

Vitamin K, das fettlösliche antihämorrhagische Vitamin*)

Von Dr. HENRIK DAM, Kopenhagen

Biochem. Institut der Universität

Eingeg. 6. Juli 1937

Wir kennen zurzeit 3 verschiedene antihämorrhagische Vitamine, Vitamin C, P und K. Während die wasserlöslichen Substanzen C und P vorzugsweise für gewisse Säugetiere, Meerschweinchen, Mensch und andere, den Charakter eines Vitamins haben, ist für Hühner, Gänse, Enten und verschiedene andere Vögel der fettlösliche K-Faktor ein ausgeprägtes Vitamin.

Wenn man Hühnchen oder erwachsenen Hühnern Vitamin K entzieht, entwickelt sich eine sehr charakteristische Blutungskrankheit. Die Blutungen können in vielen Organen auftreten. Am häufigsten findet man sie unter der Haut oder intramuskulär an den Beinen, an der Brust, am Halse oder an den Flügeln, seltener in der Bauch- oder Brusthöhle. Die Blutungen können sehr groß sein, so daß das Tier durch den Blutverlust stirbt. Sie können auch nur etwa erbsengroß sein oder — besonders in der Leber — nur als Pettecchien auftreten. Im Herzen findet man fast nie Blutungen.



Abb. 1. Blutung am linken Flügel.



Abb. 2. Hämorrhagischer Defekt des Muskelmagens.

Bei K-avitaminotischen Tieren findet man auch hämorrhagische Veränderungen im Muskelmagen. Diese Veränderungen äußern sich durch größere oder kleinere hämorrhagisch infiltrierte Defekte der von der Drüsenschicht sezernierten Auskleidung. Es soll gleich bemerkt werden, daß verschiedene Autoren die Meinung vertreten, daß die Defekte der Auskleidung durch den Mangel eines besonderen Faktors bedingt sind. Auch wenn man die hämorrhagischen Defekte im Muskelmagen als ein Symptom der K-Avitaminose betrachtet, muß man damit rechnen, daß es einen oder mehrere Faktoren gibt, die die Auskleidung des Muskelmagens gegen mechanische Abnutzung resistent machen und somit einen Schutz gegen die durch den K-Mangel bedingten Veränderungen leisten.

*) Vorgetragen in der Fachgruppe für Medizinische Chemie und Pharmazeut. Chemie auf der 50. Hauptversammlung des VDCh in Frankfurt a. M. am 8. Juli 1937.

Eine Nahrung, die K-Avitaminose hervorruft, besteht z. B. aus:

	%
Ätherextrahierter Schweineleber	15
Getrockneter Hefe	12
Saccharose	71
Salzgemisch	2
	100
Dorschlebertran	2

Sie enthält weder C noch P. Zusatz von Ascorbinsäure oder Citronensaft hat keinen Einfluß auf die Entwicklung der Krankheit und kann deshalb entbehrte werden. Es fehlt außerdem ein Faktor, der bis jetzt nur wenig erforscht ist und „Beinschwäche“ (leg weakness) verhindert, und nach den Untersuchungen von Goettsch und Pappenheimer 1936 auch ein fettlöslicher Faktor, der für die Unterdrückung gewisser Hirndegenerationen notwendig ist. Diese beiden Mangelkrankheiten: Beinschwäche und Encephalomalazie, werden in der Tat beobachtet, wenn die Versuche hinreichend lange Zeit fortgesetzt werden.

Die Blutungskrankheit entwickelt sich im Laufe von 10—30 Tagen. Die Blutungen können meistens von außen beobachtet werden. Wenn schwere Blutungen auftreten, ist die Krankheit von beträchtlicher Anämie begleitet. Die Gerinnungszeit des Blutes ist bedeutend verlängert. Die Gerinnung kann $\frac{1}{2}$ bis mehrere Stunden dauern, während das Blut normaler Hühnchen in 2—4 min erstarrt.

Der Krankheit kann durch Zusatz von Schweineleber, Schweineleberfett, Kohl, Luzerne, Spinat, Tomaten usw. vorgebeugt werden. Dagegen sind Dorschlebertran, Weizenkeimöl, Vogan, Vigantol, Ultraviolettbestrahlung, Carotin, Hefe, Eierklar und die antiscorbutischen Vitamine unwirksam.

Der Faktor ist fettlöslich und kann mit den gewöhnlichen Fettlösungsmitteln extrahiert werden. Bei der Verteilung zwischen Petroläther und 90%igem Methanol oder 90%iger Essigsäure geht das Vitamin in die Petrolätherschicht.

