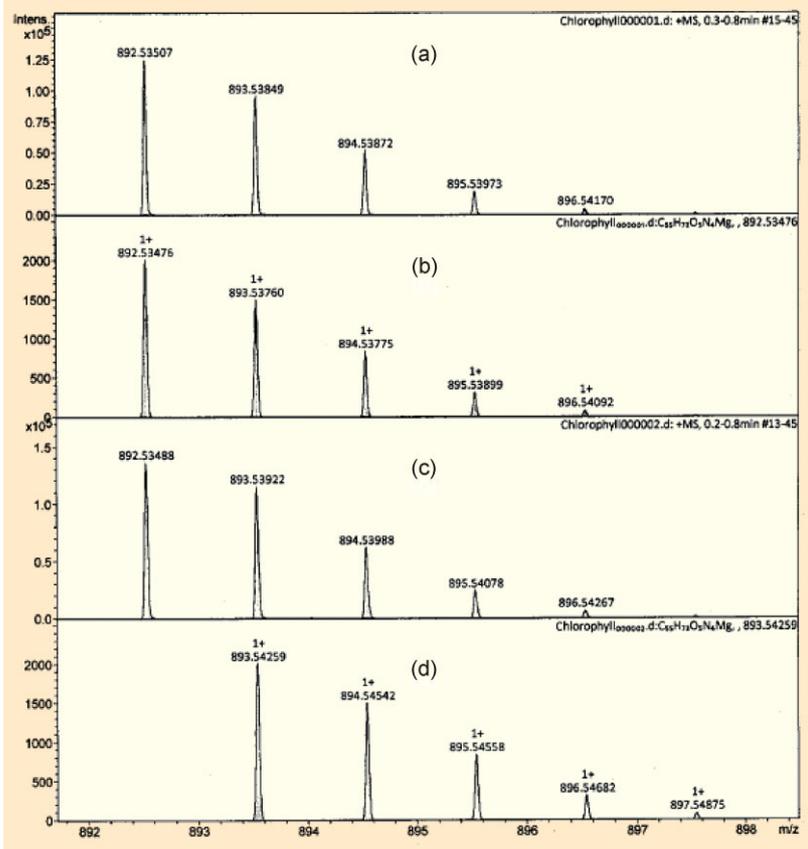
Dass von den drei Protonen am Porphyrinring H-16 am stärksten entschirmt erscheint, gefolgt von H-11, lässt sich zwanglos aus den angegebenen mesomeren Grenzstrukturen ableiten. Dagegen ist es nicht möglich, an C-6 eine positive Ladung zu formulieren.

Wie erwartet zeigt H-9¹ zwei zusätzliche NOE-Peaks zu H-9^{2c} und zur Methylgruppe H-8¹.

Entsprechend zeigt H-21 Kreuzsignale zu H-3, 3¹ und 3². Trivial sind die Kreuzpeaks zwischen

P₂ und P₁, sowie P₄, ein schwacher Kreuzpeak ist zwischen P₂ und P₅ zu sehen. H-4 zeigt NOE-Effekte zu H-3¹ und H-4¹ und bestätigt damit deren Zuordnung, ebenso wie der Kreuzpeak zwischen P₁ und P_{3a}. Trivial sind wieder die NOE-Verknüpfungen zwischen H-3 und H-3^{1/3/2}, sowie H-4¹. Die Protonen 14¹ zeigen Kreuzsignale zu H-13¹ und natürlich zu H-14². Die beiden diastereotopen Protonen H-3² sind durch eine starke NOE-Wechselwirkung verknüpft und gleichzeitig mit H-3¹. P₄ zeigt vier Korrelationen entlang der Phytylkette.

ABB. 20 | ESI(+)-MASSENSPEKTRUM VON CHLOROPHYLL A



(a) < 10⁻⁶ M-Lösung in Acetonitril **(b)** Computer generierte Isotopenverteilung für M⁺ **(c)** nach Zusatz von 0,06% Ameisensäure **(d)** Computer generierte Isotopenverteilung für [M+H]⁺

Wie aufrichtig betrübt war ich, mein Fräulein, Sie zu verfehlen!« sprach Herr Grünlich einige Tage später, als Tony, die von einem Ausgang zurückkehrte, an der Ecke der Breiten- und Mengstraße mit ihm zusammentraf. »Ich erlaubte mir, Ihrer Frau Mama meine Aufwartung zu machen, und ich vermisse Sie schmerzlich ... Wie entzückt aber bin ich, Sie nun doch noch zu treffen!« Fräulein Buddenbrook war stehengeblieben, da Herr Grünlich zu sprechen begann; aber ihre Augen, die sie halb geschlossen hatte und die plötzlich dunkel wurden, richteten sich nicht höher als auf Herrn Grünlichs Brust, und um ihren Mund lag das spöttische und vollkommen unbarmherzige Lächeln, mit dem ein junges Mädchen einen Mann mißt und verwirft ... Ihre Lippen bewegten sich – was sollte sie antworten? Ha! es mußte ein Wort sein, das diesen Bendix Grünlich ein für allemal zurückschleuderte, vernichtete ... aber es mußte ein gewandtes, witziges, schlagendes Wort sein, das ihn zugleich spitzig verwundete und ihm imponierte ...

