

Fettlösliche Vitamine

1. Über das antihämorragische Vitamin K (Fortschrittsbericht 1937—1940)

Von Dr. phil. habil. WALTER JOHN,

Allg. Chem. Universitätslaboratorium,
Göttingen

Inhalt: I. Das natürliche Vorkommen des Vitamins K. II. Anreicherung und Reindarstellung. III. Die Konstitutionsaufklärung der Vitamine K₁ und K₂. IV. Die Synthese des Vitamins K₁. V. Vitamin K-Wirksamkeit synthetischer Verbindungen. VI. Vitamin K-Testmethoden. VII. Zur Physiologie des Vitamins K. VIII. Vitamin K-Therapie beim Menschen.

Als vor drei Jahren *Henrik Dam*, der Entdecker des Vitamins K, in dieser Zeitschrift (1) über das fettlösliche, antihämorragische Vitamin K berichtete, war über die Chemie des Vitamins K nur außerordentlich wenig bekannt. Es waren zwar bereits Verfahren erprobt worden, hochwirksame Vitamin K-Konzentrate darzustellen, aber von den chemischen Eigenschaften der wirksamen Inhaltsstoffe wußte man lediglich, daß einige Reagentien ihre biologische Wirksamkeit vernichteten, einige andere jedoch die Aktivität nicht beeinträchtigten. Noch 1938 faßte *Almquist* (2) das Ergebnis seiner chemischen Untersuchungen an antihämorragisch wirksamen Konzentraten in die Ansicht zusammen, daß das Vitamin K die Eigenschaften eines komplexen farblosen und ungesättigten Kohlenwasserstoffes besäße.

In der kurzen Zeitspanne der inzwischen verflossenen drei Jahre haben sich nun durch die Zusammenarbeit verschiedener Arbeitskreise unsere Kenntnisse über die chemische Natur des Vitamins K außerordentlich rasch erweitert. Was wir im letzten Jahrzehnt nacheinander bei einer ganzen Reihe von Vitaminen erleben durften, diese überraschend schnelle Aufeinanderfolge von Reindarstellung, Konstitutionsaufklärung und Synthese, das ist in den Jahren 1939 und 1940 auch beim Vitamin K der Fall gewesen, derart, daß die Erkenntnisse über die chemische Natur des Vitamins K nunmehr zu einem gewissen vorläufigen Abschluß gelangt sind.

Eine kurze Charakteristik des Vitamins K sei vorgestellt. Das Vitamin K gehört zur Gruppe der fettlöslichen Vitamine; die Bezeichnung antihämorragisches Vitamin oder Koagulationsvitamin bringt zum Ausdruck, daß es imstande ist, Blutungen zu verhindern. Als Folge einer mangelnden Vitamin K-Zufuhr durch die Nahrung beobachtete zuerst *Dam* (3) beim Haushuhn ausgedehnte subcutane und intramuskuläre Hämorragien; die Blutgerinnung ist stark herabgesetzt, damit parallel geht ein Absinken des Prothrombin gehaltes im Blut von Hühnchen (4). Wie man später fand, ist dies auch im Blut verschiedener Säugetiere sowie des Menschen der Fall (5, 6). Eine Verabreichung von Vitamin K-Präparaten bringt den Prothrombinspiegel schon nach wenigen Stunden wieder zum Normalwert zurück; es ist aber nicht möglich, direkt *in vitro* durch Vitamin K die Blutgerinnung zu beschleunigen.

Neben Vitamin K existieren noch andere Nahrungs faktoren, die man oft als antihämorragisch zu bezeichnen pflegt, weil sie Blutungsscheinungen verhindern. Dazu gehören das Vitamin C, das mitverantwortlich ist für die Aufrechterhaltung der normalen Resistenz der Capillargefäße, und das Vitamin P, ein Begriff für mehrere Stoffe, die für die normale Permeabilität der Capillarwände notwendig sind. Beide Faktoren sind jedoch im Gegensatz zum Vitamin K wasserlöslich. Auch bei Vitamin E-Mangel beobachteten neuerdings *Dam* und *Glavind* (7) bei Küken eine erhöhte Permeabilität der Capillaren, die als alimentäre exsudative Diathese bezeichnet wird.