Die Konzentrierung des Vitamins geschieht durch Ausschütteln mit 90%iger Essigsäure oder Filtration durch ein geeignetes Adsorptionsmittel, wodurch der Faktor zusammen mit Carotin und etwas von den Zersetzungsprodukten des Chlorophylls austritt. Zur Vorreinigung kann auch Ausfrieren aus Äthanol dienen; der Faktor bleibt im leichtlöslichen Anteil. Erhitzen oder längeres Stehen der alkoholischen Lösung setzt die Aktivität bedeutend herab. Das vorgereinigte Konzentrat kann im Hochvakuum destilliert werden (115—140° bei 10⁻³ mm Hg), wodurch man in einer einzigen Operation leicht eine 4 fache

Konzentration erreicht. Das Destillat kann an Al_2O_3 oder $\text{Ca}(\text{OH})_2$ unter Verwendung von passenden Elutionsmitteln chromatographiert werden; hierbei tritt jedoch ein ziemlich erheblicher Verlust ein, wenn auch die Konzentration dadurch bedeutend gesteigert werden kann. Das Vitamin sitzt hauptsächlich oberhalb des β -Carotins. Das Vitamin wird durch kaltes Verseifen geschwächt und geht durch warmes Verseifen vollkommen zugrunde. Brom im Überschuß zerstört die Substanz gleichfalls. Beim Behandeln mit Girard-Reagens (Trimethyl-acet-hydrazid-ammoniumchlorid) erhält man das Vitamin im Nicht-Ketonanteil. Die stärksten Konzentrate enthalten über 1 Million kurative Einheiten pro Gramm.

Die Bestimmung des Vitamins kann entweder nach dem präventiven oder nach dem kurativen Prinzip erfolgen. Im präventiven Versuch stellt man z. B. fest, wieviel von dem Konzentrat pro 100 g Nahrung erfordert wird, um die Krankheit zu unterdrücken, d. h. um die Blutungstendenz fern zu halten. Bei der kurativen Methode bestimmt man die Menge des Konzentrates, die pro Gramm Körpergewicht 3 Tage aufeinander gegeben werden muß, um das Gerinnungsvermögen des Blutes eines K-avitaminotischen Hühnchens wieder auf den Normalwert zu bringen. Es wäre unmöglich, das bloße Verschwinden einer entstandenen Blutung als Kriterium zu benutzen, weil Blutungen spontan resorbiert werden können, ohne daß die Krankheit geheilt wird. Die kurative Bestimmungsmethode ist zuerst von Schönheyder beschrieben worden.

Man gewinnt das Blut aus der arteria carotis mit Hilfe einer eingelegten Kanüle. Die Bestimmung des Gerinnungsvermögens geschieht in dem Apparat von Albert Fischer in folgender Weise:

In einem kleinen Gläschen versetzt man 5 Tropfen Plasma — aus praktischen Gründen mit gleichen Teilen Ringerlösung verdünnt — mit einem Tropfen Hühnerlungenextrakt oder einem anderen Thrombokinaspräparat aus Hühnerorganen. Durch Umdrehen des Glases im Wasserbade von Körpertemperatur stellt man den Zeitpunkt der Gerinnung fest. Durch Wiederholung des Versuches mit verschiedenen Verdünnungen des Thrombokinaspräparates kann man diejenige Konzentration ermitteln, die in 3 min die Gerinnung hervorruft. Diese Konzentration dividiert durch die Konzentration, die ein normales Plasma in derselben Zeit zur Gerinnung bringt, $R = \frac{K}{K_n}$, ist ein Maß der Gerinnungsanomalie. Der reziproke Wert ist ein Maß der Gerinnungsfähigkeit. Je besser die Gerinnungsfähigkeit, um so kleiner ist die nötige Konzentration der Thrombokinas.

Bei maximal entwickelter Avitaminose sind die R-Werte sehr hoch (z. B. 7000), gewöhnlich findet man kleinere R-Werte, z. B. 50—300; der R-Wert eines normalen Hühnchens ist = 1.

Wenn man den R-Wert eines K-avitaminotischen Tieres festgestellt hat, kann man durch Eingabe einer bekannten Menge einer Testsubstanz 3 Tage aufeinander und nachfolgende R-Bestimmung am vierten Tag eine Kurve konstruieren, die die Veränderung des R-Wertes mit der Eingabe darstellt. Diese Kurve wird nun für die Bestimmung des Vitamins in Konzentraten oder in Rohmaterialien benutzt.

Getrocknete Pflanzenteile oder tierische Organe werden als gewogene Tabletten verabreicht. Konzentrate werden mit ein wenig der Grundnahrung tablettiert. Die Einheit ist diejenige Menge, die pro Gramm Tier 3 Tage aufeinander gegeben werden muß, um R von 200 oder mehr auf 1 zu reduzieren. Bei der Bestimmung des Vitamins in pflanzlichen Rohmaterialien findet man bei direkter Verfütterung etwas weniger, als wenn man das Vitamin erst mit Petroläther extrahiert und den Extrakt verabreicht. Dies steht

wahrscheinlich mit der schlechteren Resorption aus dem Pflanzenmaterial in Zusammenhang. Der mit der Grundnahrung vermischte Extrakt wird besser resorbiert. Die