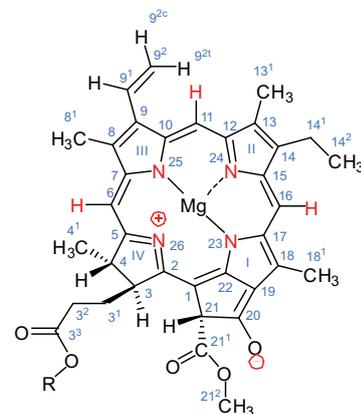
»Das ist nicht gegenseitig!« sagte sie, immer den Blick auf Herrn Grünlichs Brust geheftet; und nachdem sie diesen fein vergifteten Pfeil abgeschossen, ließ sie ihn stehen, legte den Kopf zurück und ging rot vor Stolz über ihre sarkastische Redegewandtheit nach Hause, woselbst sie erfuhr, daß Herr Grünlich zum nächsten Sonntag auf einen Kalbsbraten gebeten sei ...

Thomas Mann (1875–1955) Buddenbrooks

¹H¹⁵N HMQC

Die Analyse des ¹H¹⁵N-HMQC-Spektrums bestätigt noch einmal die Einzelzuordnung der drei Porphyrinringprotonen H-6, H-11 und H-16. Jedes muss über drei Bindungen mit zwei Stickstoff-Atomen, einem sp³- und einem sp²-hybridisierten N-Atom koppeln. Wir erwarten daher sechs Signale, wobei zwei Signalaare zum gleichen N-Atom führen sollten. H-16 koppelt mit N-23 bei δ_N = 195,3 und mit N-24 bei δ_N = 212,3. H-11 koppelt mit N-25 bei δ_N = 193,8 und ebenfalls mit N-24 bei δ_N = 212,3. H-6 koppelt wie H-11 mit N-25 und mit N-26 bei δ_N = 252,3.

Wiederum lässt sich die besondere Entschirnung von N-26 durch eine mesomere Grenzstruktur erklären, die analog für die drei anderen N-Atome nicht möglich ist:



Unsere ¹⁵N-NMR Daten sind in Übereinstimmung mit einer früheren Arbeit mit ¹⁵N-markiertem Material [24].

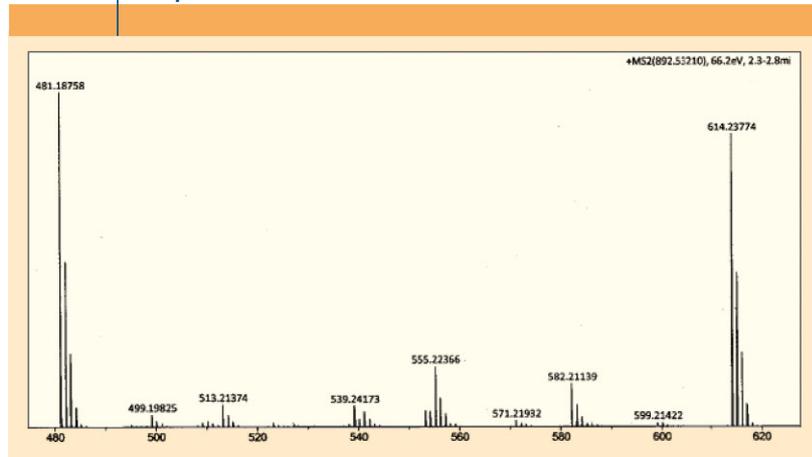
Quantenmechanische Berechnungen

Mit Software-Programmen, wie ChemBioDraw®, können chemische Verschiebungen abgeschätzt werden. Diese Programme nutzen empirische Inkrement-Regeln für Substituenten-Effekte, um aus Datensammlungen von in Lösung gemessenen NMR-Spektren unterschiedlicher Grundstrukturen eine Vorhersage der chemischen Verschiebungen für die zu untersuchende Molekülstruktur zu machen. Ein Vergleich mit den experimentell in THF-d₈ gemessenen ¹³C-NMR Verschiebungen von Chlorophyll a (Zuordnungstabelle in der *supporting information*) zeigt befriedigende Übereinstimmungen, z.B. für die ¹³C-NMR Signale der Phytyl-Kette, auch wenn die Reihenfolge der Signale nicht immer richtig vorhergesagt wird. Die abgeschätzten Verschiebungen für C-Atome des Macrocyclus, z.B.: C2, C5, C6, C11, C15, C16, zeigen sehr große Abweichungen von bis zu +20 ppm. Die durch π -Konjugation und Magnesium-Komplexierung bedingten besonderen elektronischen Verhältnisse des Porphyrinrings werden durch empirische Programme nicht berücksichtigt.

