

## 94. Bakteriochlorophyll $a_{Gg}$ und Bakteriophäophytin $a_P$ in den photosynthetischen Reaktionszentren von *Rhodospirillum rubrum* $G-9^+$

von Erhard Walter<sup>1)</sup>), Jakob Schreiber, Engelbert Zass und Albert Eschenmoser

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule,  
Universitätstrasse 16, CH-8092 Zürich

Edgardo Giovannini zum 70. Geburtstag gewidmet

(31.I.79)

---

### Bacteriochlorophyll $a_{Gg}$ and Bacteriopheophytin $a_P$ in Photosynthetic Reaction Centers from *Rhodospirillum rubrum* $G-9^+$

#### Summary

In photosynthetically active reaction centers from *Rhodospirillum rubrum*  $G-9^+$ , the magnesium complex bacteriochlorophyll  $a$  contains geranylgeraniol as the alcohol component, while the metal-free bacteriopheophytin  $a$  contains phytol instead. These pigments bacteriochlorophyll  $a_{Gg}$  (4) and bacteriopheophytin  $a_P$  (1) were isolated from reaction center preparations in a ratio of 2:1 and (after demetalation of 4) identified as bacteriopheophytin  $a_{Gg}$  (2) and  $a_P$  (1) by comparison with authentic samples (UV./VIS., CD. and mass spectra as well as mixed HPLC.).

---

Untersuchungen der Chlorophyll-Pigmente in Photosynthese-Reaktionszentren ( $\equiv$  'Set of molecules that can effect the photochemical transfer of one electron' [2]) aus *Rhodopseudomonas sphäroides* und *Rhodospirillum rubrum* ergaben einen Gehalt von vier Bakteriochlorophyllen  $a$  und zwei Bakteriophäophytinen  $a$  pro Reaktionszentrum [3–5a] [6]<sup>3)</sup>. Die Identifizierung dieser Pigmente erfolgte bisher lediglich durch UV./VIS.-spektroskopischen [3] [4] [8a] [9] und dünnschichtchromatographischen [3] [5] [9] Vergleich<sup>4)</sup>. In Anbetracht der Bedeutung der Reaktionszentren für die bakterielle Photosynthese scheint diese Charakterisierung unzureichend, und eine Ergänzung durch weitere analytische Kriterien ist wünschenswert. Wir haben diese Aufgabe im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen über C(13<sup>1</sup>)-enolisierte Chlorophyllderivate [10] durchgeführt und uns um eine möglichst exakte Charakterisierung der Reaktionszentren-Pigmente bemüht. Dazu

<sup>1)</sup> Das hier beschriebene Material stammt aus der Promotionsarbeit von E. Walter [1].

<sup>2)</sup> Derzeitige Anschrift: Kantonales Laboratorium, Muesmattstrasse 19, 3012 Bern.

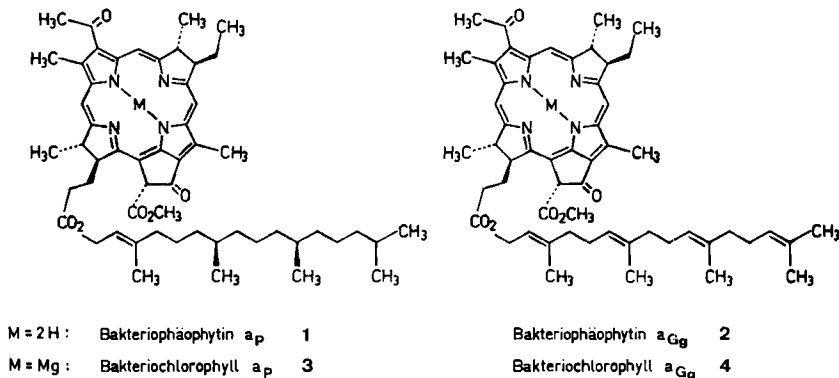
<sup>3)</sup> Die Hauptmenge des Chlorophylls in photosynthetischen Bakterien (z.B. 86% in *Rhodospirillum rubrum* [7e]) dient als «Antenne», d.h. hat ausschliesslich Lichtsammelfunktion; für Literatur über Reaktionszentren s. [7].

<sup>4)</sup> Für eine detaillierte Diskussion der bisherigen Analysen von Pigmenten aus Reaktionszentren s. [1], S. 41–44 und 250–255.

bedienten wir uns vor allem der bisher für dieses Problem nicht eingesetzten Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC.) als Trenn- und Charakterisierungsmethode<sup>5)</sup>. Die verwendeten Säulen hatten theoretische Bodenzahlen im Bereich von 5000–17 000, die Kapazitätsfaktoren der Trennsysteme wurden auf Werte zwischen 1 und 4 eingestellt. Solche Systeme erlaubten mit Leichtigkeit eine Trennung von Bakteriophäophytinen a, die sich nur in der Alkoholkomponente (Phytol oder Geranylgeraniol) unterscheiden.

Im Jahr 1972 fanden Katz *et al.* [18] und Brockmann *et al.* [19] sowie später Pfennig *et al.* [20] in Chlorophyll aus *Rhodospirillum rubrum* erstmals (*E, E*)-Geranylgeraniol als Alkoholkomponente statt des im Bakteriochlorophyll a der meisten anderen *Athiorhodaceae* (*Rhodospirillaceae*) [20a], *Thiorhodaceae* (*Chromatiaceae*) [20b] und *Chlorobiaceae* [20b] sowie in den Chlorophyllen a und b der grünen Pflanzen vorkommenden Phytols. Aus verschiedenen Stämmen von *Rhodospirillum rubrum* [19] [20a] wurden nach Extraktion ganzer Bakterien (d. h. Antenne plus Reaktionszentren) und anschliessender «Phäophyтинisierung»<sup>6)</sup> Gemische von geranylgeraniol- und phytol-haltigen Phäophytinen isoliert und daraus auf das Vorkommen von Bakteriochlorophyll a<sub>Gg</sub> (4) und Bakteriochlorophyll a<sub>P</sub> (3) (vgl. Schema 1) in diesen Bakterien geschlossen. Wir haben nun für *Rhodospirillum rubrum* G-9<sup>+</sup> gefunden, dass Phytol nicht in der Antenne, sondern in den Reaktionszentren vorkommt<sup>7)</sup>, und zwar findet es sich dort nicht im Bakteriochlorophyll a, sondern ausschliesslich im Bakteriophäophytin a, während das Bakteriochlorophyll a der Reaktionszentren nur Geranylgeraniol enthält.

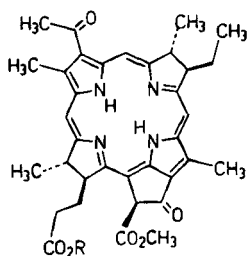
Schema 1



- <sup>5)</sup> Über ganz kürzlich erschienene Arbeiten zur HPLC. von Chlorophyll-Derivaten vgl. [11] (mit Phytol, Tetrahydro- bzw. Dihydro-geranylgeraniol und Geranylgeraniol veresterte Phäophytine a), [12] (Bakteriochlorophylle c, 14 Komponenten, u. a. mit Phytol, Farnesol und Geranylgeraniol verestert), [13] (chlorophyll-a,b-haltige Extrakte), [14] (Methylbakteriophäophorbide und mit anderen Alkoholen als Farnesol veresterte Bakteriochlorophylle e), [15] [16] (Phäophytine a und b), [15] [17] (Chlorophylle a und b).
- <sup>6)</sup> «Phäophyтинisierung» = Dekomplexierung der Chlorophylle zu den magnesiumfreien Phäophytinen durch Behandlung mit Säure.
- <sup>7)</sup> Die Frage nach dem unterschiedlichen Vorkommen der Alkohole im Chlorophyll der Reaktionszentren bzw. der Antenne wurde bereits von Katz *et al.* [18] und Gloe & Pfennig [20] aufgeworfen, aber bisher experimentell nicht beantwortet.

**Referenzsubstanzen.** - Zur Gewinnung von Bakteriophäophytin  $a_p$  (**1**) zu Vergleichszwecken wurden die Pigmente aus ganzen Zellen von *Rhodospseudomonas sphäroides* R-26<sup>8)</sup> mit Methanol bzw. Aceton extrahiert [21a] und mit 0,5 N Salzsäure dekomplexiert. Gereinigt wurde **1** durch Digerieren mit Pentan und Methanol (Entfernen farbloser Verunreinigungen) und zweimaliges Umfällen aus Aceton/Methanol [22]. Die Gewinnung von Bakteriophäophytin  $a_{Gg}$  (**2**) war schwieriger, da die «Phäophytinisierung» des Methanolextraktes aus *Rhodospirillum rubrum* G-9<sup>+9)</sup> ein präparativ nicht befriedigend zu trennendes Gemisch aus **2** und **1** im Verhältnis 95:5 (HPLC.<sup>10)</sup><sup>11)</sup>) lieferte. Aus dem Eindampfrückstand des nicht «phäophytinisierten» Extrakts konnte aber das gut methanol-lösliche Bakteriophäophytin  $a_{Gg}$  (**4**) durch mehrfaches Digerieren mit Methanol und anschliessender Säulenchromatographie an Kieselgel vom Bakteriophäophytin **a** (in Methanol schlecht löslich) getrennt werden. Dekomplexierung der Chlorophyll-Fractionen und Umfällen aus Methylenchlorid/Methanol bzw. Aceton/Methanol gab Bakteriophäophytin  $a_{Gg}$  (**2**), das mit weniger als 0,2%<sup>11)</sup> **1** verunreinigt war. Die Struktur der beiden Phäophytine, insbesondere ihre unterschiedliche Alkoholkomponente Phytol bzw. Geranylgeraniol bei sonst identischem Chromophor, folgte aus den spektroskopischen Daten: Die CD-, UV./VIS.- (geringe Abweichungen nur im Bereich unterhalb 250 nm) und IR.-Spektren (Abweichungen um 3000 cm<sup>-1</sup>) von **1** und **2** sind sich untereinander und den publizierten Daten für Bakteriophäophytin **a** (bisher meist ohne exakte Bestimmung der Alkoholkomponente) [21b] [22-24]

Schema 2



- <sup>8)</sup> Carotinoidfreie, blaugrüne Mutante R-26, die ausgehend von einer von Prof. R. K. Clayton (Cornell University, Ithaca, N.Y.) stammenden Stickskultur *Rhodospseudomonas sphäroides* 2.4.1/R-26 im Institut für Pflanzenbiologie der Universität Zürich (Prof. R. Bachofen) von Dr. K. Hanselmann gezüchtet wurde; vgl. [1], S. 82.
- <sup>9)</sup> Diese von Dr. K. Hanselmann im Institut für Pflanzenbiologie der Universität Zürich (Prof. R. Bachofen) gezüchtete, schnell wachsende, anspruchslose Spezies, die mit G-9<sup>+</sup> bezeichnet wurde, stammt aus einer von Frau Dr. G. Cohen-Bazire (Institut Pasteur, Paris) aufgezogenen Kultur der carotinoidfreien Mutante *Rhodospirillum rubrum* G-9; vgl. [1], S. 115-116.
- <sup>10)</sup> Die HPLC. erlaubt eine wesentlich bessere Trennung und einen viel empfindlicheren Nachweis von **1** und **2** als die bis anhin verwendete Dünnschichtchromatographie auf AgNO<sub>3</sub>-imprägniertem Kieselgel [20].
- <sup>11)</sup> Prozentangaben und Verhältnisse auf die Pikfläche des Hauptprodukts im HPLC. bezogen.

bzw. Methyl-bakteriophäophorbid a [15a] [25] sehr ähnlich<sup>12)</sup>. In den <sup>1</sup>H- bzw. <sup>13</sup>C-NMR.- und Massenspektren zeigte sich dagegen eindeutig die unterschiedliche Alkoholkomponente (Einzelheiten im exper. Teil<sup>13)</sup>). Auffallend war auch die deutlich unterschiedliche Stabilität unserer Phäophytinproben: Während der Phytylester **1** problemlos lagerbar war, traten bei der Aufbewahrung von **2** bei –25° unter Argon im Dunkeln schon nach wenigen Tagen im Dünnschichtchromatogramm (DC.) und HPLC. nachweisbare Folgeprodukte von **2** auf (z.B. nach 7 Tagen 1–2%). Eine geringere Stabilität von **2** kann durch Oxydation (Luftkontakt bei Probeentnahme im Tageslicht, vgl. exper. Teil 2.4) der drei zusätzlichen Doppelbindungen des Geranylgeranyl-Rests bedingt sein.

Im HPLC. der gereinigten Referenz-Phäophytine **1** und **2** traten zusätzliche, schwache Signale auf (ca. 0,5%<sup>11)</sup> bei **1**, ca. 0,2%<sup>11)</sup> bei **2**), die den (<sup>13</sup>S)-Epimeren **1'** bzw. **2'** zuzuordnen sind (Schema 2)<sup>14)</sup>. Gezielte Epimerisierung von **1** und **2** in Benzol/Triäthylamin 9:1 während 15 Minuten führte zu Gleichgewichtsgemischen **1/1'** bzw. **2/2'** (Epimerenverhältnis 5:1), die mittels HPLC. getrennt wurden. Die Identität der Hauptkomponenten dieser Gemische mit den «natürlichen» Bakteriophäophytinen **a<sub>p</sub>** (**1**) bzw. **a<sub>Gg</sub>** (**2**) der Konfiguration (<sup>13</sup>R) wurde durch Mischchromatogramme mit Referenzmaterial bewiesen. Die (<sup>13</sup>S)-Epimeren **1'** und **2'** unterschieden sich im UV./VIS.-Spektrum nur geringfügig von **1** bzw. **2** (z.B. durch eine um ca. 6% herabgesetzte Extinktion des längstwelligsten Maximums)<sup>15)</sup>, wobei **1'** und **2'** praktisch identische Spektren aufwiesen. Ihre CD.-Spektren waren jedoch erwartungsgemäss [30] deutlich von denen von **1** bzw. **2** verschieden. Die (S)-Epimeren **1'** und **2'** konnten zum gleichen wie aus **1** bzw. **2** erhaltenen Gemisch zurückepimerisiert werden.

**Reaktionszentren.** – Für unsere Untersuchungen standen Lösungen von Reaktionszentren (RC.) zur Verfügung, die von Dr. M. Snozzi (Institut für Pflanzenbiologie, Universität Zürich) nach einer in Anlehnung an publizierte Verfahren [34] entwickelten Methode aus Chromatophoren von *Rhodospirillum rubrum* G-9<sup>+9)</sup>

<sup>12)</sup> Zum Vergleich des CD.-Spektrums dienten Daten von Methyl-bakteriophäophorbid a [23]. Abweichungen, vor allem bei 535 und 523 nm (vgl. die Diskussion in [1], S.93–96), sind durch einen Gehalt von 10–15% <sup>13</sup>S-Epimer in der Literaturprobe erklärbar, jenes Material war aus Bakteriophäophytin hergestellt worden [23], das laut <sup>1</sup>H-NMR. (vgl. Fussnote 13) noch <sup>13</sup>S-Epimer enthalten hatte und dessen Extinktionskoeffizienten (UV./VIS. in Dioxan [23]) um ca. 25% kleiner waren als die früher gefundenen [22].

<sup>13)</sup> <sup>1</sup>H-NMR.-Spektren von **1** und **2** sind in [23] beschrieben (Verbindung **2** dort irrtümlich als Farnesylester bezeichnet, vgl. Korrektur in [19]). Beide Literaturproben zeigten in unseren Spektren nicht vorhandene Signale des jeweiligen <sup>13</sup>S-Epimeren; im Literaturspektrum von **2** traten zusätzliche Signale u.a. bei 0,8, 1,3 und 5,5 ppm auf (Verunreinigung?) [23]. Unsere Strukturzuordnung von **1** und **2** wurde durch Vergleich mit den <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR.-Daten von Methyl-bakteriophäophorbid a [15a] [21b] [23] [25], Phytol [23] [26] und Geranylgeraniol [18] [23] erhärtet.

<sup>14)</sup> Die von *Strain & Manning* [27] erstmals isolierten Chlorophyll-Isomeren **a'** und **b'** wurden (wie auch das entsprechende Bakteriochlorophyll **a'**) von *Katz* [28] aufgrund von <sup>1</sup>H-NMR.-Spektren als <sup>13</sup>S-Epimere (mit (S)- statt der «natürlichen» [29] (R)-Konfiguration) erkannt. ORD.- und CD.-Spektren bestätigten diese Zuordnung [30]; zur Widerlegung einer abweichenden Annahme von *Hynninen* [31] vgl. [10a] [32].