I. Das natürliche Vorkommen des Vitamins K.

Grüne Pflanzenteile sind im allgemeinen reich an Vitamin K. Blätter, die im Dunkeln wachsen, enthalten jedoch viel weniger als solche, die im Licht wachsen. Bilanzversuche mit keimenden Erbsen und Bohnen haben ergeben, daß eine reichliche Synthese des Vitamins K nur im Licht stattfindet, während im Dunkeln entweder nichts oder jedenfalls nur sehr

wenig gebildet wird (8). Diese Photosynthese in der Pflanze überrascht um so mehr, als man weiß, daß das Vitamin K auch durch Bestrahlung mit Sonnenlicht rasch zerstört wird (9). Der hohe Vitamin K-Gehalt der Blätter ändert sich während des Welkens nicht, gelbe oder braun gewordene Röbkastanienblätter enthalten noch ebensoviel Vitamin K wie die frischen Blätter. Die Verteilung des Vitamins K steht in keinem unmittelbaren Zusammenhang mit der des Chlorophylls, mit dem es chemisch in verwandtschaftlicher Beziehung steht (8). Der Gehalt von Früchten, Blumen und Wurzeln ist geringer und nach der Art variierend. Niedere Pflanzen enthalten im allgemeinen weniger Vitamin K, während gewisse Bakterien sehr reich daran sind. Das Vitamin K wird durch die Tätigkeit solcher Bakterien, z. B. durch *Bacterium coli*, im Dickdarm gebildet. Hefe enthält es nur in sehr geringen Mengen (10). Im Tierreich kommt Vitamin K nicht in so großer Menge wie im Pflanzenreich vor. Es gibt kein eigentliches Speicherorgan für dieses Vitamin. Während Faeces viel Vitamin K enthalten, konnte dieses im Harn nicht nachgewiesen werden.

Als Standardsubstanz für die Auswertung des Vitamin K-Gehaltes benutzt *Dam* (11) einen gleichmäßig gepulverten Trockenspinat, der im Eisenschrank aufbewahrt wird. Dieser Standard besitzt 500 Vitamin K-Einheiten/g. Den ungefähren Vitamin K-Gehalt in *Dam*-Einheiten/g Trockensubstanz gibt die Tabelle 1 (11) an.

Tabelle 1.

	E/g
Ätherextrakt aus Colibakterien	200000
Petrolätherextrakt aus Luzerne, Nesseln u. dgl.	20000—30000
Röbkastanienblätter	800
Spinatblätter	500
Brennesselblätter	400
Luzerne, Weißkohl	200—400
Gras, Kiefernadeln	200
Tomaten	50
Soyabohnen	25
Erbsen	15
Erdbeeren	15
Karotten, Hagebutten	10
Weizenkleie, Hafer	10
Weizenkeime	5
Kartoffeln	10
Schweineleber	50
Hühnermuskelein	15—20
Blutplasma (Huhn)	15—20
Hühnerleber	8
Depotfett (Huhn)	5

II. Anreicherung und Reindarstellung.

Ausführliche Beschreibungen der Anreicherung und Reindarstellung des Vitamins K aus Alfalfa, einer Luzernenart, finden sich bei *Doisy* (12) und *Karrer* (13), Vorversuche zur Konzentrierung hauptsächlich bei *Dam* (14) und *Almquist* (15). Die getrocknete und gemahlne Luzerne wird mit siedendem Petroläther (40—60%) extrahiert. Die erhaltenen Extrakte werden an Vitamin K angereichert durch kombinierte Anwendung von chromatographischen Methoden und Molekulardestillationen. *Doisy* verwendet Permutit oder Decalso (synthetischer Zeolith) zur Adsorption des Vitamins K, bei konzentrierteren Fraktionen ist Tierkohle geeignet. *Karrer* entfernt aus den Petrolätherextrakten zuerst das Chlorophyll durch Adsorption an Zinkcarbonat, führt dann eine Molekulardestillation durch und chromatographiert von neuem zunächst an entwässertem Magnesiumsulfat, dann wieder an Zink-