Durch quantenchemische Rechnungen können jedoch elektronische Struktur, Ladungsverteilung und NMR-spektroskopische Eigenschaften von beliebigen Molekülen *ab initio*, d. h. durch Lösen der Schrödinger-Gleichung unter alleiniger Verwendung von Naturkonstanten und ohne empirische Annahmen berechnet werden. Je nach Molekülgröße werden numerische Näherungsmethoden der Quantenchemie mit unterschiedlicher Genauigkeit und unterschiedlichem Rechenaufwand verwendet.

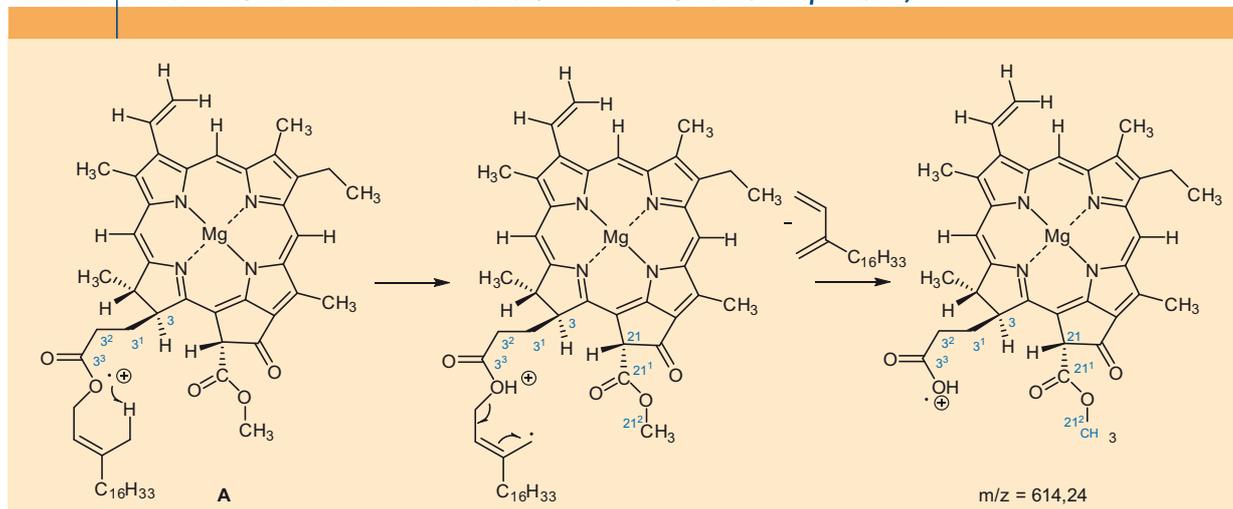
Für Chlorophyll a, ein Molekül mit 65 Atomen schwerer als Wasserstoff und mit über 400 Freiheitsgraden wird hier mit der Dichtefunktional-Methode BP86 mit Berücksichtigung von Dispersions-Wechselwirkungen (GD3BJ) und dem double grk.zeta-Basissatz cc-pVDZ für eine isolierte Struktur mit einer Konformation berechnet. Die NMR-chemischen Verschiebungen in ppm ergeben sich durch GIAO-NMR Rechnungen als zweite Ableitung der Energie nach den Kernko-

ABB. 21 MS/MS-SPEKTRUM DES M⁺-IONS VON CHLOROPHYLL A



ordinaten der berechneten Struktur und dem äußeren Magnetfeld als Differenz von isotropen Abschirmungstensoren zu einem mit gleichen Methoden berechnetem Standard, z.B. Tetramethylsilan (TMS, T_d-Symmetrie) für ¹H und ¹³C und NH₃ (C_{3v}-Symmetrie) für ¹⁵N. Die mit BP86 und dem triple-grk.zeta Basissatz TZVP berechneten ¹³C-NMR chemischen Verschiebungen der C-Atome des Porphyrinrings (Zuordnungstabelle in der *supporting information*) zeigen eine bessere Übereinstimmung ($\Delta\delta \sim -1$ bis +9 ppm) als empirisch vorhergesagt, da die durch π -Konjugation und Komplexierung bestimmte elektronische Umgebung der Ring-C-Atome berücksichtigt wird. Die quantenchemischen Berechnungen sowohl der NBO-Atomladungen als auch der ¹H- und ¹³C-NMR-Verschiebungen sind im Einklang mit der experimentell beobachteten stärkeren Entschirmung von C-16/H-16 und C-11/H-11 im Vergleich zu C-6/H-6 (vgl. die oben diskutierten Resonanzgrenzstrukturen). Abweichungen zwischen experimentellen und berechneten ¹³C-NMR-chemischen Verschiebungen der C-Atome des Phytyl-Rests sind u.a. auf die Mittelung von Konformations-Isomeren ähn-