<sup>15)</sup> Die UV./VIS.-Spektren von Chlorophyll **a** und **a'** bzw. Chlorophyll **b** und **b'** sind als praktisch identisch beschrieben [33].

isoliert wurden<sup>16)</sup>. Die RC. wurden durch UV./VIS./NIR.-Spektren im Dunkeln, während gleichzeitiger Seitenbelichtung (ausgebleicht) und nach chemischer Oxydation mit Hexacyanoferrat(III) charakterisiert (vgl. exper. Teil und weitere Einzelheiten in [1], S. 33–40 und 144–166). Das zu 97% reversible Ausbleichen der Bande bei 870 nm (d.h. die reversible Photooxydation des lichtaktiven Pigment-Protein-Komplexes *P870* [7d] als definierender Test für RC. [36]) zeigte, dass die Präparationen frei von (nicht reversibel ausbleichbarem) Bakteriochlorophyll-Protein-Komplex *B870* [7f] waren. Die relativen Extinktionen bei 773 nm von unbehandelten gegenüber reversibel ausgebleichten RC.-Lösungen wiesen darauf hin, dass in ihnen noch wenig (irreversibel ausbleichendes [34a]) «nicht proteingebundenes» Bakteriochlorophyll a ( $\lambda_{\text{max}}$  um 770 nm) enthalten war. Die zur Absicherung der qualitativen Analysen durchgeführten quantitativen Bestimmungen der Pigmente in den RC.-Lösungen ergaben 3,9–4,2 Bakteriochlorophyll und ca. 1,9 Bakteriophäophytin pro RC. (für Einzelheiten s. [1], S. 46–47 und 237–239 und [35a] [35c]) und stimmten recht gut mit den publizierten Werten für RC. aus *Rh. rubrum* (Wildtyp) [4], *Rhodopseudomonas sphäroides* Y [6c] bzw. *Rh. sphäroides* R-26 [5a] überein. Es wurden insgesamt sechs Pigmentanalysen mit vier RC.-Präparationen aus vier verschiedenen Züchtungen durchgeführt [1]; die Ergebnisse stimmten mit der hier im exper. Teil beschriebenen Analyse überein.

**Identifizierung der Pigmente.** – Zur möglichst verlustfreien Isolierung der *unveränderten* RC.-Pigmente wurde nach einer Reihe von Vorversuchen (s. [1], S. 167–170) die Extraktion der Pigmente in reduziertem Zustand [8] der RC. mit Methanol/Aceton [3] gewählt, die Pigmentaushöhen von 90–95% im Rohextrakt lieferte<sup>17)</sup>. Das DC. des Rohextrakts zeigte auf Kieselgel z. B. mit Laufmittel Methylenchlorid/Acetonitril 4:1 als Hauptprodukte einen blauen Fleck (Bakteriochlorophyll a, *Rf* ca. 0,4) und einen roten Fleck (Bakteriophäophytin a, *Rf* ca. 0,8) sowie einen gelben, zwei grüne und zwei blaue Nebenproduktflecken<sup>18)</sup>. Das VIS.-spektroskopisch abgeschätzte Verhältnis Bakteriochlorophyll/Bakteriophäophytin im Rohextrakt (vgl. Fig. 9 im exper. Teil) war ca. 2,4 (Mittelwert aus sechs verschiedenen Extrakten<sup>19)</sup>). Die beiden Pigmente wurden durch präparative DC. auf Kieselgel getrennt. Die Bakteriophäophytin-Fraktion (Ausbeute 54%<sup>17)</sup>) zeigte im HPLC. ausser dem Hauptsignal (relative Pikfläche 96,5) schwächere Pike vom 13<sup>2</sup>-Epimer **1'** (0,9), Bakteriophäophytin a<sub>Gg</sub> (**2**<sup>20)</sup>; 2,3) und einer Verunreinigung (0,3) (s. Fig. 10 im exper. Teil). Nach präparativer HPLC. (Ausbeute 41%<sup>17)</sup>) zur

<sup>16)</sup> Für eine detailliertere Beschreibung der RC.-Präparation vgl. [35b] [35c].

<sup>17)</sup> Die Ausbeuten wurden UV./VIS.-spektroskopisch bestimmt und beziehen sich beim RC.-Rohextrakt auf die Pigmentmenge in den RC.-Lösungen, bei der Trennung und Reinigung auf die Pigmentmenge im RC.-Rohextrakt (zur Bestimmungsmethode vgl. Fussnoten 52 bzw. 37).

<sup>18)</sup> Farblose, im DC. mit Jod sichtbare Komponenten dieser RC.-Präparationen (Lipide, Ubichinon [35c]) werden hier nicht diskutiert; sonst in RC. gefundene Carotinoide [6c] [37] kommen in *Rh. rubrum* G-9<sup>+</sup> im Gegensatz zu Wildtypen dieser Bakterien [4] [6c] nicht vor.

<sup>19)</sup> Die Pigmentbestimmung im Rohextrakt erfolgte unter der Annahme, dass die Absorptionen bei 577 und 526 nm nur von den beiden Pigmenten stammen; benützte Werte für Bakteriochlorophyll a:  $\epsilon$  (525 nm) = 2500,  $\epsilon$  (577 nm) = 20400 [38a], für Bakteriophäophytin a:  $\epsilon$  (525 nm) = 28200,  $\epsilon$  (577 nm) = 1100 (vgl. dazu [1], S. 171 und [5a]).

<sup>20)</sup> Durch Vergleich der HPLC.-Retentionszeiten mit denen von Referenzmaterial **1** bzw. **2** unter gleichen Bedingungen identifiziert.

Abtrennung der genannten Begleitverbindungen wurde die Hauptkomponente durch Misch-HPLC. (vgl. *Fig. 11* im exper. Teil und Fussnote 55) und Vergleich der UV./VIS.-, CD.- und Massenspektren mit Referenzmaterial als Bakteriophäophytin  $a_p$  (**1**) identifiziert. Die Bakteriochlorophyll-Fraktion aus oben erwähnter DC.-Trennung (Ausbeute 45%<sup>17</sup>) wies ein mit Referenz-Bakteriochlorophyll *a* [38] übereinstimmendes UV./VIS.-Spektrum auf (s. *Fig. 12* im exper. Teil) und zeigte nach «Phäophyтинisierung» (39%<sup>17</sup>) im HPLC. (s. *Fig. 13* im exper. Teil) der Reihe nach die Signale von Bakteriophäophytin  $a_p$  (**1**<sup>20</sup>); relative Pikfläche 0,3), des 13<sup>2</sup>-Epimers **2'** (8,0), der Hauptkomponente (71,7) und von einem polaren Oxydationsprodukt (20,0; s. unten). Das mittels präparativer HPLC. (Ausbeute 16%<sup>17</sup>) rein abgetrennte Hauptprodukt wurde durch Misch-HPLC. (vgl. *Fig. 14* im exper. Teil und Fussnote 55) und Vergleich der UV./VIS.-, CD.- und Massenspektren mit dem entsprechenden Referenz-Phäophytin als Bakteriophäophytin  $a_{Gg}$  (**2**)<sup>21</sup>) identifiziert.

Da das Ziel unserer Untersuchung die Charakterisierung der RC.-Hauptpigmente Bakteriochlorophyll *a* bzw. Bakteriophäophytin *a* und nicht eine vollständige Analyse der porphinoïden RC.-Bestandteile war (vgl. auch Fussnote 18), sind unsere Kenntnisse über die Natur der beobachteten Nebenkomponenten unvollständig. Charakteristisch für diese Nebenprodukte war ihr schwankender Anteil in den Pigmentanalysen; ihr natürliches Vorkommen als RC.-Bestandteile ist deshalb eher unwahrscheinlich. Die beiden zu **1** und **2** epimeren Bakteriophäophytine  $a'_p$  (**1'**) bzw.  $a'_{Gg}$  (**2'**) fanden sich in meist kleinen, jedoch stark schwankenden Mengen (0,2–3,5% für **1'**, 0,5–8% für **2'**<sup>11</sup>); in drei Fällen ergaben sogar verschiedene HPLC.-Untersuchungen der gleichen Probe verschiedene Werte (s. [1], S. 188, 193 und 198). Diese beiden Epi-Bakteriophäophytine wurden vermutlich bei der Manipulation der Pigmente gebildet (zu deren sehr leicht erfolgenden Epimerisierung vgl. oben). Analoges gilt für verschiedene grüne Oxydationsprodukte, die nicht bei allen Analysen auftraten (vgl. Fussnoten 54 und 56). Das im DC. der RC.-Rohextrakte und der Bakteriochlorophyll-Fraktionen beobachtete polare blaue Nebenprodukt<sup>22</sup>) und die im HPLC. der «phäophyтинisierten» Bakteriochlorophyll-Fraktionen gefundene polare Nebenkomponente sind sehr wahrscheinlich Oxydationsprodukte des Bakteriochlorophylls (möglicherweise an C(13<sup>2</sup>) oxydierte sogenannte «Allomere» [21c]), deren Menge von der Lagerungsdauer der RC.-Präparationen und der Arbeitstechnik abhängig war. So fanden wir in einem orientierenden Vorversuch infolge offensichtlich ungenügendem Sauerstoffausschluss gar kein Bakteriochlorophyll, sondern nur polare Oxydationsprodukte. Der aus dem DC. abgeschätzte Gehalt an Oxydationsprodukt (bezogen auf den jeweiligen Totalgehalt an Pigmenten) betrug bei drei verschiedenen RC.-Rohextrakten ca. 10, 50 bzw. 5%; der entsprechende Gehalt in den nach DC.-Abtrennung «phäophyтинisierten» Bakteriochlorophyll-Fraktionen war 6, 7 bzw. 20% (HPLC.). Die z.B. bei der im Detail beschriebenen Analyse aufgetretenen 20% (HPLC.) Oxydationsprodukt in der «phäophyтинisierten» Bakteriochlorophyll-Fraktion gegenüber nur ca. 0,3% (HPLC.) im Bakteriophäophytin sind im Hinblick auf die bekannte Labilität des Bakteriochlorophylls und die durchgeführten Operationen (präparative DC. auf Kieselgel!) nicht ungewöhnlich.

Zum Vergleich mit den RC.-Pigmenten wurden auch die Pigmente ganzer Bakterienzellen untersucht. Die DC.-Trennung des Extrakts aus ganzen *Rhodospirillum rubrum* G-9<sup>+</sup> lieferte ein Bakteriochlorophyll *a*, das laut HPLC. nach «Phäophyтинisierung» nur Geranylgeraniol und kein Phytol enthielt (Nachweisgrenze ca. 0,1%). Die Phäophytin-Fraktion bestand aus Bakteriophäophytin  $a_{Gg}$  (**2**) und

<sup>21</sup>) Die von Katz *et al* [2] bestimmte (*E,E*)-Konfiguration des Geranylgeraniols von *2 ex Rhodospirillum rubrum* (<sup>1</sup>H-NMR., MS.-Vergleich mit authentischem Alkohol nach Hydrolyse von **2**) wurde hier nicht überprüft.

<sup>22</sup>) Ein blaues, in seinem Rf-Wert mit unserem vergleichbares Nebenprodukt fanden auch andere Autoren [9], seine (scheinbare) Abwesenheit in einer weiteren Pigmentanalyse [3] liegt vermutlich an der zu schlechten Auflösung des dort verwendeten DC.-Systems.

Tabelle. *Alkoholkomponenten der Pigmente aus Rh. rubrum G-9<sup>+</sup>*

	Geranyl- geraniol <sup>a)</sup>	Phytol <sup>a)</sup>
<b>Reaktionszentren</b>		
Bakteriochlorophyll-Fraktion <sup>b)</sup>	> 250	: 1
Bakteriophäophytin-Fraktion	1	: > 40
<b>Ganze Bakterien</b>	19	: 1
Bakteriochlorophyll-Fraktion <sup>c)</sup>	> 500	: 1
Bakteriophäophytin-Fraktion	1	: 9

a) Relative Pikflächen im HPLC. der Phäophytin-a<sub>Gg</sub>/a<sub>P</sub>-Gemische.  
b) Bakteriochlorophyll-Fraktion nach DC.-Trennung, «phäophytinisiert»; Alkoholkomponenten des oxydierten (allomerisierten ?) Anteils nicht untersucht (s. exper. Teil 2.2–2.4).  
c) Nach DC.-Trennung des Rohextrakts und «Phäophytinisierung» der Bakteriochlorophyll-Fraktion; s. exper. Teil 1.2.

a<sub>P</sub> (1) im Verhältnis 1:9<sup>11)</sup>. Nach direkter «Phäophytinisierung» ohne vorhergehende DC.-Trennung betrug a<sub>Gg</sub>/a<sub>P</sub> im Rohextrakt 19:1<sup>11)</sup> (vgl. Tab.).

**Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse.** – Das aus Reaktionszentren von *Rhodospirillum rubrum* G-9<sup>+</sup> isolierte Bakteriochlorophyll a 4 enthält zu über 99,6% Geranylgeraniol<sup>21)</sup> als Alkoholkomponente, während das Bakteriophäophytin a 1 der RC. zu mindestens 98% mit Phytol verestert ist. Das mol-Verhältnis 4 zu 1 beträgt ca. 2:1.

Aufgrund der jeweils nach «Phäophytinisierung» der Bakteriochlorophyll-a-Fraktion gefundenen Mengen an Bakteriophäophytin a<sub>P</sub> (1) können höchstens ca. 0,3 bzw. ca. 0,2% (bezüglich des Gehalts an a<sub>Gg</sub>)<sup>11)</sup> Bakteriochlorophyll a<sub>P</sub> (3) in RC. bzw. ganzen Bakterien vorkommen. Es ist aber möglich, dass diese geringen Mengen von 1 nicht aus 3 stammen, sondern bei der DC.-Trennung des RC.-Rohextrakts verschleppt wurden, d.h., dass überhaupt kein Bakteriochlorophyll a<sub>P</sub> (3) auftritt. In der Phäophytin-Fraktion aus RC. und ganzen Bakterien wurden bezüglich des Hauptprodukts Bakteriophäophytin a<sub>P</sub> (1) maximal 3 bzw. 10%<sup>11)</sup> begleitendes Bakteriophäophytin a<sub>Gg</sub> (2) gefunden. Die beobachtete teilweise «Phäophytinisierung» von Bakteriochlorophyll a<sub>Gg</sub> (4) bei der Säulenchromatographie auf Kieselgel (vgl. exper. Teil 1.2) stützt die Vermutung, dass dieses Bakteriophäophytin a<sub>Gg</sub> (2) ein aus 4 gebildetes Präparationsartefakt und kein natürlicher Bestandteil von RC. oder Antenne ist (die in der Phäophytin-Fraktion ganzer Bakterien gefundene Menge von 2 entspräche ca. 0,6% des gesamten Chlorophylls 4).

Nach neuerer Auffassung [7g] [39] ist das Bakteriophäophytin a der RC. [5] [34b] [40] der primäre Elektronenakzeptor bei der bakteriellen Photosynthese, und somit wird ihm eine fundamentale und zu jener des Bakteriochlorophylls a komplementäre Funktion zugeschrieben. Es ist bemerkenswert, dass sich diese beiden Pigmente in *Rhodospirillum rubrum* G-9<sup>+</sup> nicht nur durch das (im Phäophytin fehlende) Magnesium unterscheiden, sondern auch noch durch ihre Alkoholkomponente scharf differenziert sind. *Rh. rubrum* wird relativ zu *Rhodopseudomonas sphäroides* als «primitiver» klassiert [7e] [41]. Einige Stämme von *Rh. rubrum* sollen

nach [20a] ausschliesslich (also offenbar auch im RC.-Phäophytin) Geranylgeraniol enthalten; demgegenüber kommt in *Rhodopseudomonas sphäroides* (vgl. exper. Teil 1.1 und [19] [20a]) sowie in den meisten anderen photosynthetisierenden Bakterien [19] [20] und in den Pflanzen nur Phytol vor.

Wir danken Herrn Prof. Dr. R. Bachofen sowie Dr. M. Snozzi und Dr. K. Hanselmann (Institut für Pflanzenbiologie, Universität Zürich) für die gute Zusammenarbeit und die grosszügige Überlassung der wertvollen RC.-Präparationen und Bakterienkulturen. Unser Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. H. Zuber (Institut für Molekularbiologie und Biophysik ETH) für die Einführung des einen von uns (E.W.) in molekularbiologische Arbeitsmethoden, Herrn Prof. Dr. J.F.M. Oth (Laboratorium für organische Chemie ETH) für seine Unterstützung bei der Aufnahme der UV./VIS.-Spektren und Herrn P.A. Weibel (Varian AG Zug) für die Vermittlung der FD.-MS.-Aufnahmen im Varian-Applikationslabor, Bremen. Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt. Für eine Forschungsbeihilfe danken wir auch der Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung.