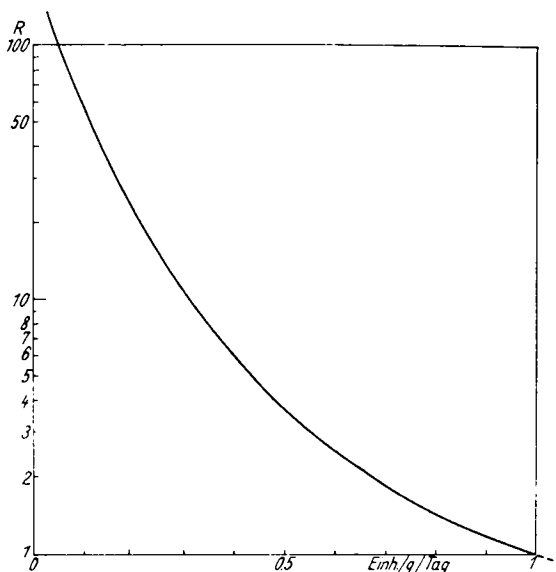


Abb. 3. R-Zahl als Funktion der Vitamingabe.

folgende Übersicht unterrichtet über die Menge des Vitamins in verschiedenen Materialien. Die Zahl der Einheiten ist bei direkter Verfütterung gefunden.

	Einheiten pro g Trockensubstanz
Verschiedene Luzernesorten, Spinat, Kohl	100—400
Hafer, Weizen, Gerste	5—15
Runkelrüben, Kartoffeln, Karotten	0—15
Tomaten, Hagebutten	60—90
Schweineleber	50—100
Fleischmehl	3
Alter Käse	50

Wie schon gesagt, besteht die Wirkung des Vitamins hauptsächlich in der Erhaltung der Gerinnungsfähigkeit des Blutes. In Versuchen, die eine langsame Entwicklung der Krankheit ermöglichen, kann man aber bisweilen die Blutungen vor dem Eintritt der Gerinnungsverzögerung beobachten, so daß außer der Wirkung auf die Gerinnung noch die Möglichkeit einer anderen Wirkung, wahrscheinlich auf die Gefäßwand, besteht.

Nach Morawitz wird der Gerinnungsvorgang bekanntlich in der Weise erklärt, daß eine Substanz, die im Blutplasma vorkommt — Prothrombin — durch Gewebesaft der beschädigten Gefäßwand + Calcium in Thrombin umgebildet wird, wonach das Thrombin die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin vermittelt. Die wirksame Substanz des Gewebesafes bezeichnet man nach Morawitz als Thrombokinas. Eine Substanz mit ähnlicher Wirkung kommt bei den Säugetieren auch in den Blutplättchen vor. Bei Vögeln spielen diejenigen Elemente des Blutes, die den Blutplättchen der Säugetiere entsprechen, keine Rolle für den Gerinnungsvorgang. Dieser Umstand erleichtert die Untersuchung der Blutgerinnungsanomalie bei Vögeln außerordentlich.

Die Verzögerung der Gerinnung bei der K-Avitaminose steht mit einer Herabsetzung des Prothrombingehaltes in Zusammenhang. Schönheyder hat gezeigt, daß das Blut der K-avitaminotischen Tiere Fibrinogen und Calcium in praktisch normaler Menge enthält, und daß der Gewebepreßsaft, z. B. aus Muskeln, gegenüber normalem Hühnerplasma eine ebenso starke gerinnungshervorrufende Wirkung ausübt wie der Gewebepreßsaft aus normalen Hühnerorganen.

Man kann aus dem Plasma der normalen Hühner eine als Prothrombin wirkende Eiweißfraktion ausfällen,

indem man entweder Aceton zusetzt (Methode von *Howell*) oder mit Essigsäure bis $p_H = 5,3$ ansäuert (Methode von *Mellanby*). Die entsprechende Fällung aus K-avitaminotischem Hühnerplasma besitzt keine Prothrombinwirkung.

Man könnte sich nun denken, daß das Vitamin selbst als Prothrombin wirke oder mit Prothrombin identisch sei. Dies ist aber keineswegs der Fall. Prothrombin ist nach allen bisherigen Erfahrungen eine wasserlösliche Substanz, die die Globulinfraction der Plasma-Eiweißkörper begleitet.

Wenn man dem System: K-avitaminotisches Plasma + Gewebesaft Vitamin K in Form einer Emulsion zufügt, läßt sich keine Beschleunigung der Gerinnung feststellen. Die Wirkung spielt sich lediglich *in vivo* ab.