ABB. 22 ABSPLATUNG DES PHYTYLRESTES UNTER BILDUNG VON m/z = 614,24



licher Energie in Lösung zurückzuführen, was bei der Berechnung nicht berücksichtigt wurde. Für die vier Stickstoffatome sind die aus NBO-Rechnungen erhaltenen negativen Partialladungen abnehmend von N-23 nach N-25, N-24 und N-26 mit dem Pattern und den relativen Differenzen der vier durch GIAO berechneten sowie den experimentellen ^{15}N -NMR-chemischen Verschiebungen im Einklang. Eine absolute Übereinstimmung ist für die verwendete DFT-Methode und den Basissatz nicht zu erwarten.

Ein Vergleich der experimentellen, der abgeschätzten und der quantenchemisch berechneten NMR-spektroskopischen Verschiebungsdaten zeigt die limitierte Anwendbarkeit von Inkrement-Systemen zur empirischen Vorhersage von NMR-Verschiebungen für Metallkomplexe von konjugierten makrocyclischen Ringsystemen. Quantenmechanische Berechnungen von NMR-chemischen Verschiebungen beruhen auf der Berechnung der elektronischen Umgebung der Atomkerne, i.e. der direkten Ursache der chemischen Verschiebung.

Massenspektrometrie

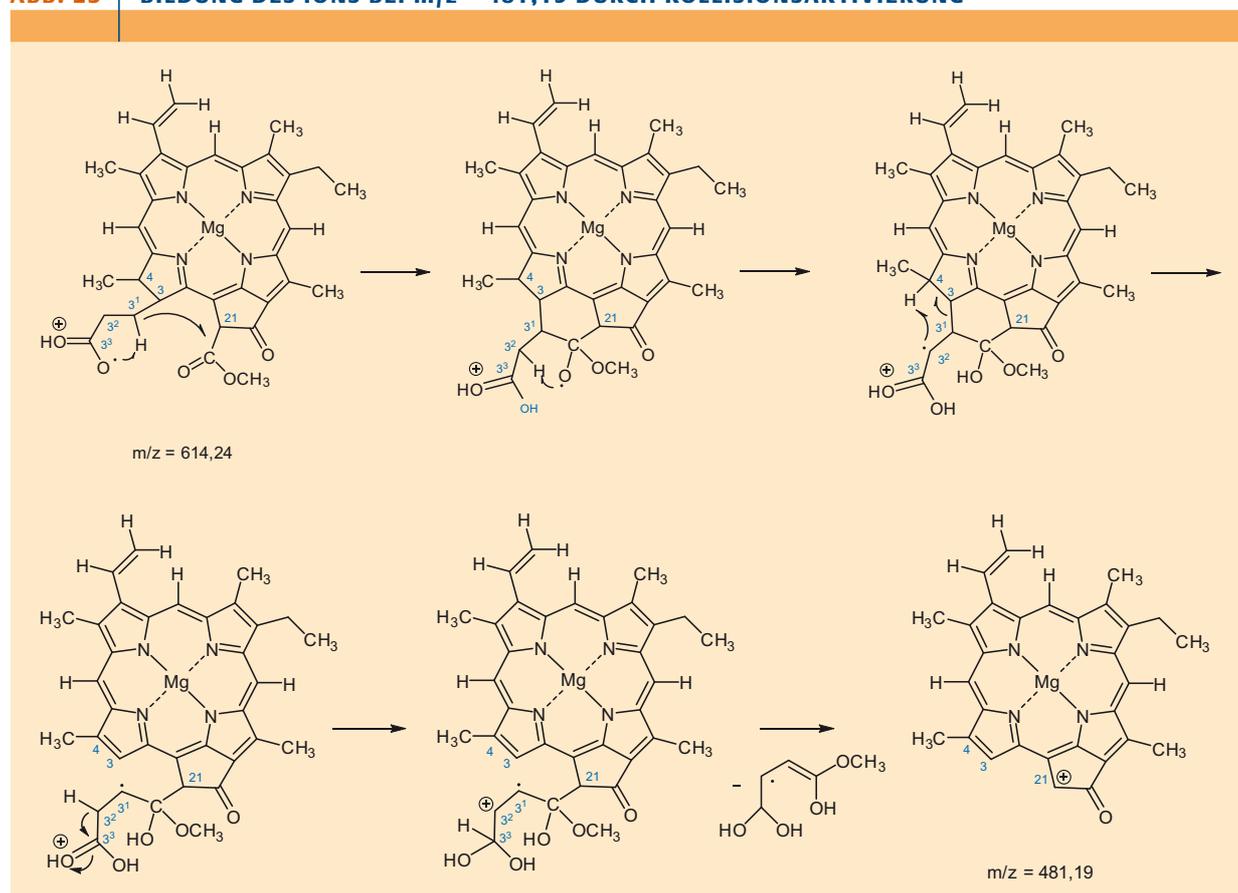
Die nicht unzersetzt verdampfbaren Chlorophylle waren früher eine große Herausforderung für massenspektrometrische Strukturuntersuchungen. Eingesetzt wurden die „In-Beam“-EI- und verschiedene Desorptionstechniken (^{252}Cf