### Experimenteller Teil<sup>23)</sup>

**Allgemeines.** Abkürzungen: DC. Dünnschichtchromatographie; HPLC. High Pressure (Performance) Liquid Chromatography; RT. Raumtemperatur; RV. Rotationsverdampfer; V. und HV. Wasserstrahl- bzw. Hochvakuum; OD. optische Dichte (Extinktion pro cm Schichtdicke der Messzelle); MC Methylenchlorid; DME Dimethoxyäthan; HMPA Hexamethylphosphorsäuretriamid; RC. Reaktionszentren. – Alle Experimente wurden unter grösstmöglichem Lichtausschluss (Dunkelraum mit variabler Lichtquelle, Umhüllung der Gefässe mit grünbeschichteter Aluminiumfolie), diejenigen mit Bakteriochlorophyll noch zusätzlich unter Argon oder Stickstoff durchgeführt (vgl. [1], S.51–52). – Lösungsmittel und Reagenzien: Acetonitril (*Fluka purum*) und MC: über Phosphorpentoxid destilliert; Äther, Benzol, DME (*Fluka purum*), Hexan und Pentan: über Natriumhydrid destilliert; HMPA (*Fluka pract.*): destilliert; Methanol: über Magnesium destilliert; Puffer pH 7: 500 ml 0,1M wässrige  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung und 291 ml 0,1N NaOH-Lösung;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ : *Fluka p.a.* wasserfrei. – DC.: Fertigplatten *Silgur-25 UV<sub>254</sub>* (Startzone: Kieselgur, Chromatographiezone: Kieselgel; *Macherey-Nagel & Co.*), sofort nach Auftragen im Dunkeln unter Stickstoff entwickelt, farblose Substanzen mit Joddampf sichtbar gemacht. – UV./VIS.: Cary-Spektrophotometer Modell 17; Angaben von  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\log \epsilon$ ) in nm,  $\text{min.} = \lambda_{\text{min}}$ ; Fehler:  $\Delta \lambda$  meist  $\leq 1$  nm,  $\Delta (\log \epsilon)$  ca.  $\pm 0,004$  (grosse  $\epsilon$ ) bis ca. 0,1 (kleine  $\epsilon$ ); Schichtdicke  $d = 1$  mm. Alle UV./VIS.- und CD.-Spektren wurden in Äther (*Fluka p.a.*<sup>24)</sup>) aufgenommen. CD.: *Jasco* Recording Spectropolarimeter J-40AS; Wellenlängen der Extrema  $\lambda_m$  und der Nullstellen  $\lambda_0$  in nm (molarer dekadischer Circular dichroismus  $[\Delta \epsilon]$ ); Fehler:  $\Delta \lambda$  ca.  $\pm 2$  nm,  $\Delta [\Delta \epsilon] = \pm 0,2\text{--}0,3$ . IR.: in  $\text{CHCl}_3$  (*Merck p.a.*<sup>24)</sup>); Angabe in  $\text{cm}^{-1}$ , relative Bandenintensitäten: *s* stark, *m* mittel, *w* schwach.  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR.: 100 bzw. 25,16 MHz-Spektren in  $\text{CDCl}_3$ <sup>24)</sup>, Angaben in ppm, bez. auf  $\delta(\text{TMS}) = 0$ ; *s* (*d*, *t*, *qa*, *m*) = Singulett usw., Kopplungskonstanten *J* in Hz. Elektronenstossionisierungs-Massenspektren (EI.-MS.): Ionisierungsenergie 70 eV, Direkteinlass bei der angegebenen Temperatur. Feld-desorptions-Massenspektren (FD.-MS.): *Varian* MAT 311 A mit kombinierter Ionenquelle FD./FI./EI. und Datensystem SS 100; Emitterheizstrom und Grenzwert für die Angabe der Pike jeweils in Klammern erwähnt.

**Verwendete HPLC.-Methodik.** – *Apparatur.* Pumpe *Orlita* DMP 1515-3; Trennsäulen s. unten; Detektor *Perkin-Elmer* Spektrophotometer LC-55 oder *Laboratory Data Control* UV-Monitor (254, 280 nm), verwendete Wellenlängen  $\lambda$  jeweils angegeben; Schreiber *W + W*-Recorder 1100, Papiervorschub 5 mm/Min.

*Trennsysteme*<sup>25)</sup>. System I: Säule  $7 \times 240$  mm, stationäre Phase *Partisil 5 Whatman*, mobile Phase Pentan/Äther/Äther wassergesättigt 16:15:5, Druck 20 bar, Flussrate 90 ml/Std. System II: Pentan/

<sup>23)</sup> Unter teilweiser exper. Mithilfe von Frl. B. Rosenberger.

<sup>24)</sup> Vor Gebrauch über Aluminiumoxid *Woelm* basisch Akt. I filtriert.

<sup>25)</sup> Für eine detailliertere Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten HPLC.-Trennsysteme und ihrer Leistungsfähigkeit vgl. [1], S.62–70.



Benzol/DME 40:40:3, 35 bar, 85 ml/Std. System III: Pentan/MC<sup>24</sup>/DME/HMPA 100:20:4:0.3, 30 bar, 65 ml/Std. System IV: Säule 9×240 mm, *Lichrosorb Si60 5μ Merck*, Pentan/MC/Acetonitril 50:10:3, 20 bar, 160 ml/Std.

Signalfläche (Angabe in %, bez. auf die Flächensumme der ausgewerteten Signale) = Signalhöhe ×  $\sigma$  ( $\sigma$  = «Standardabweichung» des Signals, d.h. Hälfte der Signalbreite bei 60% der Signalhöhe); Retentionszeit  $t$  (min.); Kapazitätsfaktor  $k' = (t - t_0)/t_0$  (Totzeit  $t_0$  durch Bestimmung der «Retentionszeit» einer 10- $\mu$ l-Probe Pentan im jeweiligen System ermittelt); theoretische Bodenzahl  $N$  (pro Säule inkl. Anschlüsse und Zuleitungen) =  $(t/\sigma)^2$ . - Die Substanzen (ca. 2–40  $\mu$ g) wurden jeweils in der mobilen Phase gelöst eingespritzt (vgl. unten); Ausnahme: bei System II wurde wegen des zu geringen Lösevermögens der mobilen Phase die Substanz in 5  $\mu$ l MC<sup>24</sup> gelöst und vor dem Einspritzen mit mobiler Phase auf 50  $\mu$ l verdünnt. Zur Durchführung der *Mischchromatogramme* s. Fussnote 55.

**Trennsäulen:** Säulen aus dickwandigem Glasrohr, Standardlänge 250 mm, Innendurchmesser 7 bzw. 9, bzw. 12 mm, Wandstärke jeweils 4 mm, mit Teflonendstücken, die mittels eines geschlitzten Aluminiumrohres und 2 Überwurfmutter zur fertigen Trennsäule zusammengebaut werden, s. *Figur 1a*. Das Säuleneingangsstück enthält eine Fritte aus porösem Teflon (3 mm  $\varnothing$ , 2 mm dick) und ist im konischen Teil mit *Corasil*, *Zippax* oder auch mit Glaskügelchen von 0,5 mm  $\varnothing$  gefüllt. Die mobile Phase wird von der Seite her eingeführt. Die Substanzprobe wird mittels einer Mikroliterspritze drucklos in den unteren Teil der Bohrung deponiert und die obere Öffnung anschliessend mittels Stopfen und Kugelschliffklemmen verschlossen, womit der chromatographische Prozess beginnt (s. *Fig. 1b*). Das Endstück ist mit einer Stahlfritte (5,4 mm  $\varnothing$ , Porengrösse 2  $\mu$ ) versehen. Zur Herstellung der Trennsäulen wird die sog. 'Slurry-packing'-Technik angewendet (vgl. z.B. [43]). Dazu wird das Glasrohr, versehen mit Teflon-Endstück und Fritte, mit einem trichterförmigen Aufsatz verbunden und in einem druckfesten Rohr so plaziert, dass die im Rohrboden eingelötete Stahlkapillare in die Bohrung des Teflon-Endstücks geschoben wird (s. *Fig. 1c*). Einen analogen Aufbau beschreibt *Schwarzenbach* [44]. Der Packvorgang (Dauer ca. 1 Std.) wird wie folgt durchgeführt: Die notwendige Menge Trägermaterial (z.B. 8 g *Lichrosorb Si60 5 μ* oder *Partisil 5* für 7 mm  $\varnothing$  oder 11 g für 9 mm  $\varnothing$  oder 23 g für 12 mm  $\varnothing$ ) wird vorerst in einem zylindrischen Gefäss (ca. 40×150 mm) in ca. 100 ml Methanol suspendiert und 5–6 Std. sedimentieren gelassen. Dann wird dekantiert, das Sediment nochmals in ca. 100 ml Methanol aufgerührt, sedimentieren gelassen (6 Std. oder über Nacht) und wieder dekantiert. Das sedimentierte Material wird erneut in ca. 50 ml Methanol suspendiert, die Suspension in die im Druckrohr vorbereitete Säule mit Aufsatz gegossen, dieser Aufsatz noch mit Methanol aufgefüllt und lose mit einer Prallplatte aus Teflon zugedeckt, damit beim Packvorgang die Suspension nicht aufgewirbelt wird. Der Zwischenraum zwischen Druckrohr und Säule wird vollständig mit Benzin<sup>26</sup> ausgefüllt, das Druckrohr mit dem Deckel verschlossen und mit der Pumpe verbunden (*Haskel MCP110. Ammann-Technik*, Kölleken). Die Pumpe wird mit ca. 4 bar Druckluft betrieben, sie pumpt Benzin unter einem Druck von 350–380 bar in das Druckrohr und presst damit das in Methanol suspendierte Trägermaterial in die Glassäule. Der Packvorgang ist beendet, wenn ca. 500 ml durch das System gepumpt worden sind (erst Methanol, dann Benzin). Die Packung kann im Druckrohr unmittelbar anschliessend noch mit anderen Lösungsmitteln behandelt oder gewaschen werden. Dazu wird der Pumpenanschluss gelöst, mit einer Spritze durch einen Kreuzschnitt in der Prallplatte Benzin aus dem Säulenaufsatz genommen, der Aufsatz mit dem neuen Lösungsmittel wieder aufgefüllt und dieses mit Benzin aus der Pumpe durch die Packung gedrückt. Die gepackte Glassäule wird herausgenommen; im Säulenaufsatz befindet sich noch etwas überschüssiges Packmaterial. Mit einem geeigneten Spatel werden nun am Säulenanfang 5 mm der Packung vorsichtig herausgekratzt, die Säule dann auf das vorbereitete Teflon-Einlaßstück (konischer Teil gefüllt mit Glaskügelchen) gesteckt und im Aluminiumrohr verschraubt. Der Anschluss der Säule zum Detektor erfolgt über ein kurzes Stück Stahlkapillare (1,0×0,5 mm), das einfach in die 0,9-mm-Bohrung des Teflon-Endes gesteckt wird. Die so hergestellten Säulen zeigen im allgemeinen theoretische Bodenzahlen  $N = 10000 \pm 2000$ . (Allfällige weitere Informationen über die verwendete HPLC-Technik sind von J.S. erhältlich.)

**1. Bakteriophäophytine (Referenzsubstanzen).** - 1.1. *Bakteriophäophytin ap* (1) (Extraktionsmethode in Anlehnung an [21a], Dekomplexierung und Reinigung nach [22]). In einer Reibschale wurden 48 g

<sup>26</sup>) Benzin, Sdp. 80–100°. Dieses Lösungsmittel wird zum Packen von nichtmodifizierten Kieselgelen und Aluminiumoxyden verwendet. Es ist relativ billig, schadet der Pumpe nicht und befreit die gepackte Säule schon weitgehend vom Methanol.

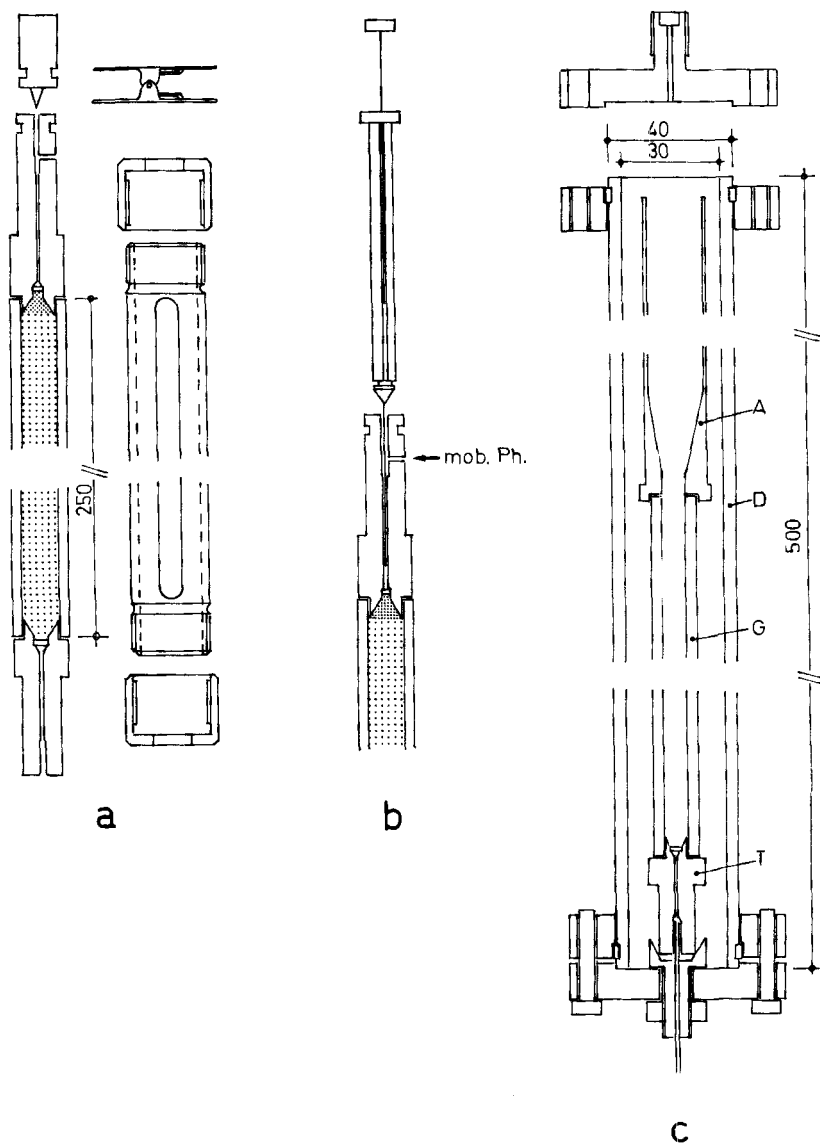


Fig.1. a) Fertig gepackte Säule mit Teflon-Endstücken. Verschlussstopfen und Klammer; daneben: geschlitztes Aluminiumrohr mit Überwurfmutter zum Zusammenbau der Säule mit ihren Anschlüssen

b) Dosieren von Proben bis ca. 20  $\mu$ l, ohne Gegendruck. Grössere Probemengen werden mittels druckfester Spritze mit einer 1 mm dicken Nadel injiziert. Diese Nadel schliesst in der 0,9-mm-Bohrung im untern Teil des Teflon-Einlaßstückes dicht gegen aussen

c) Druckrohr D mit darin platzierter Glassäule G, Aufsatz A und Teflon-Endstück T. Der Übersicht halber ist hier das geschlitzte Aluminiumrohr mit den beiden Überwurfmuttern, das die drei Stücke G, A und T zusammenhält, nicht eingezeichnet (Masse in Millimetern)