Intravenöse Injektion einer Emulsion des Vitamins hat keinen augenblicklichen Einfluß; die Wirkung kommt aber nach Verlauf einer gewissen Zeit. Es ist möglich, in 5 oder 6 h die normale Gerinnungsfähigkeit vollkommen wiederherzustellen, wenn man eine passende Menge Vitamin intravenös verabreicht. (Etwa so viel, wie man im gewöhnlichen Tablettversuch insgesamt geben muß, um in 3 Tagen normale Gerinnungsfähigkeit zu erreichen.) Stehenlassen des Plasmas (5–6 h) mit *in vitro* zugesetztem Vitamin K bei Körpertemperatur verbessert dagegen nicht die Gerinnungsfähigkeit.

Es wäre nun ein naheliegender Gedanke, daß das Vitamin einen Bestandteil des Prothrombins ausmache. Wir haben deswegen Prothrombinfällungen aus normalem Hühnerplasma auf Vitamin K geprüft. Die Vitaminwirkung solcher Fällungen ist auf alle Fälle schwach und nicht mit vollkommener Sicherheit festgestellt. Die meisten Organe eines normal ernährten Huhns enthalten eine geringe Menge des Vitamins, ungefähr 5–20 Einheiten pro Gramm Trockengewicht. Das Blutplasma enthält ungefähr ebensoviel, jedenfalls nicht viel mehr, und die Prothrombinfraction enthält pro Gramm nicht mehr als das getrocknete Plasma.

Es soll übrigens gleich bemerkt werden, daß man bei dauernder Verfütterung großer Mengen des Vitamins in Form von Spinat, Luzerne usw. die Menge des Vitamins in den verschiedenen Organen nicht so sehr in die Höhe treiben kann, höchstens auf das Doppelte. Die Leber ist kein besonderer Speicherungsorgan, sondern alle bisher untersuchten Organe nehmen ungefähr gleich viel auf. Ein vollkommen K-avitaminotisches Huhn enthält, wie es auch zu erwarten wäre, kein Vitamin K in seinen Organen. Eine plötzliche Gabe einer sehr großen Menge Vitamin kann sogar ein K-avitaminotisches Tier eine kurze Zeit „übernormal“ machen. Wenn Hühner dagegen längere Zeit hindurch von einer Nahrung mit viel Luzerne oder anderen sehr reichen Quellen des Vitamins leben, stellt sich die Gerinnungsfähigkeit ungefähr auf den Normalwert ein. Es besteht also eine gewisse Regulierung, so daß die Gerinnungsfähigkeit auf die Dauer von der Nahrung nicht stark beeinflußt wird, wenn die Nahrung nicht zu wenig von dem Vitamin enthält.

Die Frage, ob die Bedeutung des fettlöslichen antihämorrhagischen Vitamins nur auf gewisse Vögel beschränkt ist, ist noch nicht endgültig entschieden. Wir haben in unserem Laboratorium Ratten, Meerschweinchen und junge Hunde mehrere Monate lang mit derselben Nahrung gefüttert, die bei Küken, Hühnern, Gänsen usw. die Krankheit in ausgeprägtem Maße hervorruft. Bei den Säugetieren haben wir, um Fehlschlüsse zu vermeiden, stets Citronensaft oder Ascorbinsäure hinzugefügt, so daß keine Komplikationen durch Auftreten von Skorbut eintreten können. Die Tiere bekamen die hämorrhagische Krankheit nicht, sondern blieben vollkommen gesund. Bei Säugetieren kann die Gerinnung des Blutes nicht ohne weiteres in derselben exakten Weise wie bei den Vögeln untersucht werden, weil die Blutplättchen, die ein sehr

labiles Element des Säugetierblutes darstellen, dem Plasma immer eine Neigung zur Spontangerinnung verleihen. Die einfache Gerinnungsprobe, d. h. Ausfließenlassen von Blut durch eine kleine Wunde und Beobachtung der Gerinnungszeit des Blutes in einer kleinen Schale, zeigt aber keine Verzögerung an. Es ist somit anzunehmen, daß diese Tierarten das Vitamin entbehren oder selbst synthetisieren können. *Hogan*, Missouri, hat kürzlich berichtet, daß er die hämorrhagische Krankheit bei Kaninchen gesehen hat. Wir haben zurzeit solche Versuche mit Kaninchen laufen, über deren Ergebnis vorläufig noch nichts Sicheres ausgesprochen werden kann.