carbonat. Die Anreicherung des Vitamins K in den einzelnen Zonen des Chromatogramms wird durch die Messung des Extinktionskoeffizienten bei $248 \text{ m}\mu$ verfolgt. Aus den Lösungen der Konzentrate in Aceton oder Alkohol lassen sich bei guter Kühlung meist noch unwirksame Stoffe zur Abscheidung bringen. Die chromatographische Aufteilung wird dann mit den konzentriertesten Fraktionen wiederholt. Bei der Molekulardestillation gehen nach Doisy 90 % des Vitamins K in der Fraktion von $115-145^\circ$ bei $2 \cdot 10^{-4} \text{ mm}$ über. Karrer erhielt aus 30 kg trockenem Alfalfapulver schließlich 0,5 g reines Vitamin K₁, das nach einem Vorschlag von Dam (16) α -Phyllochinon genannt wurde.

Auf Grund der am synthetischen Vitamin K₁ genannten Erfahrungen hat später Fieser (17) einen wesentlich einfacheren Weg zur Reindarstellung des α -Phyllochinons angegeben. Extrakte aus Alfalfa, die 3-5 % des Vitamins enthalten (18), werden in Petrolätherlösung mit Claisenlauge (50%ige methanolische Kalilauge) unter Zusatz von Natriumhydrosulfit ausgeschüttelt. Beim Verdünnen der alkalischen Schicht mit Wasser wird das Natriumsalz des Dihydrovitamins K₁ gespalten, und das Dihydrovitamin K₁ läßt sich wieder mit Äther ausziehen. Das durch Oxydation daraus erhaltenen gelbe Öl hat die Eigenschaften eines sehr reinen Vitamins K₁.

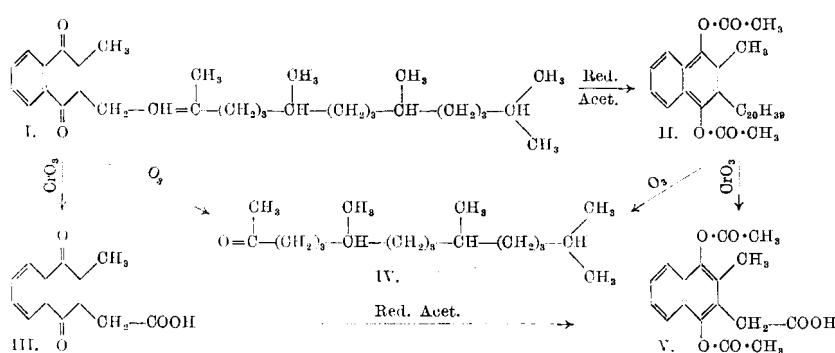
Das reine Vitamin K₁ ist ungefähr gleichzeitig von Karrer (19) in Zusammenarbeit mit Dam (16) sowie von Doisy und Mitarb. (12, 20) isoliert worden. Karrer hat seinen Prioritätsanspruch jedoch wiederholt mit größtem Nachdruck betont. Das Vitamin K₁ oder α -Phyllochinon ist ein gelbes Öl, das bei etwa -20° schmilzt. Seine Wirksamkeit beträgt nach Dam $20 \cdot 10^6 \text{ E/g}$ und ist demnach 100000mal größer als diejenige von getrockneter Alfalfa. Das Absorptionsspektrum zeigt 4 Maxima bei 248, 261, 270 und $328 \text{ m}\mu$ (21). Das Vitamin K₁ ist sehr lichtempfindlich, so daß alle vitamininhaltigen Fraktionen der Aufarbeitung im Dunkeln aufbewahrt werden müssen; auch von Alkalien wird es leicht zerstört (9). Charakteristisch ist die folgende Faroreaktion: Bei Zusatz einer alkoholischen Lösung von Natriumalkoholat zu einer solchen von α -Phyllochinon bleibt zunächst einige Sekunden die hellgelbliche Farbe bestehen, dann färbt sich die Lösung tief violettblau. Nach einiger Zeit schlägt die Farbe nach Rot um und geht dann allmählich in Braun über (22). Die Formel des α -Phyllochinons ist $C_{31}H_{46}O_2$.