gefrorene Zellen von *Rhodospseudomonas sphäroides* R-26<sup>8</sup>) aufgetaut, verrieben und mit 50 ml Methanol versetzt. Der blaugrüne Brei wurde mit 250 ml Methanol in einen Kolben gespült, nach 5 Min. Rühren bei RT. im Argonstrom mit weiteren 100 ml Methanol und 25 g *Celite*<sup>27)</sup> versetzt, durch eine Glasfilternutsche G3 filtriert und der Rückstand mit 100 ml Methanol farblos gewaschen. Das Filtrat wurde mit 500 ml Äther/Pentan/Puffer pH 7 1:3:1 geschüttelt und die Wasserphase noch 2mal mit je 200 ml Pentan extrahiert. Die organischen Lösungen wurden 2mal mit 250 ml Methanol/Puffer pH 7 4:1 und 1mal mit 50 ml Puffer gewaschen (gegebenenfalls Zusatz von 10–20 ml ges. NaCl-Lösung zum Brechen von Emulsionen), mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und nach Zusatz von 20 ml Methanol langsam<sup>28)</sup> im RV. bei RT. eingedampft. Der harzartige Rückstand (700 mg) wurde zuerst 5mal mit je 2 ml Methanol digeriert (Extraktion des blauen Bakteriochlorophylls) und dann noch 4mal mit je 2 ml Aceton extrahiert (Extraktion des roten Bakteriophäophytins). Nach Eindampfen der vereinigten Lösungen im RV. wurde der Rückstand (200 mg) in 50 ml Äther/Pentan 1:1 gelöst und 5 Min. intensiv mit 25 ml 0,5N HCl<sup>29)</sup> geschüttelt. Nach Verdünnen mit 50 ml Wasser wurde die wässrige Phase mit 40 ml Äther extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zuerst mit 100 ml Wasser, dann mit 50 ml Puffer pH 7 gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet<sup>30)</sup>. Das Lösungsmittel wurde im RV. entfernt, das Rohprodukt in 8 ml Pentan suspendiert, zentrifugiert, die abpipettierte Pentanolösung verworfen, das Sediment in MC vollständig gelöst und im RV. zur Trockne eingedampft. Nach 2maliger Wiederholung dieses Verfahrens wurde der Rückstand (60 mg) erst mit 10 ml, dann mit 5 ml Methanol digeriert, die Waschlösung je verworfen und das ungelöste Material i.HV. getrocknet (16 Std./RT.): 48 mg, Gehalt an 1 98%<sup>31)</sup>. Zur Umfällung wurde in 20 ml Aceton<sup>29)</sup> gelöst, filtriert, i.V. bei ca. 30° auf ca. 7 ml eingengt (gesättigte Lösung), unter Argon auf ca. 50° erwärmt und mit 50 ml siedendem Methanol<sup>32)</sup> versetzt. Nach langsamem Abkühlen (unter Argon) auf 4° wurde der schwarze Niederschlag abgenutscht, mit 1 ml Methanol<sup>32)</sup> und 2 ml Äther gewaschen und 12 Std. i.HV. bei RT. getrocknet. – Aus zwei solchen Ansätzen wurden 36 bzw. 34 mg 1 gleicher Qualität erhalten, das im DC, ausser dem Produkt noch einen farblosen Startfleck zeigte. 68 mg dieses Materials wurden in 11 ml Aceton<sup>29)</sup> gelöst, mit 90 ml siedendem Methanol<sup>32)</sup> versetzt, unter Argon auf RT. abkühlen gelassen, filtriert, mit 6 ml Methanol<sup>32)</sup> und 6 ml Äther gewaschen und 2 Std. getrocknet (HV./RT.): 51 mg (ca. 53% der in den Bakterien vorhandenen Pigmentmenge<sup>33)</sup>) Bakteriophäophytin ap (1) mit den folgenden Eigenschaften<sup>34)</sup>: DC. (Hexan/Aceton 2:1) einheitlich, Rf 0,55<sup>35)</sup>. HPLC. im System I ( $\lambda = 749$ , 230 nm<sup>36)</sup>): t = 18,2, k' = 2,8, N = 12900 (Nebenpik von 0,5% Bakteriophäophytin ap (1'; s. unten) bei t = 15,8); im System II ( $\lambda = 749$  nm): t = 21,8, k' = 3,4, N = 8600 (0,6% 1' bei t = 20,3); im System III ( $\lambda = 749$ , 254 nm<sup>36)</sup>): t = 18,8, k' = 1,7, N = 9300 ( $\leq 0,5\%$  1' bei t = 16,0); im System IV ( $\lambda = 280$  nm): t = 17,9, N = 15200 ( $\leq 0,7\%$  1' bei t  $\approx 17$ , nicht aufgelöst); Chromatogramme I–III abgebildet in [1], S.209–211. – UV./VIS. ( $c = 71,3 \cdot 10^{-6}$ M; s. Fig. 2): 749 (4,854), 678 (3,978), 623 (3,491), 525 (4,450), 493 (3,740), 459

27) Die Zugabe von *Celite* erleichterte die Abtrennung der ungelösten Zellbestandteile; das Filtrat war bei *Rh. sphäroides* trübe, bei *Rh. rubrum* G-9<sup>+</sup> hingegen klar.

28) Nach dem Abdampfen von Äther und Pentan wurde so das Bakteriochlorophyll a (Gehalt im Rückstand ca. 7%) langsam aus dem Methanol auf den unlöslichen Rückstand abgeschieden; ohne Methanolzusatz blieben bei der nachfolgenden Extraktion grosse Mengen im Rückstand eingeschlossen.

29) Merck p.a.

30) Beim Schütteln fiel das in Äther nur schlecht lösliche 1 zum Teil aus, daher wurden zur Vermeidung von Verlusten alle verwendeten Gefässe mit MC nachgespült und diese Lösungen mit den organischen Phasen vereinigt.

31) Aus OD. (753 nm) mit  $\epsilon$  (753 nm) = 54 500 berechnet.

32) Fluka p.a.

33) Aus den Mutterlaugen der Umfällungen hätte man noch weitere 20–25% 1 isolieren können.

34) Eine Probe Bakteriophäophytin ap, die aus einem *Chromatium vinosum*-D-Methanolextrakt (Geschenk von Prof. H. Brockmann, jr., ehemals TU Braunschweig; vgl. [15a], S.101) nach der Vorschrift von Golden *et al.* [22] gewonnen wurde, zeigte mit diesem Material übereinstimmende analytische und spektroskopische Daten, obwohl sie laut HPLC. 4 Verunreinigungen (total ca. 4%; ca. 0,7% Epimer ap 1', ca. 1,5% Bakteriophäophytin a<sub>Gr</sub> (2) sowie möglicherweise 2 weitere Phäophytine mit anderer Alkoholkomponente) enthält; vgl. [1], S.75–81.

35) Rf-Werte in verschiedenen anderen Laufmittelsystemen s. [1], S.87, 103, 123 bzw. 136.

36) Gleiche Chromatogramme bei allen angegebenen Detektorwellenlängen.

(3,380), 385 (4,785), 357,5 (5,052), 230 (4,364); min. 697 (3,898), 637 (3,447), ca. 560 (2,99), 501 (3,699), 471 (3,322), 442 (3,176), 378 (4,732), 273 (3,881), 215 (4,288). - CD. ( $c = 15,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{37}$ ):  $\lambda_m = 521 (-4,7)$ , ca. 487  $(-1,1)$ , 405  $(+0,5)$ , 384  $(-2,6)$ , 353  $(+10,7)$ , 317  $(+2,4)$ , 300  $(-0,7)$ , 285  $(-0,7)$ , 241  $(+10,5)$ ;  $\lambda_0$  bei 545, ca. 430, 397, 379, 306, 278, 222. - IR. ( $c = 5,0\%$ ; s. Fig. 6): 3400w, 3340w, 3030w, 3005w, 2960s, 2925s, 2870m, 1735s, 1690s, 1620s, 1580w, 1530w, 1490w, 1453m, 1435m, 1400m, 1380s, 1365s, 1297w, 1270w, 1155m, 1130m, 1120m, 1095m, 1010m, 990m, 930s, 875s, 845w, 690w, 650s, 610w. -  $^1\text{H-NMR}$ . (0,08m; s. Fig. 4)<sup>38</sup>: - 0,94/0,49 (2s/2 HN); 0,81/0,85 (2d/J = 6/H<sub>3</sub>C(P7<sup>1</sup>), H<sub>3</sub>C(P11<sup>1</sup>), H<sub>3</sub>C(P15<sup>1</sup>), H<sub>3</sub>C(P16)); 0,9-1,5 (Signalhaufen/H<sub>3</sub>C(8<sup>2</sup>); HC von P15, P11 und P7; H<sub>2</sub>C von P14, P13, P12, P10, P9, P8, P6 und P5); 1,63 (s/H<sub>3</sub>C(P3<sup>1</sup>)); 1,74/1,80 (2d/J = 7/H<sub>3</sub>C(7<sup>1</sup>), H<sub>3</sub>C(18<sup>1</sup>)); 1,95 (u/H<sub>2</sub>C(P4)); 2,0-2,8 (Signalhaufen/H<sub>2</sub>C(8<sup>1</sup>), H<sub>2</sub>C(17<sup>1</sup>), H<sub>2</sub>C(17<sup>2</sup>)); 3,14 (s/H<sub>3</sub>C(3<sup>2</sup>)); 3,45/3,47 (2s/H<sub>3</sub>C(2<sup>1</sup>), H<sub>3</sub>C(12<sup>1</sup>)); 3,87 (s/H<sub>3</sub>CO-OC(13<sup>3</sup>)); ca. 4,05 (m/HC(8), HC(17)); ca. 4,31 (m/HC(7), HC(18)); 4,51 (d/J = 7/H<sub>2</sub>C(P1)); 5,21 (u/J = 7/HC(P2)); 6,11 (s/HC(13<sup>2</sup>)); 8,39 (s/HC(20)); 8,45 (s/HC(10)); 8,96 (s/HC(5)). -  $^{13}\text{C-NMR}$ . (0,45m; abgebildet in [1], S.135)<sup>38</sup>: 10,7/11,5 (2qa/C(2<sup>1</sup>), C(12<sup>1</sup>)); 13,3 (qa/C(8<sup>2</sup>)); 16,3 (qa/C(P3<sup>1</sup>)); 19,7 (2qa/C(P7<sup>1</sup>), C(P11<sup>1</sup>)); 22,9/22,7 (4qa/C(7<sup>1</sup>), C(18<sup>1</sup>), C(P15<sup>1</sup>), C(P16)); 24,4 (u/C(P9)); 24,7 (u/C(P13)); 25,0 (u/C(P5)); 27,9 (d/C(P15)); 29,9/30,1 (2u/C(8<sup>1</sup>), C(17<sup>1</sup>)); 31,1 (u/C(17<sup>2</sup>)); 32,6/32,7 (2d/C(P7), C(P11)); 33,2 (qa/C(3<sup>2</sup>)); 36,6 (u/C(P6)); 37,3 (u/C(P8), C(P10), C(P12)); 39,3 (u/C(P14)); 39,8 (u/C(P4)); 48,8/49,7/50,6/54,9 (4d/C(7), C(8), C(17), C(18)); 52,7 (qa/CH<sub>3</sub>O-C(13<sup>3</sup>)); 61,4 (u/C(P1)); 64,3 (d/C(13<sup>2</sup>)); 95,8/97,5/99,5 (3d/C(5), C(10), C(20)); 108,0 (s/C(15)); 117,7 (d/C(P2)); 121,1/128,5/133,0/136,1/136,7/138,1/138,9/148,0/157,9/163,4/170,8 (11s/11 quartäre C im Ring); 142,6 (s/C(P3)); 169,4 (s/C(13<sup>3</sup>) und 1 quartäres C im Ring); 172,7 (s/C(17<sup>3</sup>)); 188,8 (s/C(13<sup>1</sup>)); 198,6 (s/C(3<sup>1</sup>)). - EI-MS.: kein M<sup>+</sup>, Pikmuster stark von der Zuführungstemp. abhängig (s. [1], S. 76,88), u.a. 830 (M<sup>+</sup> - CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, Pyrolyse!), 552 (M<sup>+</sup> - CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> - C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>, McLafferty-Eliminierung), 278 (Alkenfragment C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>, typisch für Phytylester [18] [19]). - FD-MS. (14 mA/10%): 891 (20), 890 (65), 889 (M + H<sup>+</sup>, 100).

C<sub>55</sub>H<sub>76</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> Ber. C 74,29 H 8,62 N 6,30% Gef. C 74,30 H 8,63 N 6,28%

**Epimerisierung von Bakteriophäophytin ap (1).** In 5 ml Benzol und 0,5 mg BHT<sup>39</sup> wurden 2,7 mg (3,0 µmol) **1** gelöst und mit 0,5 ml Triäthylamin (über Phosphorpentoxid dest.) versetzt. Nach 15 Min.<sup>40</sup> bei 20° wurde auf Wasser gegossen, die organische Phase je 1mal mit 1N HCl, Wasser und Puffer pH 7 gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im RV. eingedampft: das Epimerengemisch<sup>14</sup> war DC.-einheitlich in den Systemen MC/Acetonitril 19:1 und Hexan/Aceton 2:1. HPLC.: Epimerenverhältnis 1/1' (Verhältnis der Signalfächen) = 5,0 ± 0,5 (Gleichgewichtsgemisch, vgl. Fussnote 40), Mittelwert aus 6 Chromatogrammen in den Systemen I-III ( $\lambda = 749$  bzw. 280 nm)<sup>41</sup>; Verunreinigungen ≤ 1,5%. Eine Probe Epimerengemisch (0,5 mg in 12 µl MC<sup>24</sup>) wurde im HPLC.-System I getrennt und jede Komponente einzeln aufgefangen. Das Lösungsmittel wurde bei 0° mit Stickstoff abgeblasen und der

<sup>37</sup>) Konzentration der Lösungen bzw. Pigmentmengen und Ausbeuten aus den gemessenen OD.-Werten der entsprechenden Maxima mit  $\epsilon$  (749 nm) = 71500 (Bakteriophäophytin ap, s. 1.1) bzw.  $\epsilon$  (770 nm) = 94300 (Wert von Methyl-bakteriochlorophyllid a [38a], verwendet für Bakteriochlorophyll a) bestimmt. - Während sich bei den RC.-Pigmenten die Angaben in nmol auf das tatsächlich noch vorhandene Material beziehen, sind die prozentualen Ausbeuten für die zur Analytik (DC., HPLC.) verbrauchten Substanzmengen korrigiert.

<sup>38</sup>) Zuordnung der Signale im  $^1\text{H-NMR}$ . nach [21b] [45] bzw. [18] [23] (für Geranylgeranyl-Rest), im  $^{13}\text{C-NMR}$ . in Analogie zu [26] [42] [46] und nach einem Spektrum von Bakteriophäophytin a<sub>GG</sub>, das spezifisch an C(2<sup>1</sup>), C(3<sup>2</sup>), C(7<sup>1</sup>), C(8<sup>2</sup>), C(12<sup>1</sup>), C(13<sup>2</sup>), C(17<sup>2</sup>), C(18<sup>1</sup>) mit  $^{13}\text{C}$  (Einbaureate 45-50%) markiert war (hergestellt durch Verfütterung von 2-[ $^{13}\text{C}$ ]- $\delta$ -Aminolävulinsäure [15b] an *Rhodospirillum rubrum* G-9<sup>+</sup>, s. [1], S.241ff.). Numerierung des Phorbideils nach der IUPAC-Nomenklatur [47] (s. auch Formelbild in Fussnote 6 in [10a]); Alkoholrest nach dem gleichen System mit Präfix P bzw. G numeriert.

<sup>39</sup>) BHT = «Butyl-hydroxy-toluol» (leider kaum mehr ausmerzbares Abkürzung für 2,6-Di-*t*-butyl-4-methylphenol; *Fluka purum*, sublimiert) als Antioxidans [48].

<sup>40</sup>) Ein Vorversuch zeigte, dass das Verhältnis 1/1' spätestens nach 15 Min. konstant bleibt (HPLC.). Zur Epimerisierung von **1** in anderen Lösungsmitteln s. [1], S.100-102 und 106.

<sup>41</sup>) HPLC.-Daten der Epimerengemische in [1], S.105, Chromatogramme abgebildet auf S.104 (1) bzw. 138 (2); Daten der Mischchromatogramme (zur Durchführung vgl. Fussnote 55) in [1], S.107, 110 (1) bzw. 137 (2).

Rückstand getrocknet (HV./RT.):  $340 \mu\text{g}^{37}$ ) (79%) Hauptkomponente; Reinheit laut HPLC. im System I ( $\lambda = 749 \text{ nm}$ )  $\geq 98\%$  (zu ca. 1% epimerisiert), dem Mischchromatogramm zufolge identisch mit **1**<sup>41</sup>). - UV./VIS.- und CD.-Spektrum ( $c = 17,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{37}$ ) im Bereich 800-300 nm (UV./VIS., von 300-220 nm um 6-9% verminderte Extinktionen) bzw. 700-220 nm (CD.) innerhalb der Fehlergrenze in Übereinstimmung<sup>42</sup>) mit denjenigen von Referenzsubstanz **1**.