Bisweilen beobachtet man, daß Hühner oder andere Vögel, für welche der K-Faktor ein Vitamin ist, längere Zeit ohne Zufuhr des Stoffes mit der Nahrung leben können, ohne daß die Krankheit auftritt. Dies ist vor allem der Fall, wenn die Tiere nicht genügend gepflegt werden, so daß sie Gelegenheit haben, Kot zu fressen oder Nahrung und Trinkwasser zu verunreinigen. *Almquist* hat gezeigt, daß das Vitamin durch Fäulnis gebildet werden kann, und daß der Kot von K-avitaminotisch ernährten Hühnern Vitamin K enthält. Dies steht mit unseren Beobachtungen in bester Übereinstimmung. Wir fanden z. B., daß der Petrolätherextrakt des Kotes einer Ente, die sehr langsam krank wurde, 400–500 Einheiten pro Gramm enthielt. Das ist ebenso viel wie im Schweineleberfett. Es ist daher absolut notwendig, die Tiere auf Drahtnetzboden zu halten und Drahtnetzboden und Futter- und Wasserbehälter jeden Tag zu wechseln und zu reinigen. Diese Komplikation, die wahrscheinlich auf die Bildung des Vitamins durch Bakterien im Darm zurückzuführen ist, erinnert an die sog. „Refektion“ bei Vitamin B-Versuchen mit Ratten, wo Vitamin B₁ anscheinend auch im Darmtraktus entsteht. *Almquist* ist der Meinung, daß die Krankheit am schnellsten zur Entwicklung kommt, wenn die ganz jungen Küken so wenig wie möglich von dem Vitamin durch das Ei übernommen haben. Man soll deshalb die Hennen, aus deren Eiern die Küken herrühren, mit wenig Vitamin K füttern. Dies kann aber nur dann von Bedeutung sein, wenn man die Krankheit sehr schnell hervorrufen will; denn das Ei speichert nur wenig Vitamin K — selbst wenn die Nahrung sehr reich ist. Ob andere Faktoren als Fäulnis (und u. U. Überführung des Vitamins durch das Ei) von Bedeutung sind, wissen wir noch nicht.

Beim Menschen ist K-Avitaminose nie beobachtet worden.

Die Frage, weshalb gewisse Tierarten die Zufuhr des Vitamins mit der Nahrung entbehren können, bedarf noch einer eingehenden Untersuchung. 3 verschiedene Möglichkeiten liegen vor: Entweder spielt das Vitamin überhaupt keine Rolle für das Tier, oder das Tier kann den Stoff synthetisieren. Endlich kann man sich denken, daß er von Bakterien im Darm synthetisiert wird. Die letzte Möglichkeit kommt ja, wie erwähnt, sogar in gewissen Fällen beim Huhn in Betracht.

Es wäre nicht schwierig, Bilanzversuche mit K-vitaminfrei ernährten Tieren durchzuführen, die über die Synthese in der einen oder der anderen Weise ziemlich genaue Auskunft geben würden. Das Vitamin kommt wie erwähnt im Säugetierorganismus vor; Schweineleber ist sogar ziemlich reich an dem Vitamin. Beim Menschen hat es sich gezeigt, daß der Petrolätherextrakt des Kotes viel Vitamin K (z. B. 2000 Einheiten pro Gramm) enthält, auch wenn der Darm durch mehrtägige Vitamin-K-arme Nahrung (Keks, Butter) von K-reichen Nahrungsbestandteilen befreit ist. Ob das Vitamin des Kotes von einer Synthese im Organismus, von Darmbakterien oder von Wiederauscheidung von gespeichertem Vitamin herrührt, ist noch nicht entschieden. Im Petrolätherextrakt des Harns kommt — auch bei K-reicher Nahrung — kein Vitamin K vor.

Man könnte sich von vornherein vorstellen, daß Krankheiten beim Menschen, die mit Blutungstendenz und Gerinnungsverzögerung verknüpft sind, in irgendwelcher Weise mit dem Vitamin K in Verbindung stünden, z. B. dadurch, daß der K-Faktor unter den gegebenen Umständen nicht gebildet werden kann.

Krankheiten, die lediglich oder hauptsächlich auf eine herabgesetzte Resistenz der Gefäßwände zurückzuführen sind, scheiden hierbei aus. Es ist also anzunehmen, daß Skorbut oder andere Zustände, die sich von den Vitaminen C und P beeinflussen lassen, mit Vitamin K nicht in Verbindung stehen.

Die hämorrhagische Diathese, die unter dem Namen Morbus Werlhofii bekannt ist, beruht auf einer Reduktion der Zahl der Blutplättchen und ist somit wahrscheinlich auch ohne Relation zum Vitamin K.

Die erbliche Bluterkrankheit, hämophilia congenita, bei der die Gerinnungsfähigkeit des Blutes bekanntlich sehr stark erniedrigt ist, kommt wahrscheinlich auch nicht in Betracht. Es ist zwar wiederholt die Vermutung ausgesprochen worden, daß die Gerinnungsverzögerung bei dieser Krankheit auf einer quantitativen oder qualitativen Anomalie des Prothrombins im Blute beruhen sollte. Diese Auffassung wurde z. B. von *Howell* im Jahre 1914 vertreten und ist später (1936) von *Patek* und *Taylor* wieder aufgenommen worden, nachdem *Howell* und *Cekada* 1926 eine neue Erklärung aufgestellt hatten, daß die Blutplättchen, z. B. durch eine erhöhte Resistenz, die Fähigkeit verloren hätten, ihre gerinnungsaktive Komponente (Thromboplastin, Thrombokinasen) abzugeben.