Plasmadesorption, Feld-Desorption (FD), Fast-Atom-Bombardment (FAB), Laser-Desorption) Einen Überblick findet man in [25, 26]. Heute steht mit der Elektro-Spray-Methode ein Verfahren zur Verfügung, das sich vorzüglich zur Untersuchung von Chlorophyllen eignet. Dies sei stellvertretend für die Stoffklasse am Beispiel des Chlorophylls a gezeigt. HPLC-ESI MS/MS-Untersuchungen haben sich auch bei der Strukturaufklärung der herbstlichen Chlorophyll-Katabolite (Phyllobiline) bewährt [27].

Die ESI(+)-Messung mit einer $< 10^{-6}$ M Lösung von Chlorophyll a in Acetonitril zeigt das typische Isotopenmuster für das Moleküllion M^+ , wie der Vergleich mit der Computer-generierten Isotopenverteilung belegt (Abbildung 20 b). Die experimentelle exakte Masse von 892,5351 D stimmt mit dem theoretischen Wert für $^{12}\text{C}_{55}^{1}\text{H}_{72}^{14}\text{N}_4^{16}\text{O}_5^{24}\text{Mg}$ überein (892,5348). Mit geringerer Intensität wird zwischen $m/z = 1785$ und 1791 auch das Multipllett von M_2^{2+} detektiert, das dem Addukt aus ungeladenem und ionisiertem Chlorophyll a entspricht. Bei höherer Konzentration kann das M_2^{2+} -Ion an Intensität gewinnen und schließlich sogar das Spektrum dominieren.

Die Ionen-Bildung erfolgt also durch anodische Oxidation im ESI-Interface und nicht durch Protonierung. Wird die Chlorophyll a-Lösung mit 0,06 % Ameisensäure versetzt, so erfolgt eine Veränderung der relativen Intensitäten des

ABB. 23 BILDUNG DES IONS BEI $m/z = 481,19$ DURCH KOLLISIONSAKTIVIERUNG



Peakmasters. Die Intensitäten der Signale $m/z \geq 893,54$ nehmen relativ zur Intensität von $m/z = 892,54$ zu (Abbildung 20 c). Die Ursache ist die Bildung von $[M+H]^+$ -Ionen durch Protonierung von Chlorophyll a, die in Konkurrenz zur Bildung der M^+ -Ionen tritt und ein Peakmuster hervorbringt, in dem die Isotopenmuster von M^+ (Abbildung 20 b) und $[M+H]^+$ (Abbildung 20 d) überlagert sind. Bei der Messung, die zu Abbildung 20 c führte, entspricht das Verteilungsmuster einem Mischungsverhältnis $M^+:[M+H]^+ \approx 2:1$.

Die Messungen mit angesäuerten Lösungen von Chlorophyll a weisen eine weitere signifikante Veränderung im ESI-Massen-spektrum auf. Beginnend mit $m/z = 871,57$ erscheint ein weiteres Multiplett mit identischem Isotopenmuster wie das M^+ -Ion des Chlorophylls a. Es entsteht durch protolytische Verdrängung des Mg^{2+} -Ions durch zwei Protonen und Bildung des entsprechenden Quasi-Moleküls durch Protonierung in der ESI-Ionenquelle. In gealterten Chlorophyll-Proben wird das $[M-Mg+3H]^+$ -Ion auch ohne Ansäuern der Lösung detektiert.

Das MS/MS-Spektrum des M^+ -Ions von Chlorophyll a zeigt zunächst nur ein Fragment bei $m/z = 614,24$. Durch Heraufsetzen der Kollisionsenergie erscheint ein weiteres Bruchstück-Ion bei $m/z = 481,19$ (Abbildung 21).