$76 \mu\text{g}^{43}$ ) Nebenkomponente *Bakteriophäophytin a<sub>p</sub>* (**1'**)<sup>14</sup>); HPLC. im System I ( $\lambda = 749 \text{ nm}$ , abgebildet in [1], S.110):  $\geq 94\%$  **1'**,  $t = 18,8$ ,  $k' = 3,0$ ,  $N = 14700$  (Gehalt an **1**  $\leq 2,5\%$ ). - UV./VIS. ( $c = 17,3 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{43}$ ): 751 (4,83, vgl. Fussnote 43), 680 (3,92), 622 (3,51), 526 (4,44), 494 (3,73), 461 (3,36), 386 (4,77), 358 (5,04), 230 (4,33); min. 699 (3,89), 640 (3,45), 555 (2,9), 502 (3,71), 471 (3,30), 442 (3,15), 378 (4,72), 273 (3,83), 214 (4,24). - CD. ( $c = 17,3 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{43}$ ):  $\lambda_m = 535 (+8,8)$ , 523 (+21,9), 496 (+3,0), 491 (+3,3), 435 (-0,4), 384 (+27,9), 355 (-20,1), 316 (-1,8), 293 (-9,5), 265-270 (-2,5), 253 (+1,1);  $\lambda_0$  bei 590-580, 454, 417, 364, 257, 249; Fehler infolge des Gehalts an **1** ( $\leq 3,5\%$  laut Kontroll-HPLC. nach Aufnahme des Spektrums) bei 353 und 241 ( $\leq +0,4$ ) bzw. bei 521 ( $\leq -0,16$ ); im übrigen Bereich des Spektrums war der Fehler kleiner.

Epimerisierung einer Probe von **1'** unter den oben beschriebenen Bedingungen führte gemäss HPLC.<sup>41</sup>) zum Gleichgewichtsgemisch **1**/**1'** = 4,9 (nebst 3 Verunreinigungen, je  $\leq 1\%$ ); die Identität der Hauptkomponente dieses Gemisches mit authentischem **1** wurde durch ein Mischchromatogramm bewiesen (vgl. [1], S. 109-110).

*Bestimmung der Gleichgewichtskonstante*  $K = [1]/[1']$ .  $K(\text{HPLC.}) = 4,8 \pm 0,7$  (bei 749 nm) bzw.  $4,6 \pm 0,7$  (bei 280 nm): Die aus den Chromatogrammen des Gleichgewichtsgemisches erhaltenen Signalflächen wurden für die unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten von **1** und **1'** bei 749 bzw. 280 nm korrigiert, vgl. [1], S.113-114. -  $K(\text{VIS.}) = 4,9 \pm 0,3$ , d.h. **1**/**1'** zwischen 82:18 und 84:16 (aus OD. (749 nm) der Fraktionen **1** und **1'** nach HPLC.-Trennung bestimmt, vgl. [1], S.114). -  $K(\text{NMR.}) = 4,5 \pm 0,5$ : Eine im Dunkeln bei RT. aufbewahrte Lösung von **1** (aus *Chromatium D*<sup>34</sup>) in  $\text{CDCl}_3$  zeigte schon nach 24 Std. im Gegensatz zur frischgelösten Probe zusätzliche Signale von **1'** bei 3,44, 3,84, 5,98 (HC(13<sup>2</sup>)), 8,34 und 8,93 ppm mit zuerst zunehmender, nach 3 Tagen konstanter Intensität<sup>44</sup>); Berechnung von  $K$  aus der Integration der HC(13<sup>2</sup>)-Signale von **1** und **1'** nach 5 Tagen; Spektren abgebildet in [1], S.99 (vgl. dazu die entsprechend durchgeführte Bestimmung des Epimerenverhältnisses bei Chlorophyll a, b bzw. Bakteriochlorophyll a [28] und Methylphäophorbid a [49]).

1.2. *Bakteriophäophytin a<sub>g</sub>* (**2**). In einer Reibschale wurden 31 g gefrorene Zellen von *Rhodospirillum rubrum G-9*<sup>9</sup>) aufgetaut und mit 100 ml Methanol und 30 mg BHT<sup>39</sup>) verrieben. Die blaugrüne Suspension wurde mit 150 ml Äther verdünnt und durch 12 g in Äther aufgeschlämmtes *Celite*<sup>27</sup>) in einer

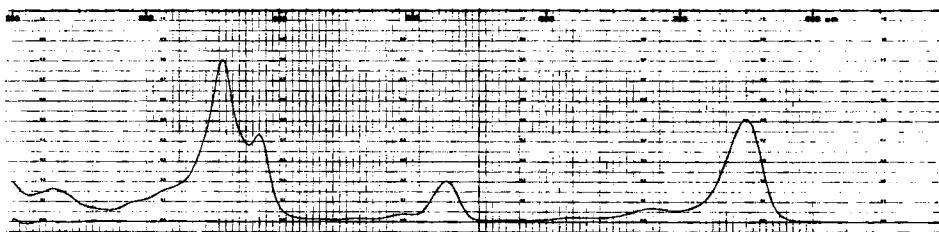


Fig. 2. UV./VIS.-Spektrum von *Bakteriophäophytin a<sub>p</sub>* (**1**) in Äther ( $c = 71,3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ;  $d = 0,1 \text{ cm}$ )

<sup>42</sup>) Vgl. spektroskopische Daten der Referenz-Phäophytine **1** und **2** in 1.1 bzw. 1.2; angegebene Abweichungen  $\Delta\epsilon$  sind auf diese Spektren bezogen. - Für eine tabellarische Gegenüberstellung der Daten der Phäophytine aus RC. bzw. Epimerisierung und der Referenzsubstanzen s. [1], S.227 (UV./VIS. von **1**), 230 (CD. von **1**), 235 (UV./VIS. von **2**) bzw. 236 (CD. von **2**).

<sup>43</sup>) Die Pigmentmenge bzw. Konzentration der Lösungen wurde aus OD.(751 nm) mit  $\epsilon(751 \text{ nm}) = 67200$  ermittelt; dieser Extinktionskoeffizient für das Epimer **1'** wurde aus den Absorptionsspektren zweier Gemische **1**/**1'** von 2:98 bzw. von 82:18 berechnet (geschätzter Fehler von  $\epsilon$  ca. 5%; vgl. [1], S.111-113) und auch für *a<sub>g</sub>* **2'** übernommen.

<sup>44</sup>) Eine derart rasche Epimerisierung in  $\text{CDCl}_3$  wurde sonst nicht gefunden und war wahrscheinlich auf (katalytisch wirkende?) Verunreinigungen dieser Probe zurückzuführen (vgl. Fussnote 34 und [1], S.102).

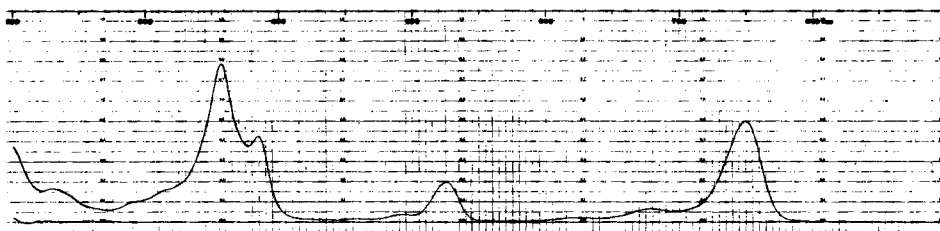


Fig. 3. UV/VIS.-Spektrum von Bakteriophäophytin  $a_{Gg}$  (2) in Äther ( $c = 69,7 \cdot 10^{-6} M$ ;  $d = 0,1 cm$ )

Glasfilternutsche G3 filtriert. Der Filterrückstand wurde 3mal mit je 30 ml Äther gewaschen, das vereinigte Filtrat mit 150 ml Pentan verdünnt, die Wasser/Methanol-Phase<sup>45)</sup> mit 60 ml Äther/Pentan 1:1 unter Zusatz von 5 ml ges. NaCl-Lösung geschüttelt, und die beiden organischen Lösungen erst mit 30 ml Puffer pH 7, dann mit 30 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Dieser Rohextrakt enthielt Bakteriophäophytin  $a_{Gg}$  (4; DC., MC/Acetonitril 4:1,  $R_f$  0,6; nach Elution mit MC/Methanol 19:1 aus dem DC. und «Phäophyтинisierung» mit 1N HCl laut HPLC.  $<0,1\%$   $a_P$ ) und Bakteriophäophytin ( $R_f$  0,9, laut HPLC.-Gemisch  $a_{Gg}/a_P = 1:9$ ), vgl. [1], S. 116–118. Zur Chlorophyll/Phäophytin-Trennung wurde der nicht «phäophyтинisierte» Rohextrakt über  $Na_2SO_4$  getrocknet, nach Zusatz von 20 ml Methanol langsam<sup>28)</sup> im RV. bei 30° eingedampft. Das feste Rohprodukt wurde 4mal mit je 5 ml Methanol übergossen, die Lösung jeweils abpipettiert, filtriert und im RV. eingedampft. Der methanol-unlösliche Rückstand wurde in Äther aufgenommen. Nach Zusatz von Methanol wurden die Lösungsmittel im RV. entfernt. Das auf der Kolbenwand verteilte Material wurde dann mit 6 ml Methanol gewaschen, das ungelöste rote Phäophytin verworfen, die Lösung mit den ersten Methanolextrakten vereinigt und eingedampft (RV.). Dieses Produkt wurde nochmals auf die gleiche Weise 4mal mit je 2,5 ml Methanol digeriert, wobei ein violetter Rückstand blieb (verworfen). Die Methanol-Lösung des Bakterio-



Fig. 4.  
 $^1H$ -NMR.-Spektrum von  
Bakteriophäophytin  $a_P$  (1) in  $CDCl_3$   
(0,08M)

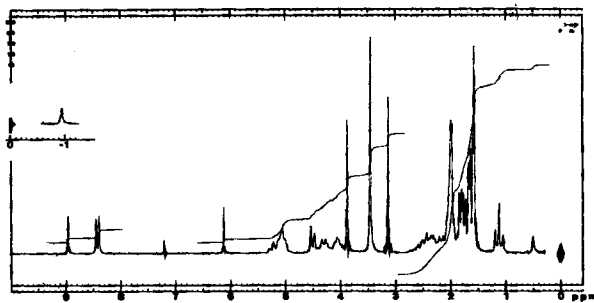


Fig. 5.  
 $^1H$ -NMR.-Spektrum von  
Bakteriophäophytin  $a_{Gg}$  (2) in  $CDCl_3$   
(0,14M)

<sup>45)</sup> Trennung nach vorsichtigem Schütteln; die Phasengrenze war bei gedämpftem Licht schwierig zu erkennen, da beide Schichten intensiv gefärbt waren.

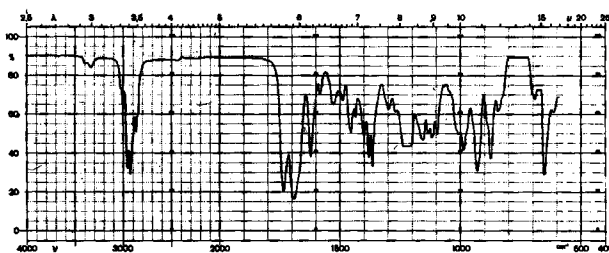


Fig. 6.  
IR-Spektrum von  
Bakteriophäophytin  $a_P$  (1) in  $CHCl_3$

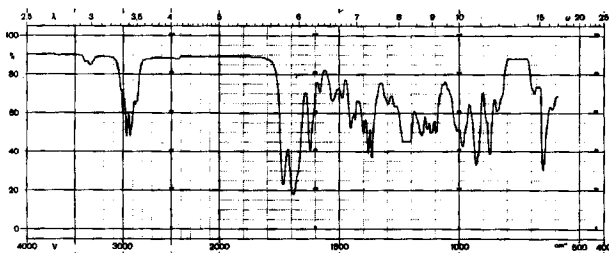


Fig. 7.  
IR-Spektrum von  
Bakteriophäophytin  $a_G$  (2) in  $CHCl_3$

chlorophylls  $a_G$  (4) wurde nach Eindampfen im RV. an Kieselgel chromatographiert<sup>46</sup>): Das rohe 4 wurde in 4 ml Benzol/Aceton 19:1 gelöst aufgetragen und zuerst mit 150 ml dieses Gemisches ( $\rightarrow$  Phäophytin + farblose Verbindungen), dann rasch mit 100 ml Benzol/Aceton 3:1 ( $\rightarrow$  4) und schliesslich mit 200 ml Benzol/Aceton 1:1 eluiert (alle Gemische enthielten 100 mg/l BHT<sup>39</sup>). Die mittels DC. (MC/Acetonitril 4:1) geprüften, vereinigten Produktfraktionen enthielten laut HPLC. ausser 4 noch Spuren von Bakteriophäophytin  $a_G$  (2; vermutlich durch spontane «Phäophytinisierung» von 4 gebildet) und Allomer sowie eine nichtidentifizierte farblose Komponente<sup>47</sup>). Eine Lösung des rohen 4 in 20 ml MC<sup>24</sup> wurde unter Argon mit 20 ml 1N HCl<sup>29</sup> bis zum Verschwinden der Bande bei 580 nm im UV/VIS.-Spektrum geschüttelt, die organische Phase mit 20 ml Puffer pH 7 gewaschen. Die Wasserphasen wurden mit 30 ml MC<sup>24</sup> nachextrahiert, die vereinigten Lösungen über  $Na_2SO_4$  getrocknet und im RV. eingedampft. Das so erhaltene Bakteriophäophytin  $a_G$  (2) wurde in 2 ml MC<sup>24</sup> gelöst, mit 2 ml Methanol verdünnt, 16 Std. bei RT. im nicht ganz verschlossenen Kolben stengelassen, dann der Niederschlag abfiltriert, mit 8 ml Methanol gewaschen und i.V. getrocknet (110 mg, Gehalt<sup>31</sup>) an 2 ca. 91%). Die weitere Reinigung erfolgte durch je 2maliges Lösen in MC<sup>24</sup>, Verdünnen mit Methanol, Eindampfen im RV. und Waschen des festen 2 mit 6 ml Methanol. Zur Umfällung wurde der in 25 ml Aceton<sup>29</sup> gelöste Rückstand (100 mg, DC.: roter Produktfleck und 2 rote Nebenprodukte mit kleinerem Rf-Wert) mit 75 ml siedendem Methanol<sup>32</sup> versetzt, unter Argon langsam auf RT. abkühlen gelassen, der Niederschlag mit 4 ml Methanol<sup>32</sup> bzw. 2 ml Äther gewaschen und 20 Std. i.HV. bei RT. getrocknet (81 mg): DC. (Hexan/Aceton 2:1) einheitlich, Rf 0,51<sup>35</sup>). HPLC. im System I ( $\lambda = 749$ , 280, 230 nm<sup>36</sup>): Bakteriophäophytin  $a_G$  (2),  $t = 21,5$ ,  $k' = 3,48$ ,  $N = 13500$ ;  $\leq 0,2\%$  Bakteriophäophytin  $a_G$  (2'; s. unten) bei  $t = 18,4$ ;  $\leq 0,2\%$  Bakteriophäophytin  $a_P$  (1) bei  $t = 18,8$ ; 5 weitere Verunreinigungen<sup>48</sup> im Bereich  $t = 36-45$  (total ca. 0,5%); im System II ( $\lambda = 749$  nm): 2,  $t = 26,2$ ,  $k' = 4,24$ ,  $N = 9800$ ;  $\leq 0,4\%$  1,  $t = 22,2$ ;  $\leq 1,0\%$  2',  $t = 24,2$ ; im System III ( $\lambda = 749$  nm; partiell oxydierte Probe<sup>48</sup>): 2,  $t = 24,0$ ,

<sup>46</sup>) 100 g Kieselgel 60 (Merck, Korngrösse 0,2–0,063 mm, 2 Std. bei 0,1 Torr/RT. getrocknet und dann mit Argon begast) in 400 ml Benzol/Aceton 19:1 unter Zusatz von 40 mg BHT<sup>39</sup>) aufgeschlämmt, i.V. evakuiert, mit Argon begast; Säule 25 mm  $\varnothing$  mit Aluminiumfolie umwickelt (Lichtschutz), Kieselgel vor Substanzaufgabe 1 cm hoch mit Quarzsand überschichtet.