Verschiedene Versuche, die Bluterkrankheit durch Eingabe von K-Vitamin-reichen Substanzen, z. B. Luzerneextrakt, zu beeinflussen, sind negativ verlaufen (Solche Versuche sind u. a. im Reichs Krankenhaus in Kopenhagen gemeinsam mit *Schönheyder* und später mit *Eggert Möller* ausgeführt worden). Über diese Versuche wird an anderem Ort berichtet.

Wie bereits erwähnt, ist die Gerinnungsfähigkeit des Blutes bei Säugetieren nicht so leicht zu untersuchen wie bei den Vögeln. Die Blutplättchen zerfallen zu leicht und geben ihren Gehalt an Thrombokinasen ab. Bedeutend besser ist die Möglichkeit, anormales Blut mit normalem zu vergleichen, wenn man bei der Entnahme Heparin zusetzt. Die Verhältnisse liegen dann zwar in theoretischer Hinsicht nicht so übersehbar wie bei Vogelplasma ohne Heparin; es lassen sich aber trotzdem brauchbare Schlüsse in bezug auf die Art der Gerinnungsanomalie ziehen. Wenn man den R-Wert eines pathologischen Hühnerplasmas bestimmt und vor der Bestimmung sowohl das pathologische als auch das normale Plasma mit Heparin versetzt, findet man einen um so höheren R-Wert, je größer die Heparinmenge ist.

Wenn man nun das Blut von Patienten mit Hämophilia congenita in derselben Weise — also mit Heparinzusatz — mit normalem Menschenplasma (+ Heparin) vergleicht, kann man die interessante Tatsache feststellen, daß das Plasma der Bluter keine höhere Konzentration des Menschenthrombokinasen-Präparates erfordert als ein normales Menschenplasma, um in derselben Zeit zu gerinnen. D. h., das Blutplasma gerinnt unter diesen Umständen genau so gut wie ein normales Plasma, trotzdem es ohne Zusatz von Gewebesaft (und ohne Heparin) außerordentlich lange flüssig bleiben kann. Diese Beobachtung deutet entschieden darauf hin, daß die Anomalie des Bluterblutes die Fähigkeit des Prothrombins, mit der Gewebekinasen zu reagieren, gar nicht berührt. Die Bluterkrankheit ist also eine ganz andere Krankheit als die Blutungskrankheit des Huhns. Es erscheint sehr wahrscheinlich, die Anomalie des Bluterblutes mit den Blut-

plättchen in Verbindung zu setzen, wie es von *Howell* und *Cekada* vorgeschlagen ist.

Es bleibt noch zu untersuchen, ob z. B. die hämorrhagische Diathese, die bei schweren Ikterusformen auftritt, mit dem Vitamin K in Verbindung stehen sollte, entweder dadurch, daß die Resorption aller lipoidartigen Substanzen gehemmt wird, oder auf andere Weise.

Zum Schluß sei ganz kurz die Frage berührt, weshalb die Blutungskrankheit des Huhns und das fettlösliche antihämorrhagische Vitamin nicht schon vor vielen Jahren entdeckt worden sind.

Die ersten Mitteilungen über die Krankheit sind von mir in einigen Arbeiten über den Cholesterinstoffwechsel des Hühnchens in den Jahren 1929—1930 in der Biochemischen Zeitschrift veröffentlicht worden. Zur Erforschung der Cholesterinsynthese des Hühnchens wurde eine Nahrung mit sehr wenig Sterin und Lipoid benutzt. Die Krankheit zeigte sich schon 14 Tage nach dem Ansetzen des ersten Versuches. Es wurde bald festgestellt, daß Mangel an Cholesterin oder den Vitaminen des Citronensaftes nicht die Ursache sein könnte. Auch Abänderung des Salzgemisches oder der B-Komplex-Quelle, Ultraviolettbestrahlung, Zugabe von viel Dorschlebertran oder Weizenkeimöl konnte das Ausbrechen der Krankheit nicht verhindern. In den Jahren 1932/33 mußte ich mich anderen Arbeiten widmen, und die Ursache der Krankheit wurde deshalb erst 1934/35 in positiver Weise als der Mangel eines besonderen und konzentrierbaren fettlöslichen Nahrungsfaktors erkannt. Englische Forscher (*Gardner* u. *Lander*) haben schon 1914 den Sterinstoffwechsel des Hühnchens studieren wollen und haben auch eine lipoidarme Nahrung benutzt, ohne die Krankheit zu beobachten.

Kanadische Untersucher, *MacFarlane* u. Mitarb., haben im Jahre 1931 die Krankheit beschrieben, indem sie als Eiweißquelle extrahiertes Fleisch- oder Fischmehl benutzten. Mit ätherextrahiertem Casein oder nicht-extrahiertem Fleisch- oder Fischmehl konnten sie die Krankheit nicht hervorrufen, und verfolgten die Sache nicht weiter.