Die aus den exakten Massen abgeleitete Zusammensetzung des bei der Bildung von $m/z = 614,24$ eliminierten Neutralteilchens entspricht $C_{20}H_{38}$ und somit dem Phytolrest minus einem H-Atom. Der zugrunde liegende Prozess lässt sich überzeugend mit der M^+ -Spezies A, in der Ladung und Radikal in der Esterfunktion 3^3 lokalisiert sind, beschreiben (Abbildung 22).

Die Massendifferenz zwischen $m/z = 614,24$ und dem bei höherer Stoßenergie zusätzlich auftretenden Bruchstück bei $m/z = 481,19$ hat die elementare Zusammensetzung $C_5H_9O_4$. Das entspricht der Summe aus dem an C-3 noch verbliebenen Substituenten, der Methoxycarbonylgruppe an C-21 und einem weiteren H-Atom aus dem Chlorophyll-Gerüst. Dieser Befund lässt ahnen, dass es nicht einfach sein wird, den Ablauf dieses Fragmentierungsprozesses zu rationalisieren. Eine Voraussetzung für die Abspaltung eines $C_5H_9O_4$ -Radikals ist die Knüpfung einer Bindung zwischen dem Rest an C-3 und der Methoxycarbonylgruppe an C-21.

Unser Vorschlag beginnt mit einer radikalischen Abstraktion eines H-Atoms an C-3¹. Das dabei an C-3¹ entstehende Radikalzentrum greift anschließend über einen sechsgliedrigen Übergangszustand die Carbonylgruppe des Substituenten an C-21 an. Dabei entsteht ein O-zentriertes Radikal, das ein H-Atom an C-3² ablöst. Das so gebildete Radikal abstrahiert dann ein H-Atom von C-4. Damit wäre eine weitere Randbedingung erfüllt, wonach im abzuspaltenden Teilchen ein H-Atom aus dem Chlorophyll-Gerüst enthalten sein muss. Mit der H-Wanderung ist die Spaltung der Bindung C-3-C-3¹ verbunden. Damit ist im Prinzip der $C_5H_9O_4$ -Rest aufgebaut. Seine Abspaltung kann nach einer 1,2-Hydridverschiebung unter Bildung einer ionisierten Doppelbindung zwischen C-3¹-C-3² und nachfolgender Ladungs-induzierter α -Spaltung bewirkt werden.

Fragen

- Welches Vitamin ist wie Chlorophyll a und b und die verschiedenen Häme eine lebenswichtige Komplexverbindung und welches Metallion ist dort das Zentralion?
- Welche Gemeinsamkeit und welchen prinzipiellen Unterschied gibt es zwischen kovalenter Bindung und koordinativer Bindung?
- Welche Triebkraft gibt es für die Fixierung des Mg^{2+} -Ions im Chlorophyll a und für die von Fe^{2+} im Häm b, das im Hämoglobin, Myoglobin und Cytochrom P450 vorkommt?
- Welche Klasse farbiger, synthetischer Pigmente hat eine dem Chlorophyll und den Häm-Arten verwandte Struktur und eine enorme Stabilität?
- Welche Farbrezeptoren hat das menschliche Auge? Von welcher Farbe können wir die meisten Nuancen unterscheiden?
- Warum müssen sich die Absorptionsspektren von Chl a und Chl b deutlich unterscheiden?
- In der Zuordnungstabelle der *supporting information* ist ersichtlich, dass die mit Hilfe von Chembiodraw[®] berechneten ¹³C-Daten sehr gut mit den experimentellen Daten übereinstimmen. Lediglich die rot gekennzeichneten Werte von C-5, C-2, C-15, C-16, C-11 und C-6 zeigen außergewöhnliche starke Abweichungen. Bieten Sie hierfür eine Erklärung an.
- Im Chlorophyll b wird die CH_3 -Gruppe C-13¹ durch eine Formylgruppe ersetzt. Im Protonenspektrum wird dadurch die Reihenfolge der Signale von H-16 und H-11 geändert. Warum?
- Berechnen Sie anhand der natürlichen Häufigkeiten der Kohlenstoff- und Magnesium-Isotope das Isotopenmuster für M^+ von Chlorophyll a. ¹²C (98,93%), ¹³C (1,07%), ²⁴Mg (78,99%), ²⁵Mg (10,0%), ²⁶Mg (11,01%)
- Um was für eine Reaktion handelt es sich bei der Ringöffnung des Cyclopentenon-Rings unter basischen Bedingungen?

Supporting information

Zu diesem Aufsatz haben wir unter www.chiuz.de zusätzliches Material bereitgestellt: Einfach den Artikel aufrufen und dort die supporting information öffnen. Das Material ist für Sie kostenfrei zugänglich. Dort finden Sie auch die Antworten auf die oben gestellten Fragen.