<sup>47</sup>) Der Anteil an Bakteriophäophytin  $a_P$  (1) betrug vor der Chromatographie noch ca. 0,8%; für weniger hohe Reinheitsansprüche genügt also die Umfällung, zumal bei der Chromatographie gewisse Verluste infolge Zersetzung von labilem 4 auf dem Kieselgel zu polaren, blauen Produkten trotz rascher Elution eintreten.

<sup>48</sup>) Oxydative Folgeprodukte von 2 (vgl. allg. Teil): DC. mit MC/Acetonitril 19:1, Rf 0,02–0,15. – HPLC. im System I: vgl. die abgebildeten Chromatogramme in [1], S. 129, 220.

$k' = 2,48$ ,  $N = 8500$ ;  $\leq 1,0\%$  **2'**,  $t = 19,7$ ;  $\leq 0,2\%$  **1**,  $t = 21,2$ ; Verunreinigungen bei  $t = 25,6/57,0/69,5$  (total ca. 12%); Chromatogramme abgebildet in [1], S. 129 bzw. 221-222. - UV./VIS. ( $c = 69,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ; s. Fig. 3): 749 (4,855), 678 (3,978), 622 (3,477), 525 (4,452), 493 (3,740), 458 (3,362), 384 (4,785), 357 (5,053), 230 (4,369); min. 697 (3,881), 637 (3,431), 555 (2,86), 499 (3,699), 469 (3,279), 440 (3,146), 377 (4,732), 272 (3,898), 222 (4,332). - CD. ( $c = 15,8 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{49}$ ); abgebildet in [1], S. 29):  $\lambda_m = 520$  (-4,4), 487 (-1,0), 405 (+0,4), 384 (-2,5), 355 (+10,2), 318 (+2,3), 301 (-0,8), 283 (-0,8), 240 (+10,5);  $\lambda_0$  bei 560, 440, 396, 379, 306, 278, 223; laut Kontroll-HPLC. nach Aufnahme des Spektrums ca. 1% Epimer **2'**. - IR. ( $c = 5,0\%$ , s. Fig. 7): 3400w, 3340w, 3030w, 3005m, 2960m, 2925m, 2870w, 1735s, 1690s, 1620m, 1580w, 1530w, 1490w, 1453m, 1435m, 1400m, 1380s, 1365s, 1297w, 1270w, 1155m, 1130m, 1115m, 1095m, 1010m, 985m, 930s, 875s, 843w, 690w, 650s, 610w. -  $^1\text{H-NMR}$ . (0,14M; s. Fig. 5)<sup>38</sup>): - 0,94/0,50 (2s/2 HN); 1,12 (t/ $J = 7/\text{H}_3\text{C}(8^2)$ ); 1,57 (s/ $\text{H}_3\text{C}(G7^1)$ ,  $\text{H}_3\text{C}(G11^1)$ ,  $\text{H}_3\text{C}(G15^1)$ ); 1,64/1,67 (2s/ $\text{H}_3\text{C}(G3^1)$ ,  $\text{H}_3\text{C}(G16^1)$ ); 1,76/1,80 (2d/ $J = 7/\text{H}_3\text{C}(7^1)$ ,  $\text{H}_3\text{C}(18^1)$ ); 1,9-2,1 (Signalhaufen/H<sub>2</sub>C von G4, G5, G8, G9, G12 und G13); 2,1-2,8 (Signalhaufen/H<sub>2</sub>C(8<sup>1</sup>), H<sub>2</sub>C(17<sup>1</sup>), H<sub>2</sub>C(17<sup>2</sup>)); 3,14 (s/ $\text{H}_3\text{C}(3^2)$ ); 3,46 (s/ $\text{H}_3\text{C}(2^1)$ ,  $\text{H}_3\text{C}(12^1)$ ); 3,88 (s/ $\text{H}_3\text{CO-OC}(13^3)$ ); ca. 4,05 (m/HC(8), HC(17)); ca. 4,31 (m/HC(7), HC(18)); 4,51 (d/ $J = 7/\text{H}_2\text{C}(G1)$ ); ca. 4,9-5,35 (Signalhaufen mit t ( $J = 7$ )/HC(G2), HC(G6), HC(G10), HC(G14)); 6,12 (s/HC(13<sup>2</sup>)); 8,39 (s/HC(20)); 8,45 (s/HC(10)); 8,96 (s/HC(5)). -  $^{13}\text{C-NMR}$ . (0,45M, abgebildet in [1], S. 135)<sup>38</sup>): 10,7/11,4 (2qa/C(2<sup>1</sup>), C(12<sup>1</sup>)); 13,2 (qa/C(8<sup>2</sup>)); 15,9 (2qa?/C(G7<sup>1</sup>), C(G11<sup>1</sup>)); 16,3 (qa/C(G3<sup>1</sup>)); 17,6 (qa?/C(G15<sup>1</sup>)); 22,8 (2qa?/C(7<sup>1</sup>), C(18<sup>1</sup>)); 25,6 (?/C(G16)); 26,2/26,5/26,7 (3t/C(G5), C(G9), C(G13)); 30,0 (2t?/C(8<sup>1</sup>), C(17<sup>1</sup>)); 31,1 (t/C(17<sup>2</sup>)); 33,1 (qa/C(3<sup>2</sup>)); 39,4 (t/C(G4)); 39,6 (2t?/C(G8), C(G12)); 48,8/49,7/50,7/54,8 (4d/C(7), C(8), C(17), C(18)); 52,6 (qa/CH<sub>3</sub>O-C(13<sup>3</sup>)); 61,3 (t/C(G1)); 64,4 (d/C(13<sup>2</sup>)); 95,8/97,5/99,4 (3d/C(5), C(10), C(20)); 108,1 (s/C(15)); 118,0 (d/C(12)); 121,0 (s\*); 123,4/124,0/124,2 (3d/C(G6), C(G10), C(G14)); 128,5 (s\*); 130,8 (s/C(G15)); 132,8 (s\*); 134,6/135,1 (2s/C(G7), C(G11)); 136,2/136,7/138,1/138,9 (4s\*); 142,0 (s/C(G3)); 147,9/157,9/163,3 (3s\*); 169,5/169,4 (2s/C(13<sup>2</sup>)\*); 170,8 (s\*); 172,6 (s/C(17<sup>3</sup>)); 188,7 (s/C(13<sup>1</sup>)); 198,3 (s/C(3<sup>1</sup>)); \* = Signale der 12 quartären C im Ring. - EI./MS.<sup>50</sup>): kein M<sup>+</sup>, Pikmuster stark von der Zuführungstemp. abhängig (s. [1], S. 124), u.a. 824 (M<sup>+</sup> - CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, Pyrolyse!), 552 (M<sup>+</sup> - CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> - C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>, McLafferty-Eliminierung), 272 (Alkenfragment C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>, typisch für Geranylgeranylester [18] [19]) und intensive Pike bei 93, 81, 69 (vgl. MS. von Geranylgeraniol [19]). - FD./MS. (22 mA/3%): 886 (6), 885 (16), 884 (75), 883 (M + H<sup>+</sup>, 100). C<sub>55</sub>H<sub>70</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> Ber. C 74,80 H 7,99 N 6,34% Gef. C 74,77 H 8,01 N 6,41%

**Epimerisierung von Bakteriophäophytin a<sub>G</sub> (2).** Wie in 1.1 beschrieben wurden 3,3 mg (3,7 μmol) Bakteriophäophytin a<sub>G</sub> (2) in Benzol/Triäthylamin 9:1 äquilibriert. Das Epimerengemisch<sup>14</sup>) zeigte im DC. (Hexan/Aceton 2:1)<sup>35</sup>) eine Hauptkomponente (R<sub>f</sub> 0,48) und eine Verunreinigung<sup>48</sup>) (R<sub>f</sub> 0,34). HPLC.: Epimerenverhältnis 2/2' (Verhältnis der Signalflächen) = 4,6 ± 0,3 (Gleichgewichtsgemisch, vgl. Fussnote 40), Mittelwert aus 3 Chromatogrammen in den Systemen I und III ( $\lambda = 749 \text{ nm}$ )<sup>41</sup>); Verunreinigungen<sup>48</sup>) bei  $t = 36-45$ . Eine Probe (0,5 mg) Epimerengemisch in 16 μl MC<sup>24</sup>) wurde im HPLC.-System I wie in 1.1 beschrieben getrennt: 260 μg<sup>37</sup>) (62%) Hauptkomponente; Reinheit laut HPLC. im System I ( $\lambda = 749 \text{ nm}$ ) ≥ 91% (zu ca. 1,5% epimerisiert, 5 Verunreinigungen<sup>48</sup>) zu je 1,5% im Bereich  $t = 36-45$ ), dem Mischchromatogramm zufolge identisch mit **2**<sup>41</sup>). - UV./VIS.- und CD.-Spektren ( $c = 16,8 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ , Konzentration aus OD. (749 nm) mit  $\epsilon = 71600$  bestimmt) im Bereich 800-300 nm (UV./VIS.; von 300-220 nm um 10-20% verminderte Extinktionen) bzw. 700-220 nm (CD.) innerhalb der Fehlergrenze in Übereinstimmung mit denen von Referenzmaterial **2**<sup>42</sup>).

54 μg<sup>43</sup>) (61%) Nebenkompente Bakteriophäophytin a<sub>G</sub> (2'); HPLC. im System I ( $\lambda = 749 \text{ nm}$ ): ≥ 95% **2'**,  $t = 20,3$ ,  $k' = 3,32$ ,  $N = 16100$  (Gehalt an **2** ≤ 5%). - UV./VIS. ( $c = 17,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{43}$ ), abgebildet in [1], S. 141): 751 (4,83, vgl. Fussnote 43), 680 (3,98), 624 (3,49), 526 (4,44), 493 (3,73), 460 (3,38), 385 (4,77), 358 (5,04), 230 (4,35); min. 698 (3,91), 640 (3,45), 560 (2,95), 501 (3,69), 471 (3,34), 440 (3,18), 377 (4,72), 274 (3,90), 222 (4,31). - CD. ( $c = 17,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{43}$ ), abgebildet in [1], S. 141):  $\lambda_m = 525$  (+21,2), 493 (+3,0), 436 (-0,3), 386 (+26,8), 356 (-20,2), 320 (-1,7), 296 (-9,8), 268 (-2,6),

<sup>49</sup>) Das Material wurde unmittelbar vor der Aufnahme des Spektrums mittels präparativer HPLC. im System I nachgereinigt (vgl. allg. Teil und Fussnote 48) und die Konzentration aus den jeweiligen OD mit  $\epsilon(357 \text{ nm}) = 113000$  (für Spektrum der Referenzsubstanz **2** in 1.2) bzw.  $\epsilon(749 \text{ nm}) = 71600$  (für Spektrum von **2 ex RC.** in 2.4) ermittelt.

<sup>50</sup>) Probe unmittelbar vor Aufnahme durch präparative HPLC. im System II nachgereinigt.



255 (+1,2);  $\lambda_0$  bei 610–560, 461, 418, 366, 259, 251; Fehler infolge des Gehalts an **2** ( $\leq 5\%$  laut Kontroll-HPLC., identisch vor und nach Aufnahme des Spektrums) bei 355 und 240 ( $\leq +0,5$ ) bzw. bei 520 ( $\leq -0,22$ ).

Epimerisierung einer Probe von **2'** unter den oben beschriebenen Bedingungen führte laut HPLC. zum Gleichgewichtsgemisch **2/2'**=4,9 (nebst 5 Folgeprodukten<sup>48</sup>), je  $\leq 1\%$ ; die Identität der Hauptkomponente dieses Gemisches mit authentischem **2** wurde durch ein Mischchromatogramm bewiesen (vgl. [1], S.140–141).

**2. Pigmente aus Reaktionszentren.** – 2.1. *Präparation und Charakterisierung der RC.* Die RC. wurden von *M. Snozzi* mit Lauryldimethylaminoxid (LDAO) aus den Chromatophoren von *Rhodospirillum rubrum* *G-9*<sup>49</sup> herausgelöst und durch Gelfiltration (Sephacrose 6B) und Ionenaustauschchromatographie (DEAE-Cellulose) gereinigt<sup>16</sup>; Ausbeute an ungereinigten RC. nach LDAO-Extraktion bez. auf OD. (870 nm) der Chromatophoren ca. 0,9%; dies dürfte etwa der Hälfte der insgesamt vorhandenen RC. entsprechen (vgl. [1], S.143 und [50]); Ausbeute über die beiden Reinigungsstufen ca. 50% (alle Ausbeuten UV/VIS./NIR.-spektroskopisch bestimmt). Diese RC.-Lösungen erhielten noch LDAO, NaCl, Tris(hydroxymethyl)aminomethan (= Aminomethyl(trimethanol); Tris-Puffer), Lipide und Kohlehydrate [35b] [35c], aber laut SDS(Natriumdodecylsulfat)-Gel-Elektrophorese und UV/VIS./NIR.-Spektrum keine «Fremdkomponenten»; sie wurden anschliessend durch Ultrafiltration (Amicon, Membrantyp UM20E) eingengt und gegen Tris-Puffer dialysiert (vgl. [1], S.147).

Zur Charakterisierung der für die folgende Pigmentanalyse verwendeten RC.-Lösung (für Eigenschaften weiterer RC.-Lösungen vgl. [1], S.144–162) wurde eine verdünnte Probe während der Aufnahme des UV/VIS./NIR.-Spektrums bei  $\lambda=368$  nm belichtet, wobei der photoaktive Pigment-Protein-Komplex *P870* zu 94%<sup>51</sup>) ausbleichte (s.Fig. 8); diese Oxydation war im Dunkeln zu ca. 98%<sup>51</sup>) reversibel (Seitenbelichtungs-Apparatur vgl. [1], S.57–60). Die gleichen spektralen Änderungen konnten auch durch Zugabe von festem Kalium-hexacyanoferrat(III) zur RC.-Lösung erreicht werden (Oxydationsgrad 93%<sup>51</sup>), vgl. Abb. in [1], S.165, die Reversibilität der Ausbleichung (nach anschliessender Reduktion mit Kaliumborhydrid) betrug ca. 96%<sup>51</sup>) (Einzelheiten vgl. [1], S.162–166). In beiden Versuchen war aber die Extinktion um 770 nm der wieder reduzierten Lösung infolge eines irreversiblen Bleichungsanteils [34a] («nicht proteingebundenes» Bakteriochlorophyll (*B770*)) geringer als in der Ausgangslösung. Aus dieser Differenz wurde ein Gehalt von ca. 15  $\mu\text{mol/l}$  *B770* geschätzt (zur Methode vgl. [1], S.148), gegenüber  $60,0 \pm 0,2 \mu\text{mol/l}$  *P870*<sup>52</sup>); d.h. ca. 6% des gesamten Bakteriochlorophylls der RC.-Lösung (berechnet unter der Annahme von 4 Bakteriochlorophyll a pro RC. [7e]) waren «nicht proteingebunden». – OD.-Werte der RC.-Lösung:  $8,40 \pm 0,02$  (868 nm);  $18,3 \pm 0,1$  (804 nm);  $5,68 \pm 0,02$  (773 nm).

2.2. *Extraktion [3] und Trennung der RC.-Pigmente* (weitere Pigmentanalysen in [1], S.167–200). Unter Argon wurden  $5,5 \pm 0,2$  ml ( $330 \pm 13$  nmol *P870*<sup>52</sup>)) RC.-Lösung in einem Scheidetrichter mit 1 ml Puffer pH 7 verdünnt. Nach Zugabe einer Spatelspitze Kaliumborhydrid (zur Verbesserung der Pigmentaushute wurden die RC. in reduziertem Zustand extrahiert [8]) wurde während 2 Min. ein

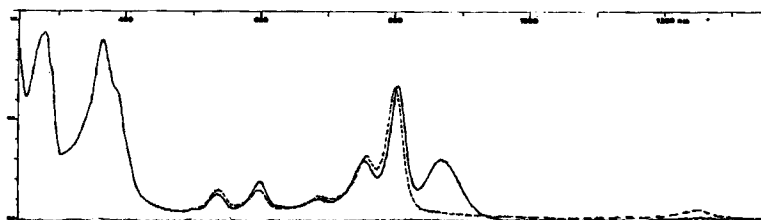


Fig.8. UV/VIS./NIR.-Spektrum der RC.-Präparation ( $c(P870)=1,07 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{52}$ ): — dunkel, ..... während gleichzeitiger Seitenbelichtung bei  $\lambda=368$  nm (zur Interpretation vgl. z.B. [36])

<sup>51</sup>) Zur Bestimmung des Oxydationsgrades der RC.-Lösungen und der Reversibilität aus OD.(868 nm) reduzierter und oxydierter Lösungen s. [1], S.156–157.