Einen zweiten Vitamin K-Faktor, das Vitamin K₂, hat Doisy (12) aus faulendem Fischmehl isoliert, in dem es durch Fäulnisbakterien gebildet wird. Sardinienmehl wird mit Isopropyläther extrahiert, um Fette zu entfernen, dann getrocknet und 2-3 Wochen bei $32-40^\circ$ aufbewahrt und mit dest. Wasser feucht gehalten. Nunmehr wird das Mehl mit Petroläther extrahiert und der Rückstand weiterer Fäulnis überlassen und wiederholt extrahiert. Die Aufarbeitung der Extrakte erfolgt ähnlich wie beim Vitamin K₁; zum Chromatographieren hat sich nur Permutit bewährt. Das Vitamin K₂ läßt sich direkt aus Chloroform-Methanol umkristallisieren und besitzt den Schmp. 54° . Die Wirksamkeit beträgt $8-9 \cdot 10^6 \text{ Damsche Einheiten}$, seine Ultraviolettabsoption ist sehr ähnlich der des Vitamins K₁, es ist wie dieses licht- und alkaliempfindlich und besitzt auch in vielen anderen Punkten mit diesem übereinstimmende Eigenschaften. Vitamin K₂ hat die Zusammensetzung $C_{41}H_{56}O_2$.

Außer den Vitaminen K₁ und K₂ konnte Fernholz (23) aus Alfalfa eine nahezu farblose Substanz von hoher Vitamin K-Aktivität isolieren, über die Näheres aber bisher nicht bekanntgeworden ist. Wahrscheinlich steht damit in Zusammenhang die Beobachtung, daß Vitamin K-Aktivität und Intensität der Dam-Karrerschen Farbreaktion nicht immer parallel gehen.

III. Die Konstitutionsaufklärung der Vitamine K₁ und K₂.

Die Erforschung der Konstitution der Vitamin K-Faktoren ist in erster Linie das Verdienst von Doisy und Mitarb. (24). Beide Vitamine, K₁ wie K₂, geben bei einer reduzierenden Acetylierung kristallisierte Diacetate. Vitamin K₁ nimmt bei der katalytischen Hydrierung 4 Mole H₂, Vitamin K₂ jedoch 9 Mole H₂ auf; die farblosen Hydrierungsprodukte werden an der Luft wieder gelb wie das Vitamin selbst und nehmen nun bei abermaliger Hydrierung wiederum 1 Mol H₂ auf. Diese Eigenschaften weisen eindeutig auf den Chinoncharakter der Vitamin K-Faktoren hin. Ein Vergleich der UV-Absorption, ferner potentiometrische Messungen von Naphthochinonderivaten und den Vitamin K-Faktoren führten zuerst Fieser und Mitarb. (25) dazu, das Vitamin K₁ als 2-Methyl-3-phtylnaphthochinon-1,4 (I) und das Vitamin K₂ als 2,3-Difarnesyl-naphthochinon-1,4 anzusehen. Zu derselben Formel für