Holst und *Halbrook* in California haben 1933 die Krankheit auch beschrieben. Sie waren der Ansicht, daß es sich um Mangel an Vitamin C handelte, weil der Krankheit durch Kohl vorgebeugt werden konnte. Auch *Baruven*, Brüssel, hat 1933 die Blutungen gesehen. 1935, kurz nachdem die Charakterisierung des Vitamins und die Erforschung der Gerinnungsanomalie von *Dam* und *Schönheyder* veröffentlicht worden waren, erschienen einige Arbeiten von *Almquist* u. *Stokstad*, California, die die Arbeiten von *Holst* u. *Halbrook* weitergeführt hatten und die mit den Kopenhagener Arbeiten übereinstimmten.

Auch die späteren Arbeiten der californischen und der dänischen Forscher stimmen überein, jedoch wird von *Almquist* besonderer Wert auf die Auffassung der Muskelmagendefekte als eine besondere Krankheit gelegt. *Almquist* meint, daß verschiedene Quellen des antihämorrhagischen Faktors eine verschiedene Fähigkeit zur Unterdrückung der Defekte im Muskelmagen besitzen. Dies soll z. B. bei Weizenkleie der Fall sein. Weizenkleie enthält nach unseren Untersuchungen nur ungefähr 10—15 Einheiten pro Gramm. Die Frage der Schutzwirkung gegenüber Muskelmagendefekten ist von uns in der letzten Zeit nicht eingehend untersucht worden, weil wir zu den Bestimmungen des K-Vitamins fast immer die kurative Blutgerinnungsmethode herangezogen haben.

Es läßt sich mit großer Wahrscheinlichkeit sagen, daß die Ursache, weshalb viele andere Forscher die Krankheit nicht gesehen haben, darin zu suchen ist, daß ihre Versuchstiere entweder durch Fäulnis der Nahrung oder durch

eine besondere Bakterienflora im Darm gegen die Krankheit resistent gemacht worden sind, es mag auch sein, daß ihr Casein wie das Casein von *MacFarlane* das Vitamin enthielt. Wir haben tatsächlich gefunden, daß Casein des Handels, das als Vitamin-A-frei bezeichnet wird, bisweilen 15 Einheiten Vitamin K pro Gramm enthalten kann, und daß das Vitamin mit Petroläther schwer entfernbar ist. Eine Nahrung mit 200—300 Einheiten pro 100 g ist wahrscheinlich ausreichend, um die Gerinnungsverzögerung monatelang fernzuhalten.

Das Studium des Vitaminbedarfes spezieller Tierarten, z. B. des Huhns, kann, wie die Arbeiten über Vitamin K gezeigt haben, zur Entdeckung bisher unbekannter Nahrungs-

faktoren führen, die u. U. auch für andere Tierarten eine Rolle spielen, selbst wenn sie von diesen anderen Tieren synthetisiert werden können, also nicht den Charakter eines Vitamins haben.

In der letzten Zeit haben *Marianne Goettsch* und *Alwin Pappenheimer* die Ansicht vertreten, daß gewisse Hirndegenerationen, die man bei künstlich ernährten Küken beobachten kann (eine Krankheit, die wir in unserem Laboratorium auch gesehen haben) von dem Mangel eines besonderen fettlöslichen und sehr labilen Faktors, des Encephalomalaziefaktors, hervorgerufen werden.

Das weitere Studium derartiger Probleme wird sicher noch zu vielen interessanten Beobachtungen führen.

[A. 101.]

Analytisch-technische Untersuchungen

Die Bestimmung der freien Säure und des freien Wassers im Superphosphat

Von Dr. B. MEPPEN und Dr. K. C. SCHEEL

Mitteilung aus dem Laboratorium der Chem. Studienges. Uniwapo G. m. b. H., Oranienburg

Eingeg. 9. August 1937

Bei normalen Superphosphaten werden durch Ausschütteln mit Wasser und Titrieren mit $\frac{1}{4}$ NaOH bis zu einem p_H von 3,8¹⁾ brauchbare und untereinander vergleichbare Ergebnisse für die freie Phosphorsäure gefunden. Diese Werte liegen allerdings etwas zu niedrig, da die vollständige Neutralisation des ersten H der Phosphorsäure erst bei einem p_H von 4,4 erfolgt ist. Viel zu niedrige Werte erhält man aber bei Superphosphaten, denen basische Zuschläge beigegeben worden sind, weil beim Ausschütteln Umsetzung zwischen der noch vorhandenen freien Säure und dem überschüssigen basischen Bestandteil stattfindet, zu hohe Werte beim Ausschütteln von gedarrten Superphosphaten, weil gewisse saure Pyrophosphate, die sich durch den Trockenprozeß bereits bei 120° bilden, hydrolysiert werden. An Stelle von Wasser sind daher organische Lösungsmittel vorgeschlagen worden, wie Alkohol, Aceton, Cyclohexanol, Äther und Ameisensäureäthylester. Die Einwirkung dieser Lösungsmittel wurde an einer Anzahl von gesättigten Lösungen von Monocalciumphosphat in Wasser und Phosphorsäure verschiedener Konzentration untersucht (Tab. 1).