<sup>52</sup>) Konzentration bzw. Menge von *P870* aus OD.(868 nm) mit  $\epsilon(868 \text{ nm})=140000$  bestimmt (Wert aus [3] für RC. von *Rhodospseudomonas sphäroides* übernommen; vgl. [1], S.39, 148, 154 und 170).

schwacher Argonstrom durch die Lösung geleitet. Dann wurden innert 15 Min. 55 ml Aceton<sup>29</sup>/Methanol<sup>32</sup>) 7:2 zugetropft, die Suspension<sup>53</sup>) wurde mit 66 ml Hexan verdünnt, mit 28 ml Puffer pH 7/ges. NaCl-Lösung 1:1 geschüttelt und die wässrige Phase unter Argon mit 110 ml Hexan extrahiert. Die beiden organischen Phasen wurden mit 50 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen, über 20 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, durch eine Glasfilternutsche G4 filtriert, die Gefässe mit 30 ml Hexan und 50 ml Äther<sup>24</sup>) nachgespült und die Lösungsmittel im RV. entfernt. Der 90 Min. getrocknete (HV./RT.) Rückstand wies im DC. (MC<sup>24</sup>)/Acetonitril 4:1) blaues Bakteriochlorophyll a (Rf 0,39) nebst zwei blauen Flecken bei Rf ca. 0,4 und 0,09 (je ca. 5%, vermutlich 13<sup>2</sup>-Epimer und Oxydationsprodukt, vgl. allg. Teil), rotes Bakteriophäophytin a (Rf 0,84) sowie einen gelben (Rf ca. 0,9) und zwei grüne<sup>54</sup>) Flecken (Rf ca. 0,01 bzw. 0,15) geringer Intensität auf (DC. in 3 verschiedenen Laufmitteln abgebildet in [1], S.202). – UV./VIS. (Produkt in wenig Äther<sup>24</sup>) gelöst, durch eine Nutsche G4 filtriert und auf 20 ml verdünnt, s. Fig. 9): OD. (577 nm)=1,42±0,01 und OD. (526 nm)=1,04±0,01, entsprechen 1,36±0,07 µmol Bakteriochlorophyll a und 0,617±0,04 µmol Bakteriophäophytin a<sup>19</sup>), d.h. Pigmentverhältnis Chlorophyll/Phäophytin ca. 2,2;  $\lambda_{\max}$ /relative OD.: 759/100, 577/26, 526/19, 384/82, 357/141. – Die nach dem analytischen DC. verbliebene Hauptmenge (95%) des Rohextraktes wurde in MC<sup>24</sup>) gelöst und auf einer 20×20-cm-Silgurplatte mit Hexan/Aceton<sup>29</sup>) 2:1 chromatographiert (25 Min.). Die beiden Hauptpigmentzonen (rot bzw. blau) wurden mit Aceton<sup>29</sup>) extrahiert und die Lösungen im RV. bei RT. eingedampft. Auf der Platte blieben ca. 20% der Pigmente zurück (bedingt durch die notwendige rasche Isolierung der Pigmentzone bei stark gedämpftem Licht), die wegen ihrer Labilität nicht nachträglich eluiert wurden.

2.3. *Bakteriophäophytin a: Reinigung und Identifizierung.* Die nach der DC.-Trennung erhaltene Bakteriophäophytin-Fraktion (Ausbeute 315 nmol<sup>37</sup>), 54% bzgl. Pigmentmenge im Rohextrakt) zeigte folgende Eigenschaften: UV./VIS.-Spektrum zwischen 850 und 300 nm identisch mit dem Spektrum der Referenzsubstanz 1 (s. 1.1), unterhalb 300 nm leicht erhöhte Extinktionen. – Im DC. (MC<sup>24</sup>)/Acetonitril 19:1) nur ein roter Pigmentfleck, Rf ca. 0,42 und 3 farblose (nicht porphinoide) Komponenten. – HPLC. im System II ( $\lambda$ =750 nm/Aufnahmebereich bis t=42, Detektion ab t=28 um den Faktor 100 verstärkt, s. Fig. 10): 0,9% Bakteriophäophytin ap (1'), t=20,6, k'=3,20; 96,5% Bakteriophäophytin ap (1), t=21,9, k'=3,47, N=8300; 2,3% Bakteriophäophytin ag (2), t=26,4, k'=4,39; 0,3% Allomer (?), t=32,3, k'=5,59, N=5600. Bei  $\lambda$ =280 nm wurden ausser diesen Komponenten (Retentionszeiten und Mengen wie bei  $\lambda$ =750 nm) noch Spurensignale zwischen t=6,4 und 9 von 5 unbekannten Komponenten nachgewiesen. – 283 nmol<sup>37</sup>) Phäophytin wurden in 3 Portionen im HPLC.-System II gereinigt. Die aufgefundenen Hauptfraktionen (t=21,8) zeigten laut analytischer HPLC. (Systeme I und III,  $\lambda$ =240 nm; Substanzverbrauch 15%) noch eine unbekannte unpolare, vermutlich bei der Chromatographie eingeschleppte Verunreinigung. Das Material wurde deshalb in einem Glühröhrchen in 200 µl MC<sup>24</sup>) gelöst, mit 200 µl Hexan versetzt und über Nacht (RT./im Dunkeln) eintrocknen gelassen. Der Rückstand wurde 4mal mit je 50 µl Hexan gewaschen (Entfernung der Verunreinigung) und im Stickstoffstrom getrocknet: 182 nmol<sup>37</sup>) (76%) Bakteriophäophytin ap (1). HPLC. im System I ( $\lambda$ =240 nm/Aufnahmebereich bis t=39): ≥ 98% 1, t=19,1, k'=3,06,

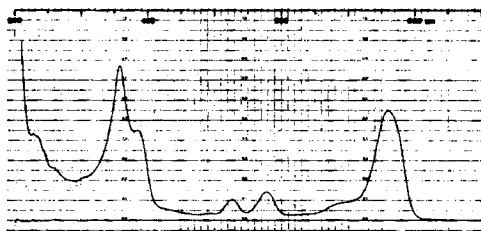


Fig. 9.  
UV./VIS.-Spektrum des RC.-Rohextrakts  
in Äther

<sup>53</sup>) Der Verzicht auf die Abtrennung der unlöslichen RC.-Bestandteile führte zu Pigmentverlust (ca. 10%); durch Abzentrifugieren wurden bei einer anderen Analyse höhere Pigmentaubeuten im Rohextrakt (95–98%) erzielt; vgl. [1], S. 170, 179–180 und 238.

<sup>54</sup>) Polare typische Oxydationsprodukte des Bakteriochlorophylls a [24c] [51] mit kleinen Rf-Werten, die nicht bei allen RC.-Analysen auftraten (wahrscheinlich Präparationsartefakte). Sie wurden bei der DC.-Abtrennung der Bakteriochlorophyll-Fraktion entfernt (vgl. Fussnote 56).

$N = 14200$ ;  $\leq 2\%$   $^{13}\text{C}$ -Epimer  $1'$ ,  $t = 16,6$ ,  $k' = 2,53$ ; *Mischchromatogramme*<sup>55)</sup> von **1** ( $\lambda = 749$  nm): System I (abgebildet in [1], S.209):  $t = 18,2 \pm 0,1$ ,  $k' = 2,87 \pm 0,008$ ,  $N = 11460 \pm 940$ ; System II (s. Fig. 11a):  $t = 22,0 \pm 0,1$ ,  $k' = 3,49 \pm 0,09$ ,  $N = 8400 \pm 500$ , System III (abgebildet in [1], S.211):  $t = 21,2 \pm 0,1$ ,  $k' = 2,07 \pm 0,04$ ,  $N = 8500 \pm 520$ . - UV./VIS. ( $c = 47,1 \cdot 10^{-6} \text{M}^{37}$ ), abgebildet in [1], S.228): 749 (4,854, vgl. Fussnote 37), 678 (3,978), 623 (3,505), 525 (4,450), 492 (3,740), 458 (3,362), 385 (4,787), 357,5 (5,054), 230 (4,326); min. 697 (3,898), 638 (3,447), ca. 560 (2,98), 501 (3,708), 470 (3,322), 440 (3,176), 377 (4,735), 272 (3,881), 216 (4,230); im Bereich 850-250 nm mit dem Spektrum der Referenzsubstanz **1** innerhalb der Fehlergrenze übereinstimmend<sup>42)</sup>. - CD. ( $c = 10,07 \cdot 10^{-6} \text{M}^{37}$ ):  $\lambda_m = 519$  (-4,7), 487 (-1,4), 435-395 ( $> \pm 0,5$ ), 383 (-2,3), 366 (+9,0), 353 (+10,1), 316 (+2,0), 300 (-0,9), 283 (-0,9), 240 (+10,1);  $\lambda_0$  bei 378, 306, 276. Diese Daten stimmen im Bereich 700-220 nm innerhalb der Fehlergrenze mit dem Spektrum der Referenzsubstanz **1** überein<sup>42)</sup>; Ausnahme: Extremum bei 366 nm, welches im Referenzspektrum nur als Schulter erscheint (Kontroll-HPLC. nach Aufnahme des Spektrums: Gehalt an  $^{13}\text{C}$ -Epimer  $1' \leq 1,6\%$ ). - FD./MS. (14 mA/5%): 892 (8), 891 (30), 890 (65), 889 ( $M + H^+$ , 100).

2.4. *Bakteriochlorophyll a: Reinigung und Identifizierung als Bakteriophäophytin a*. Die nach DC.-Trennung erhaltene Bakteriochlorophyll-Fraktion (Ausbeute 587 nmol<sup>37)</sup>, 45% bzgl. Pigmentmenge im Rohextrakt) zeigte im DC. ( $\text{MC}^{24}/\text{Acetonitril}$  4:1) Flecken bei  $R_f$  ca. 0,05 (blaues Oxydationsprodukt, vgl. allg. Teil), ca. 0,3 (blau, Hauptkomponente) und ca. 0,4 (grün<sup>56)</sup>). - UV./VIS. ( $c = 58,7 \cdot 10^{-6} \text{M}^{37}$ ), s. Fig. 12): 771 (4,975, vgl. Fussnote 37), 573 (4,314), 392 (4,688), 357 (4,857), 303 (4,283), 255 (4,389), Sch. 710 (4,03); min. 618 (3,230), 500 (3,079), 384 (4,647), 308 (4,276), 284 (4,170), 222 (4,230); innerhalb der Fehlergrenze Übereinstimmung (Extinktionen der Minima leicht erhöht) mit

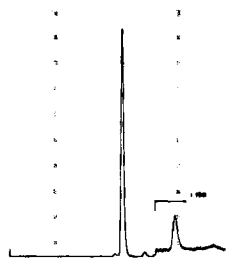


Fig. 10. HPLC. (System II,  $\lambda = 750$  nm) der Bakteriophäophytin-Fraktion ex RC. nach DC.-Abtrennung

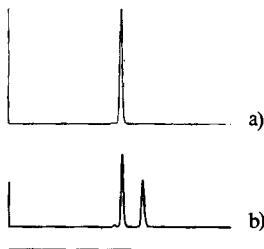


Fig. 11. Misch-HPLC. im System II ( $\lambda = 749$  nm). a) (1:1)-Gemisch Bakteriophäophytin  $a_P$  (**1**; Referenzmaterial)/Bakteriophäophytin  $a_P$  (**1**; Material ex RC.). b) (1:1)-Gemisch Bakteriophäophytin  $a_P$  (**1**) ex RC./Bakteriophäophytin  $a_{Gg}$  (**2**; Referenzmaterial)

- <sup>55)</sup> Für die Misch-HPLC. wurde je eine Probe Referenzmaterial, eine Probe ex RC. und ein (1:1)-Gemisch (max. Abweichung 2:3) beider Proben unter gleichen Bedingungen (d.h. unmittelbar nacheinander) eingespritzt und die für den Identitätsbeweis entscheidende Signalbreite durch Bestimmung der theoretischen Bodenzahlen  $N$  verglichen; die 3 Werte für  $N$  stimmten in allen Fällen innerhalb der Fehlergrenze überein. Die jeweils angegebenen  $t$ ,  $k'$  und  $N$  beziehen sich auf das Gemischsignal (vollständige Daten in [1], S.208 bzw. 219).
- <sup>56)</sup> Dieser grünen, im Vergleich zum Hauptpigment weniger polaren Nebenkomponente (im DC. meist von Bakteriochlorophyll  $a_{Gg}$  (**4'**) überdeckt und daher nicht abgetrennt) dürfte die Struktur des 7,8-Bis-dehydro-bakteriophäophytins  $a \equiv [3\text{-Acetyl}]\text{-phäophytin a}$  [51] zukommen (Begründung in [1], S.216). Dieses Bakteriochlorophyll-Photooxydationsprodukt wurde vermutlich erst bei der Manipulation der Pigmente gebildet; vgl. [1], S.185, 187, 202, 212, 216, 223 und 231.

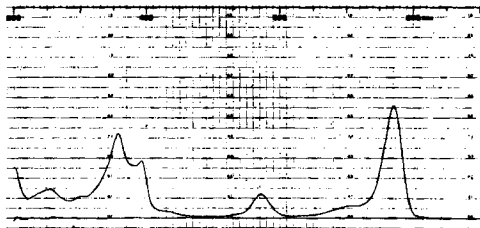


Fig. 12. UV/VIS-Spektrum der Bakterioklorophyll-a-Fraktion ex RC. in Äther ( $c = 58,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ;  $d = 0,1 \text{ cm}$ )

den publizierten Daten für Methyl-bakteriochlorophyllid a [38a] und Bakterioklorophyll a [38], vgl. Tabelle in [1], S. 233.

Diese Fraktion wurde, wie in 1.2 beschrieben, dekomplexiert (gleiche Lösungsmittelmengen) und ergab 486 nmol<sup>37)</sup> (87%) noch verunreinigtes Bakteriophäophytin a mit folgenden Daten: UV/VIS-Spektrum mit Extinktionsabweichungen vom Spektrum des Referenzmaterials 2 bei  $\lambda_{\text{max}} = 682$  (+10%, vermutlich infolge Anwesenheit des grünen Oxydationsprodukts<sup>56)</sup>) sowie bei 622 (-10%), 492 (-16%), 458 (-10%). - Im DC. rotes Hauptpigment, 5 rote und 2 grüne Verunreinigungen. - Analytische HPLC. im System II ( $\lambda = 750 \text{ nm}$ ; s. Fig. 13)<sup>57)</sup>: 0,3% Bakteriophäophytin a<sub>P</sub> (1),  $t = 22,2$ ,  $k' = 2,22$ ; 8,0% Bakteriophäophytin a'<sub>Gg</sub> (2'),  $t = 24,2$ ,  $k' = 2,51$ ,  $N = 9400$ ; 71,7% Bakteriophäophytin a<sub>Gg</sub> (2),  $t = 26,2$ ,  $k' = 2,80$ ,  $N = 4900$ ; 20,0% Allomer (?),  $t = 38,4$ ,  $k' = 4,57$ ,  $N = 7000$ ; weitere polare Verunreinigungen (vgl. DC.) vermutlich ausserhalb des Aufnahmebereichs (bis  $t = 50$ ); im gleichen System, aber mit  $\lambda = 280 \text{ nm}$  wurden zusätzlich zu diesen Signalen (identische Retentionszeiten, ähnliche relative Mengen) noch mehrere kleine Pike bei  $t = 5-6$  und  $t = 13,1$  ( $\leq 1\%$ ) nachgewiesen. - Reinigung des rohen Bakteriophäophytins 2 durch präparative HPLC. (System II) lieferte 193 nmol (42% bzgl. Rohprodukt<sup>37)</sup>) Bakteriophäophytin a<sub>Gg</sub> (2): HPLC. im System I ( $\lambda = 240 \text{ nm}$ /Aufnahmebereich bis  $t = 50$ ): 93% 2,  $t = 21,3$ ,  $k' = 3,53$ ,  $N = 14000$ ; 0,6% 13<sup>2</sup>-Epimer 2',  $t = 18,2$ ,  $k' = 2,87$ ; 5 Oxydationsprodukte (da Probe 12 Wochen bei  $-25^\circ$  gelagert, vgl. allg. Teil) im Bereich  $t = 36-46$  (total ca. 6%); System III ( $\lambda = 240 \text{ nm}$ /Aufnahmebereich bis  $t = 29$ ): 96% 2,  $t = 16,2$ <sup>58)</sup>,  $N = 6900$ ; 0,4% 2',  $t = 13,2$ ; 3,0% grünes Oxydationsprodukt<sup>56)</sup>,  $t = 17,7$ ; 0,4% Fett?,  $t = 5,4$ . Mischchromatogramme<sup>55)</sup> von 2 ( $\lambda = 749 \text{ nm}$ ): System I (abgebildet in [1], S. 220):  $t = 23,3 \pm 0,1$ ,  $k' = 3,96 \pm 0,10$ ,  $N = 13570 \pm 930$ ; System II (s. Fig. 14a):  $t = 26,9 \pm 0,1$ ,  $k' = 4,49 \pm 0,11$ ,  $N = 9930 \pm 510$ ; System III (abgebildet in [1], S. 222):  $t = 24,2 \pm 0,1$ ,  $k' = 2,51 \pm 0,05$ ,  $N = 8660 \pm 480$ . - UV/VIS. ( $c = 48,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ <sup>59)</sup>, abgebildet in [1], S. 229): 749 (4,855, vgl. Fussnote 59), 680 (4,025), 622 (3,519), 525 (4,453), 493 (3,732), 459 (3,362), 384 (4,799), 357 (5,057), 230 (4,365); min. 698 (3,908), 637