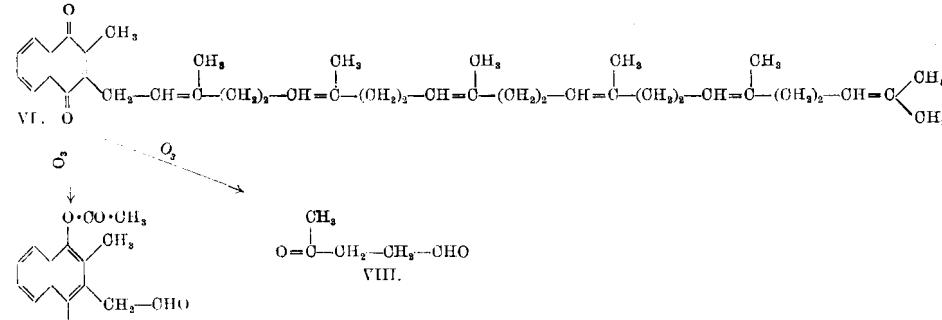


Vitamin K₁ gelangte gleichzeitig auch Doisy auf Grund seiner Abbauversuche; die vorläufige Formel für Vitamin K₂ hat sich jedoch bezüglich der Seitenketten nicht bestätigen lassen.

Vitamin K₁ (I) ergibt bei der Oxydation mit Chromsäure Phthalsäure und 2-Methyl-1,4-naphthochinon-3-essigsäure (III); bei der Behandlung mit Ozon entsteht Trimethyl-pentadekanon (IV).

Diese Ergebnisse werden ergänzt durch analoge Oxydationsversuche an dem oben schon erwähnten Dihydro-vitamin-K₁-diacetat (II). Dieses gibt bei der Chromsäureoxydation das Diacetat der 2-Methyl-naphthohydrochinon-3-essigsäure (V), daneben entsteht Trimethyl-pentadekanon, das sich auch bei der Ozonspaltung bildet.

Die Konstitution des Vitamins K₂ (VI) konnte kürzlich ebenfalls von Doisy und Mitarb. (26) sichergestellt werden. Das Vitamin K₂ unterscheidet sich durch einen stärker ungesättigten Charakter der Seitenkette vom Vitamin K₁, außerdem ist die Seitenkette um 10 C-Atome länger. Die Aufnahme von 6 Molen Br₂ sowie der Verbrauch von 9 Molen H₂, während Methyl-naphthochinon unter denselben Bedingungen nur 3 Mole H₂



aufnimmt, zeigt, daß in der Seitenkette 6 Doppelbindungen vorhanden sein müssen. Durch Ozonisierung des Vitamins K₂ in Eisessig und anschließende reduktive Zersetzung des Ozonids entsteht 1,4-Diacetoxy-2-methyl-naphthalin-3-acetaldehyd (VII) (aus Vitamin K₁ entsteht so ebenfalls VII), außerdem Aceton und Lävulinaldehyd (VIII), die als 2,4-Dinitrophenylhydrazone isoliert werden konnten; auf diese Weise sind alle 41 C-Atome des Vitamin K₂-Moleküls zu erfassen.