Tabelle 1*).

Gesättigte Lösungen von Monocalciumphosphat in Wasser und Phosphorsäuren.

Methode	Monocalciumphosphat gelöst in				Bemerkungen
	0%iger H_3PO_4	10%iger H_3PO_4	25%iger H_3PO_4	50%iger H_3PO_4	
	Gehalt der Lösungen				
	% freie P_2O_5	% freie P_2O_5	% freie P_2O_5	% freie P_2O_5	
Wasser	5,26	6,14	14,68	31,90	Niederschlag $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$
Aceton-Äther ...	5,23	6,38	14,84	32,30	
Cyclohexanol	5,29	6,16	14,90	32,30	Niederschlag $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$
Aceton	5,94	7,12	15,41	32,03	Niederschlag $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$ + geringe Mengen $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$
Alkohol	9,13	12,53	18,01	34,65	Niederschlag $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$ + erhebl. Mengen $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$

* Als der richtige Gehalt der Lösungen an freier Phosphorsäure sind die Werte angenommen, die sich durch Titration der freien Phosphorsäure in Wasser ergeben. Diese Titration läßt sich hier wegen des Fehlens der störenden Eisen- und Aluminiumsalze einwandfrei durchführen.

¹⁾ Vgl. *Lehrecke*, „Über die Bestimmung der freien Säure im Superphosphat und eine neue Extraktionsmethode“, diese Ztschr. 49, 620 [1936].

Es erwies sich, daß Äther unbrauchbar ist, weil darin nur Phosphorsäure höherer Konzentration löslich ist. Mit Ameisensäureäthylester ergaben sich mit aus reinen Substanzen hergestellten Superphosphaten richtige Werte, im Gegensatz zu technischen Superphosphaten, wenn man nach der Vorschrift von *Sanfourche*²⁾ arbeitet. Daß mit Ameisensäureäthylester wesentlich niedrigere Werte gefunden werden als mit anderen organischen Lösungsmitteln, erklärt *Sanfourche* damit, daß der Ester in erheblich geringerem Maße auf die in der flüssigen Phase des Superphosphats gelösten Eisenphosphate zersetzend wirke. Diese Erklärung kann nicht stichhaltig sein, weil die gewöhnlich im Superphosphat enthaltene Menge an löslichen Eisenphosphaten viel zu gering ist. Ändert man die Vorschrift von *Sanfourche* in der Weise, daß man das Superphosphat mit dem Ester mehrfach innig verreibt und die Phosphorsäure in dem Extrakt gravimetrisch bestimmt, so verschwinden die Abweichungen gegenüber den mit anderen Lösungsmitteln gefundenen Werten. Damit entfällt die von *Sanfourche* für die Anwendung seines Esters gegebene Begründung.

Bei Anwendung von Alkohol werden infolge Bildung erheblicher Mengen Dicalciumphosphat viel zu hohe Werte gefunden; in geringerem Maße gilt dies auch für Aceton. Das von *Lehrecke*¹⁾ vorgeschlagene Cyclohexanol entspricht den Anforderungen; seiner allgemeinen Verwendung steht jedoch der hohe Preis entgegen. Außerdem muß das Superphosphat, um eine völlige Benetzung zu erzielen, wegen der hohen Viskosität des Lösungsmittels mit diesem verrieben werden. Hierbei kann aber, wie wir feststellten, eine weitere Umsetzung der freien Säure mit etwa vorhandenen basischen Zuschlägen oder mit noch nicht aufgeschlossenem Phosphat eintreten.

Allein das Aceton-Äther-Gemisch (1:1) weist diese Mängel nicht auf; es wurde deshalb folgende Methode ausgearbeitet:

2 g Superphosphat werden auf ein mit Aceton-Äther gewaschenes, bei 60° getrocknetes und gewogenes Papierfilter³⁾ (11 cm) gebracht und 3mal durch Aufspritzen von Aceton-Äther-Gemisch ausgewaschen. Der Rückstand wird mit Aceton-Äther in eine Reibschale gespritzt und kräftig verrieben. Hierbei treten keine

²⁾ Bull. Soc. chim. France [4] 53, 1582 [1933].

³⁾ Für diese Bestimmung werden Papierfilter verwendet, weil das Abfiltrieren durch einen Glasfildertiegel wegen der außerordentlichen Feinheit des im Superphosphat enthaltenen Calciumsulfats große Schwierigkeiten bereitet. Da die Papierfilter jedoch bei verschieden langer Trockendauer keine Konstanz zeigen, ist es notwendig, stets dieselbe Trockenzeit — 30 min — anzuwenden. Das Trocknen der Papierfilter mit und ohne Niederschlag geschieht zweckmäßig in flachen Wägegäschchen.