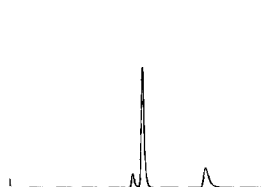


Fig. 13. HPLC. (System II,  $\lambda = 750 \text{ nm}$ ) der Bakterioklorophyll-Fraktion ex RC. nach DC-Abtrennung und «Phäophytinisierung»

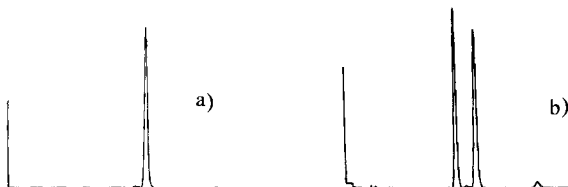


Fig. 14. Misch-HPLC. im System II ( $\lambda = 749 \text{ nm}$ ). a) (1:1)-Gemisch Bakteriophäophytin a<sub>Gg</sub> (2; Referenzmaterial)/Bakteriophäophytin a<sub>Gg</sub> (2; Material ex RC.). b) (1:1)-Gemisch Bakteriophäophytin a<sub>Gg</sub> (2) ex RC./Bakteriophäophytin a<sub>P</sub> (1; Referenzmaterial, vgl. Fig. 11)

<sup>57)</sup> Zuordnung der Hauptkomponente durch die weiter unter folgenden spektroskopischen Daten und Mischchromatogramme bewiesen; Identifizierung der übrigen Verbindungen durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen von Referenzmaterial unter gleichen Bedingungen (vgl. Teil 1).

<sup>58)</sup> Bei dieser Messung infolge erhöhter Flussrate wesentlich kürzere Retentionszeit ( $t = 16,2$  statt  $24,2$ ) von 2.

<sup>59)</sup> Konzentration aus OD.(749 nm) mit  $\epsilon = 71600$  (Wert für Bakteriophäophytin a<sub>Gg</sub>, s. 1.2) bestimmt.

(3,462), *ca.* 560 (2,92), 500 (3,716), 468 (3,322), 443 (3,279), 377 (4,748), 272 (3,898), 222 (4,334). Im Bereich 850–220 nm sind diese Daten innerhalb der Fehlergrenze mit dem Spektrum der Referenzsubstanz **2** übereinstimmend<sup>42)</sup>, ausser Extinktionsabweichungen bei 680 (+10%, vermutlich infolge Anwesenheit des grünen Oxydationsprodukts<sup>56)</sup>) und 384 (+3%) sowie bei  $\lambda_{\min}=698$  (+6%), 443 (+26%) und 377 (+4%). – CD. ( $c=11,4 \cdot 10^{-6} \text{M}^{49)}$ :  $\lambda_m=521$  (–4,9), 487 (–1,5), 435 (–0,4), 401 (+0,5), 383 (–2,1), 355 (+10,1), 316 (+2,3), 302 (–0,9), 283 (–0,9), 240 (+10,9);  $i_0$  bei 445, 426, 395, 379, 306, 279, 224. Im Bereich von 700–220 nm sind diese Daten innerhalb der Messgenauigkeit mit dem Spektrum der Referenzsubstanz **2** übereinstimmend<sup>42)</sup>, Ausnahme: zusätzliches  $\lambda_m=435$ , möglicherweise vom grünen Oxydationsprodukt<sup>56)</sup>, das laut UV./VIS.-Spektrum der Messlösung vorhanden war (Kontroll-HPLC. im System I nach Aufnahme des CD.-Spektrums: Gehalt an 13<sup>2</sup>-Epimer **2'**  $\leq 2,6\%$ ; grünes Oxydationsprodukt im System I nicht nachweisbar). – FD./MS. (22 mA/5%): 931 (5), 929 (5), 917 (10), 916 (25), 915 (43), 901 (5), 900 (11), 899 (19), 898 (5), 897 (9), 886 (7), 885 (24), 884 (51), 883 ( $M+H^+$ , 100), 881 (6,  $2-2 \text{ H}$ , grünes Oxydationsprodukt<sup>56)</sup>); zusätzliche Signale von Oxydationsprodukten von **2** (vgl. [1], S. 217–218) im Bereich 899–901 ( $\leq 20$ ), 915–917 ( $\leq 43$ ), 931 (*ca.* 5) und 947 (*ca.* 3).

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E. Walter, «Die chemische Natur der Pigmente aus photosynthetischen Reaktionszentren von *Rhodospirillum rubrum* G-9<sup>+</sup>», Diss. ETH Zürich Nr. 6106, 1978.
- [2] R. K. Clayton, H. Fleming & E. Z. Szuts, *Biophys. J.* 12, 46 (1972).
- [3] D. W. Reed & G. A. Peters, *J. biol. Chemistry* 247, 7148 (1972).
- [4] M. van der Rest & G. Gingras, *J. biol. Chemistry* 249, 6446 (1974).
- [5] a) S. C. Straley, W. W. Parson, D. C. Mauzerall & R. K. Clayton, *Biochim. biophys. Acta* 305, 597 (1973); b) O. C. Mauzerall, *Fed. Proc.* 31, 885-Abstr. 3807 (1972).
- [6] a) L. Slooten, *Biochim. biophys. Acta* 314, 15 (1973); b) D. W. Reed & B. Ke, *J. biol. Chemistry* 248, 3041 (1973); c) G. Jolchine & F. Reiss-Husson, *FEBS Letters* 52, 33 (1975).
- [7] Erste vollständige Isolierung: D. W. Reed & R. K. Clayton, *Biochim. biophys. Res. Commun.* 30, 471 (1968). – Übersichtsartikel: a) R. K. Clayton, *Advan. Chem. Phys.* 19, 353 (1971); b) R. K. Clayton, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 2, 131 (1973); c) K. Sauer, 'Primary Events and the Trapping of Energy', in: Govindjee, 'Bioenergetics of Photosynthesis', Academic Press, New York 1974, S. 115; d) W. W. Parson & R. J. Cogdell, *Biochim. biophys. Acta* 416, 105 (1975); e) P. A. Loach, *Progr. bioorg. Chemistry* 4, 89 (1976); f) R. K. Clayton & W. R. Sistrom, 'The Photosynthetic Bacteria', Plenum Press, im Druck; g) P. L. Dutton, R. C. Prince & D. M. Tiede, *Photochemistry Photobiol.* 28, 939 (1978).
- [8] a) R. K. Clayton, *Photochemistry Photobiol.* 5, 669 (1966); b) S. C. Straley & R. K. Clayton, *Biochim. biophys. Acta* 292, 685 (1973).
- [9] T. Beugeling, L. Slooten & P. G. M. M. Barends-van de Beek, *Biochim. biophys. Acta* 283, 328 (1972).
- [10] a) H. Falk, G. Hoornaert, H.-P. Isenring & A. Eschenmoser, *Helv.* 58, 2347 (1975); b) H.-P. Isenring, E. Zass, K. Smith, H. Falk, J.-L. Luisier & A. Eschenmoser, *ibid.* 58, 2357 (1975); c) E. Zass, H.-P. Isenring, R. Etter, F. Thönen, G. Hoornaert, H. Falk & A. Eschenmoser, *ibid.*, in Vorbereitung.
- [11] S. Schoch, U. Lempert, H. Wieschhoff & H. Scheer, *J. Chromatog.* 157, 357 (1978).
- [12] H.-C. Chow, M. B. Caple & C. E. Strouse, *J. Chromatog.* 151, 357 (1978); M. B. Caple, H.-C. Chow & C. E. Strouse, *J. biol. Chemistry* 253, 6730 (1978).
- [13] K. Eskins, C. R. Scholfield & H. J. Dutton, *J. Chromatog.* 135, 217 (1977).
- [14] N. Risch, T. Kemmer & H. Brockmann, jr., *Liebigs Ann. Chem.* 1978, 585.
- [15] a) E. Zass, «Untersuchungen zum Einbau des Magnesiums in Liganden der Chlorophyll-Reihe», Diss. ETH Zürich Nr. 5965, aku-Fotodruck Zürich, 1977; b) R. Etter, Diss. ETH Zürich, in Vorbereitung.
- [16] N. Evans, D. E. Games, A. H. Jackson & S. A. Matlin, *J. Chromatog.* 115, 325 (1975).
- [17] M. Yoshiura, K. Iriyama & M. Shiraki, *Chemistry Letters* 1978, 281.
- [18] J. J. Katz, H. H. Strain, A. L. Harkness, M. H. Studier, W. A. Svec, T. R. Janson & B. T. Cope, *J. Amer. chem. Soc.* 94, 7938 (1972).
- [19] H. Brockmann, jr., G. Knobloch, I. Schweer & W. Trowitzsch, *Arch. Mikrobiol.* 90, 161 (1973).
- [20] a) A. Künzler & N. Pfennig, *Arch. Mikrobiol.* 91, 83 (1973); b) A. Gloe & N. Pfennig, *ibid.* 96, 93 (1974).

- [21] 'The Chlorophylls', Herausgeber L.P. Vernon & G.R. Seeley, Academic Press, New York 1966:  
a) H.H. Strain & W.A. Svec, 'Extraction, Separation and Isolation of the Chlorophylls', S. 21f.;  
b) J.J. Katz, R.C. Dougherty & L.J. Boucher, 'Infrared and Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Chlorophyll', S. 185–251; c) G.R. Seely, 'Structure and Chemistry of Functional Groups', S. 91–94.
- [22] J.H. Golden, R.P. Lindsey & G.H. Whitham, J. chem. Soc. 1958, 1725.
- [23] G. Knobloch, «Konstitution und absolute Konfiguration natürlicher Tetrapyrrolverbindungen», Diss. TU Braunschweig, Bönecke-Druck Clausthal-Zellerfeld 1972, S. 45–57, 88–90.
- [24] a) J.H.C. Smith & A. Benitez, 'Chlorophylls: Analysis in Plant Materials', in 'Modern Methods of Plant Analysis' von K. Paech & M.V. Tracey, Vol. IV, Springer-Verlag, Berlin 1955, S. 180–182;  
b) J.W. Weigl, J. Amer. chem. Soc. 75, 999 (1953); c) W.S. Kim, Biochim. biophys. Acta 112, 392 (1966).
- [25] H. Brockmann, jr., «Zur Stereochemie der Chlorophylle», Habilitationsschrift TU Braunschweig, Bönecke-Druck, Clausthal-Zellerfeld 1969.
- [26] S.G. Boxer, G.L. Closs & J.J. Katz, J. Amer. chem. Soc. 96, 7058 (1974).
- [27] H.H. Strain & W.M. Manning, J. biol. Chemistry 146, 275 (1942).
- [28] J.J. Katz, G.D. Norman, W.A. Svec & H.H. Strain, J. Amer. chem. Soc. 90, 6841 (1968).
- [29] I. Fleming, Nature 216, 151 (1967); H. Brockmann, jr., Angew. Chemie 80, 233 (1968).
- [30] a) C. Houssier & K. Sauer, J. Amer. chem. Soc. 92, 779 (1970); b) I.R. Prokhorenko, V.M. Lobachev & V.M. Kutyrin, Ž. Obšč. Chim. 46, 2147 (1976) (engl. Ausgabe S. 2065).
- [31] P.H. Hynninen, Acta chem. Scand. 27, 1487 (1973).
- [32] H.-P. Isenring, «Neue Derivate der Chlorophyll-Reihe», Diss. ETH Zürich Nr. 5369, Juris-Verlag, Zürich 1974.
- [33] G. Sievers & P.H. Hynninen, J. Chromatog. 134, 359 (1977).
- [34] a) R.T. Wang & R.K. Clayton, Photochemistry Photobiol. 17, 57 (1973); b) M.Y. Okamura, L.A. Steiner & G. Feher, Biochemistry 13, 1394 (1974).
- [35] a) M. Snozzi, Ber. deutsch. bot. Ges. 90, 485 (1977); b) H. Zürrer, M. Snozzi, K. Hanselmann & R. Bachofen, Biochim. biophys. Acta 460, 273 (1977); c) M. Snozzi & R. Bachofen, *ibid.*, im Druck.
- [36] R.K. Clayton & R.T. Wang, Methods Enzymol. 23, 696 (1971).
- [37] F. Boucher, M. van der Rest & G. Gingras, Biochim. biophys. Acta 461, 339 (1977); M. Lutz, I. Agalidis, G. Hervo, R.J. Cogdell & F. Reiss-Husson, *ibid.* 503, 287 (1978); R.J. Cogdell, W.W. Parson & M.A. Kerr, *ibid.* 430, 83 (1976).
- [38] a) A.S. Holt & E.E. Jacobs, Amer. J. Botany 41, 718 (1954); b) K. Sauer, J.R.L. Smith & A.J. Schultz, J. Amer. chem. Soc. 88, 2681 (1966).
- [39] a) J. Fajer, D.C. Brune, M.S. Davis, A. Forman & L.D. Spaulding, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 4956 (1975); D.M. Tiede, R.C. Prince, G.H. Reed & P.L. Dutton, FEBS Letters 65, 301 (1976); J. Fajer, A. Forman, M.S. Davis, L.D. Spaulding, D.C. Brune & R.H. Felton, J. Amer. chem. Soc. 99, 4134 (1977); D. Holten, M.W. Windsor, W.W. Parson & M. Gouterman, Photochemistry Photobiol. 28, 951 (1978) und darin zit. Lit.; b) 'Yearly Reviews': P.L. Dutton, Photochemistry Photobiol. 24, 655 (1976); P.A. Loach, *ibid.* 26, 87 (1977); J. Barber, *ibid.* 29, 203 (1979).
- [40] K.F. Nieth, G. Drews & R. Feick, Arch. Mikrobiol. 105, 43 (1975).
- [41] R.L. Hall, M. Chukung, M. Fu, B.J. Hales & P.A. Loach, Photochemistry Photobiol. 18, 505 (1973).
- [42] J.B. Stothers, 'Carbon-13 NMR Spectroscopy', Academic Press, New York 1972, S. 436.
- [43] T.J.N. Webber & E.H. McKerrell, J. Chromatog. 122, 243 (1976).
- [44] R. Schwarzenbach, J. Chromatog. 129, 31 (1976).
- [45] G.L. Closs, J.J. Katz, F.C. Pennington, M.R. Thomas & H.H. Strain, J. Amer. chem. Soc. 85, 3809 (1963).
- [46] R.A. Goodman, E. Oldfield & A. Allerhand, J. Amer. chem. Soc. 95, 7553 (1973).
- [47] J. Amer. chem. Soc. 82, 5545 (1960); R. Bonnett, Ann. N.Y. Acad. Sci. 206, 745 (1973).
- [48] I.D. Jones, L.S. Butler, E. Gibbs & R.C. White, J. Chromatog. 70, 87 (1972); I.D. Jones, L.S. Butler, E. Gibbs & R.C. White, *ibid.* 70, 206 (1972).
- [49] P.A. Ellsworth & C.B. Storm, J. org. Chemistry 43, 281 (1978).
- [50] P.A. Cuendet & H. Zuber, FEBS Letters 79, 96 (1977); P.A. Cuendet & H. Zuber, Ber. deutsch. bot. Ges. 90, 493 (1977).
- [51] J.R.L. Smith & M. Calvin, J. Amer. chem. Soc. 88, 4500 (1966).