IV. Die Synthese des Vitamins K₁.

Noch ehe die Abbauversuche Doisys zu gesicherten Ergebnissen geführt hatten, ist von Fieser (17) die Synthese des Vitamins K₁ in Angriff genommen worden. Auch Almquist (27) und Doisy (28) haben Synthesen durchgeführt. Ins Einzelne gehende Angaben über die Durchführung der Synthese finden sich bei Fieser. Phytol wird mit einem 6fachen Überschuß von 2-Methyl-naphthohydrochinon und Oxalsäure in Dioxan 36 h auf 75° erhitzt. In der reduzierten Form als Dihydrovitamin K₁ läßt sich das Reaktionsprodukt relativ leicht von anderen Reaktionsprodukten abtrennen. Nach erfolgter Reinigung erfolgt die Oxydation zum Vitamin K₁ selbst durch Oxydation mit Silberoxyd. Das Vitamin K₁ entsteht so mit 29% der auf Phytol bezogenen theoretischen Ausbeute. Es ist in allen Eigenschaften identisch mit dem Naturprodukt. Als Nebenprodukt der Kondensation entsteht Naphthotokopherol, das bei energetischeren Konditionsbedingungen Hauptprodukt wird. Fieser synthetisierte auf dieselbe Weise auch 2-Äthyl-3-phytyl-1,4-naphthochinon, da Doisy zuerst diese Formel für Vitamin K₁ erörtert hatte. Das Äthylhomologe ist jedoch viel weniger wirksam als Vitamin K₁. Aus 2-Methyl-naphthohydrochinon und Geraniol ist ebenso das 2-Methyl-3-geranyl-naphthochinon synthetisiert worden, das mit 25 γ nicht aber mit 5 γ wirksam ist. Synthetische Versuche zum Aufbau vitamin Kähnlicher Stoffe hat auch Karre (40) beschrieben. Über die Wirksamkeit synthetischer Stoffe vgl. Tabelle 2.

Almquist (27) verwendet Phytlybromid und 2-Methyl-naphthochinon zur Synthese des Vitamins K₁.

Die Synthese des Vitamins K₂ ist bisher nicht beschrieben worden. Der Ansicht von Makino und Morii (29), die Synthese durchgeführt zu haben, liegen irrtümliche Vorstellungen über die Konstitution des Vitamins K₂ zugrunde.

V. Vitamin K-Wirksamkeit synthetischer Verbindungen.

Almquist und Klose (30) machten zuerst die bedeutsame Feststellung, daß Phthiocol (2-Methyl-3-oxy-naphthochinon) ebenfalls Vitamin K-Wirksamkeit am Hühnchen entfalten kann, wenn es in einer Dosis von 20 mg pro Kilogramm mit einer K-freien Diät verfüttert wird. Phthiocol läßt sich aus menschlichen Tuberkulosebazillen isolieren. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß das Phthiocol aus Vitamin K₁ mit Natriumalkoholat als Endprodukt der Dam-Karrerschen Farbreaktion entsteht (Fieser) (17).

Außer Phthiocol sind eine ganze Reihe von Naphthochinonderivaten sowie auch andere Chinonabkömmlinge auf ihre Vitamin K-Wirksamkeit geprüft worden. Die Ergebnisse solcher Versuche, wie sie Almquist (30), Dam (31), Doisy (32), Fernholz (33, 34), Fieser (25, 35), Kuhn (36), Sjögren (37), Tishler (38) und deren Mitarbeiter durchgeführt haben, sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2.

a-Naphthochinon	1 E/mg (32), 3 · 10 mg (36), 50000 E/g (37)
Naphthohydrochinon-diacetat	0,5 E/mg (32)
2-Methyl-naphthochinon	≈ K ₁ (33, 38) 25 - 35 · 10 ⁶ E/g (31, 37)
2-Methyl-naphthohydrochinon	1000 E/mg (24), 20 mg/kg (30)
2-Methyl-naphthohydrochinon-diacetat	5 - 10 γ (33), 5 E/mg (32), 14 - 20 · 10 ⁶ E/g (31, 37)
2-Methyl-naphthochinon-monoxin	5 · 10 ⁶ E/g (31)
2-Äthyl-naphthochinon	8 E/mg (32), 200 γ (38)
2-Allyl-naphthochinon	200 γ (25)
2-Phytol-naphthochinon	50000 E/g (31)
2,3-Dimethyl-naphthochinon	250 γ (25), 3 - 500 γ (30), 50 γ (38)
2,7-Dimethyl-naphthochinon	200 γ (25)
2,6-Dimethyl-naphthochinon	200 γ (wenig aktiv) (25)
2-Methyl-3-cinnamyl-naphthochinon	100 γ (35)
2-Methyl-3-n-octadecyl-naphthochinon	1 E/mg (34)
2-Methyl-3-dihydroxyethyl-naphthochinon	500000 E/g (31)
Dihydrovitamin-K ₁ -diacetat	1 · 10 ⁶ E/g (31)
2-Äthyl-3-phytyl-naphthochinon	200 γ (17, 25)
5-Oxy-naphthochinon (Juglon)	3 · 10 mg (wenig aktiv) (36)
2-Methyl-3-oxy-naphthochinon (Phthiocol)	10 mg/kg (30), 2 E/mg (32), 1 mg (33)
2-Oxy-3-(dimethylallyl)-naphthochinon (Lapachol)	3 · 5 mg (36)
2-Oxydimethyl-naphthohydrochinon-acetat	100000 E/g
2-Allyl-4-amino-naphthol-(1)	5 mg (32)
2-Methyl-1-oxy-4-aminonaphthalin-chlorhydrat	10 · 10 ⁶ E/g (31)
2-Methyl-3,6,7,8-tetrahydro-naphthochinon	1 mg (34)
Vitamin K ₁ -oxyd (2,3)	K ₁ (35)
p-Xylo-chinon (Phloro)	1 E/mg (33)
α-Tokopherylcchinon	10 mg (36), inaktiv (39)
Naphthotokopherol	1 mg inaktiv (34), 0,3 mg aktiv (35)
Naphthotokopherylcchinon	1 mg aktiv (34)