Zusammenfassung

Chlorophyll existiert seit ca. 3 Mrd. Jahren und steht mit am Beginn der Evolution. Dieser chirale, grüne Magnesium-Phorphyrin-Komplex absorbiert als Photosensibilisator in den Antennen der Lichtsammelkomplexe der Chloroplasten alle Anteile des sichtbaren Lichts außer Grün. Diese Energie wird an die Reaktionszentren der oxygenen Photosynthese weitergeleitet. In dieser Redoxreaktion entstehen aus Kohlendioxid und Wasser Kohlenhydrate und Sauerstoff. Wir beschreiben die Strukturaufklärung der Chlorophylle, diskutieren Struktur und Eigenschaften, ihre Verwandtschaft zum Häm des Blutes, Alltagsanwendungen und denken über Grünes in der Sprache

nach. Die Reinisolierung von Chlorophyll a aus Spinat ist eine experimentelle Herausforderung, die wir im Detail schildern. Alle analytischen Spektren werden vollständig entweder im Hauptteil oder in der supporting information wiedergegeben und interpretiert.

Summary

Chlorophyll exists since ca. 3 billion years and is at begin of the evolution. This chiral, green Mg-porphyrin-complex absorbs as a photosensitizer in the antennas of the light-harvesting complexes of chloroplasts all parts of visible light except of green light. This energy is transferred to the reaction centres of oxygenic photosynthesis. By this redox reaction carbon dioxide and water are transformed into carbohydrates and oxygen. We describe how the structures of chlorophylls were elucidated, discuss structure-property relations, the relationship to heme of blood, everyday uses, and how Green has influenced our language. The isolation of pure chlorophyll a from spinach is an experimental challenge, which we report in detail. All analytical spectra were recorded and are reproduced and interpreted either in the main part or in the supporting information.

Schlagwörter

Chlorophylle, Chlorophyll a, Chlorophyll b, Blattgrün, Naturstoffisolierung, Spektroskopie, *Ab-initio*-Berechnung, Spinat