Die Tabelle ist nicht vollständig; bei einigen Stoffen gehen die Ansichten, ob sie wirksam sind oder nicht, noch auseinander. Die Zahlenangaben über den Grad der Wirksamkeit differieren mitunter erheblich, da in vielen Fällen nicht die

Mindestdosis geprüft worden ist und die Austestung überdies bei den verschiedenen Arbeitskreisen auf unterschiedliche Weise vorgenommen wurde. Der wichtigste Befund scheint zu sein, daß das einfache 2-Methyl-naphthochinon mindestens von derselben oder noch etwas größerer Wirksamkeit ist als das Vitamin K₁ selbst. Es wird daher die Möglichkeit diskutiert, ob letzteres sich aus jenem im Organismus bilden kann. Diese Synthese müßte dann allerdings eine quantitative sein, da nur so die erhöhte Wirksamkeit verständlich wäre. Andernfalls wäre das 2-Methylnaphthochinon der erste künstlich dargestellte vitaminwirksame Stoff, der ein natürliches Vitamin an Wirksamkeit übertrifft. Bemerkenswert ist ferner, daß alle Stoffe von erheblicher Vitamin K-Wirksamkeit die Methylgruppe in der 2-Stellung des Naphthalinringes besitzen, was übereinstimmt mit der auch bei anderen Vitaminen (B₁, B₂, E) gemachten Erfahrung, daß gerade Methylgruppen für die Wirksamkeit der Vitamine von maßgeblicher Bedeutung sind.

Die Vitamin K-Wirksamkeit ist, im ganzen betrachtet, recht wenig konstitutionsspezifisch, doch bleibt eine solche fast ausschließlich auf Naphthalinderivate beschränkt. Viele Benzochinonderivate wie Toluchinon, Thymochinon, Durochinon (25) und p-Benzochinon selbst sind unwirksam (30, 31, 32, 33). Eine Ausnahme scheint nur das p-Xylochinon zu machen (33) und nach Kuhn (36) auch das α-Tokopherylcchinon, wodurch erstmalig eine chemische Verknüpfung zweier Vitamine bez. Vitaminreihen miteinander gelungen wäre. Diese letzte Angabe hat sich jedoch nicht bestätigen lassen (39). Unwirksam sind auch o-Chinone und Derivate des Anthracinons und Phenanthrenchinons (30, 31, 32, 33, 36, 38).