Literatur

- [1] B. Grimm, R. Porra, W. Rüdiger, H. Scheer (Ed.) „Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications“, Band 25 der Reihe: Advances in Photosynthesis and Respiration, 1. Auflage, Springer Verlag, Dordrecht 2006, 37 Kapitel, 603 Seiten; „Chlorophylls“ H. Scheer (Ed.) CRC Press Boca Raton 1991.
- [2] P.J. Pelletier, J.B. Caventou „Sur la Matière verte des Feuilles“ *Annales de Chimie et de Physique*, 1818, 9, 194–196.
- [3] a) M. Tswett „Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls“ *Ber. Dtsch. Botan. Ges.* 1906, 24, 384–393; b) M. Tswett „Das sogenannte »kristallisierte Chlorophyll« - ein Gemisch“, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1910, 43, 3139–3141.
- [4] H. Fischer „Fortschritte der Chlorophyllchemie“ *Naturwissenschaften* 1940, 28, 401–405.
- [5] H. Brockmann jr. „Die absolute Konfiguration der Chlorophylle a und b“ *Liebigs Ann. Chem.* 1971, 754, 139–148.
- [6] R.B. Woodward, W.A. Ayer, J.M. Beaton, F. Bickelhaupt, R. Bonnett, P. Buchschacher, G.L. Closs, H. Dutler, H. Hannah, F.P. Hauck, S. Ito, A. Langemann, E. LeGoff, W. Leimgruber, W. Lwowski, J. Sauer, Z. Valenta, H. Voltz „The total synthesis of chlorophyll“ *J. Amer. Chem. Soc.* 1960, 82, 3800–3802.
- [7] P. H. Hynninen, M. Wasiewleski, J. J. Katz „Chlorophylls VI. Epimerization and Enolization of Chlorophyll a and its Magnesium free derivatives“ *Acta Chem. Scand.* 1979, B33, 637–648.
- [8] J. Lutowski, H. Speichert „Die Brennessel in Heilkunde und Ernährung“ *Pharm. Unserer Zeit* 1983, 12, 181–186.
- [9] Y. Ito, M. Weinstein, I. Aoki, R. Harada, E. Kimura, K. Nunogaki „Coil Planet Centrifuge“ *Nature* 1966, 212, 985.
- [10] A. P. Foucault, „Centrifugal Partition Chromatography“ Marcel Dekker Inc., New York, 1995.
- [11] G. F. Pauli, S. M. Pro, J. B. Friesen „Countercurrent Separation of Natural Products“ *J. Nat. Prod.* 2008, 71, 1489–1508.
- [12] J. B. Friesen, J. B. McAlpine, S.-N. Chen, G. F. Pauli, Countercurrent Separation of 598 Natural Products: An Update, *J. Nat. Prod.* 2015, 78, 1765–1796.
- [13] A. P. Foucault, L. Chevolut, „Counter-current chromatography: Instrumentation, Solvent Selection and Some Recent Applications to Natural Product Purification“, *J. Chromatogr A*, 1998, 808, 3–22.
- [14] A. Berthod, T. Maryutina, B. Spivakov, O. Shpigun, I. A. Sutherland, „Countercurrent chromatography in analytical chemistry“ *Pure App. Chem.* 2009, 81, 355–387.
- [15] H. Scheer „Structure and Occurrence of Chlorophylls“ in „Chlorophylls“ H. Scheer (Ed.) CRC Press Boca Raton 1991, 3–30.
- [16] A. J. Hoff, J. Amesz „Visible Absorption Spectroscopy of Chlorophylls“ in „Chlorophylls“ H. Scheer (Ed.) CRC Press Boca Raton 1991, 723–738.
- [17] C. Houssier K. Sauer „Circular Dichroism and Magnetic Circular Dichroism of the Chlorophyll and Protochlorophyll Pigments“ *J. Amer. Chem. Soc.* 1970 92, 779–791.
- [18] C. Jubert, G. Bailey „Isolation of chlorophylls a and b from spinach by counter-current chromatography“ *J. Chromatography A*, 2007, 1140, 95–100.
- [19] R. J. Abraham, A. E. Rowan „NMR Spectroscopy of Chlorophyll“ in „Chlorophylls“ H. Scheer (Ed.) CRC Press Boca Raton 1991, 797–834.
- [20] S. Lötjönen, T. J. Michalski, J. R. Norris, P. H. Hynninen „High-Field Proton NMR Study of the Liquid Solution Structure of Monomeric Bacteriochlorophyll a and Chlorophyll a“ *Mag. Reson. Chem.* 1987, 25, 670–674.
- [21] S. Lötjönen, P. H. Hynninen „Complete Assignment of the Carbon-13 NMR Spectrum of Chlorophyll a“ *Org. Mag. Reson.* 1981, 16, 304–308.
- [22] S. Lötjönen, P. H. Hynninen „Carbon-13 NMR Spectra of Chlorophyll a, Chlorophyll a', Pyrochlorophyll a and the Corresponding Pheophytins“ *Org. Mag. Reson.* 1983, 21, 757–765.
- [23] N. Risch, H. Brockmann „Chlorophyll 6. Totalzuordnung des ¹³C-NMR-Spektrums“ *Tetrahedron Lett.*, 1983, 24, 173–176.
- [24] S. G. Boxer, G. L. Closs, J. J. Katz, „The Effect of Magnesium Coordination on the ¹³C and ¹⁵N Magnetic Resonance Spectra of Chlorophyll a. The Relative Energies of Nitrogen nπ* States as Deduced from a Complete Assignment of Chemical Shifts“ *J. Amer. Chem. Soc.* 1974, 96, 7058–7066.
- [25] J. E. Hunt, T. J. Michalski „Desorption-Ionization Mass Spectrometry of Chlorophylls“ in „Chlorophylls“ H. Scheer (Ed.) CRC Press Boca Raton 1991, 835–853.
- [26] M. J. Dale, K. F. Costello, A. C. Jones and P. R. R. Lan gridge-Smith „Investigation of Porphyrins and Metalloporphyrins Using Two-step Laser Mass Spectrometry“ *J. Mass Spectrometry*, 1996, 31, 590–601.
- [27] T. Müller, S. Vergeiner, B. Krätzler „Structure elucidation of chlorophyll catabolites (phyllobilins) by ESI-mass spectrometry – Pseudomolecular ions and fragmentation analysis of a nonfluorescent chlorophyll catabolite (NCC)“ *Int. J. Mass Spectr.* 2014, 365–366, 48–55.

Die Autoren

H.-U. Siehl, K.-P. Zeller und S. Berger studierten in den 1960er Jahren zusammen Chemie an der Universität Tübingen. Alle drei verbrachten Post-Doc-Jahre im Ausland und sind heute an den Universitäten Ulm, Tübingen und Leipzig tätig. D. Sicker studierte Chemie in Leipzig und ist hier apl. Professor für Organische Chemie, sein besonderes Interesse gilt den Naturstoffen. M. Minceva ist Professorin am Center of Life and Food Sciences Weihenstephan der Technischen Universität München. M. Najdanova und A. Klapproth haben zusammen mit vier weiteren in der supporting information erwähnten Studierenden um reines Chlorophyll gekämpft.

Korrespondenzautor

Prof. Dr. Stefan Berger
Denkmalsblick 14
04277 Leipzig
E-Mail: stberger@rz.uni-leipzig.de