Um die oft differierenden Angaben über die Vitamin K-Wirksamkeit, die nach verschiedenen Methoden gewonnen werden, vergleichbar zu machen und u. U. ineinander umzurechnen zu können, werden neuerdings synthetische Präparate als Standardsubstanzen in Vorschlag gebracht; so schlägt Thayer (41) 1 γ 2-Methyl-naphthochinon als Vitamin K-Einheit vor, nach Dam (31) ist jedoch das beständigere 2-Methyl-naphthohydrochinon-diacetat als Standard geeigneter.

VI. Vitamin K-Testmethoden.

Auf die Vielzahl der Methoden zur biologischen Bestimmung der Vitamin K-Aktivität sei nur kurz eingegangen. Präventivmethoden zur Auswertung von Vitamin K-Präparaten sind von den meisten Forschern aufgegeben und durch kurative Verfahren ersetzt worden. Fast allgemein wird die Beeinflussung der Blutgerinnung wegen der raschen Reaktionsfähigkeit als Kriterium benutzt, während die anderen Erscheinungen des K-Mangels, Blutungen und Ödeme, dafür weniger geeignet sind, da ihre Rückbildung nach Verabfolgung von Vitamin K-Präparaten nicht so schnell und regelmäßig erfolgt.

Thayer (42) definiert als Vitamin K-Einheit diejenige Menge eines Präparates, die notwendig ist, die Gerinnungszeit des Vollblutes bei 50% von 10 oder mehr Küken nach 14-tägiger vitamin-K-freier Ernährung auf 10 min. oder weniger herabzusetzen. Dam und Mitarb. (14, 43) bestimmen nicht die Gerinnungsfähigkeit des Gesamtblutes, sondern ermitteln die im Plasma vorhandene Prothrombinmenge. Es wird diejenige Konzentration einer aus Gewebeextrakten gewonnenen Thrombokinaselösung bestimmt, die eine Gerinnung des Plasmas in 3 min bewirkt. Die ermittelte Konzentration, dividiert durch die bei einem normalen Serum benötigte Thrombokinasekonzentration, ergibt den sog. „R-Wert“ als charakteristisches Maß für den Prothrombingehalt des untersuchten Plasmas. Als Vitamin K-Einheit wird diejenige kleinste Menge eines Vitamin K-Präparates pro Gramm Körpergewicht gewählt, die den R-Wert von 200 auf 1 zurückführt. Bei dieser Methode bleiben die für den Gerinnungsprozeß bedeutungsvollen möglichen Schwankungen des Gehaltes von Calcium und Fibrinogen im Plasma unberücksichtigt. Quick (44) hat deshalb für klinische Zwecke eine Methode ausgearbeitet, die sicherer arbeiten soll und außerdem weniger Blut benötigt; er gewinnt durch Zusatz von Oxalat ein calciumfreies Plasma und setzt bei der Ausführung der Reaktion gleichbleibende Calcium- und Thrombokinasmengen zu. Almquist und Klose (45) haben diese Methode bei K-avitaminotischen Hühnchen angewandt und gute Ergebnisse damit

erzielt. Warner, Brinkhous und Smith (46) berücksichtigen auch die Schwankungen des Fibrinogengehaltes und die Unterschiede der Prothrombinumwandlungszeit. Ihre Methode arbeitet sehr genau, ist aber recht umständlich; auf eine nähere Beschreibung ist hier verzichtet worden.

Ansbacher (33, 47) hat kurzfristige Testverfahren zur Auswertung von Vitamin K-Präparaten eingeführt. Er beschreibt einen 6-Stunden-Test und bezeichnet als Vitamin K-Einheit die kleinste Menge eines Stoffes, die bei 70—100 g schweren vitamin-K-frei ernährten Küken die Gerinnungszeit des Blutes bei der Mehrzahl der Tiere in der genannten Zeit auf die Norm zurückbringt. In ähnlicher Weise beschreibt Sampson (25) einen 18-Stunden-Test.

Auch in der Art der Applikation von Vitamin K-Präparaten bestehen große Unterschiede. Von manchen Autoren wird die zu prüfende Substanz einfach dem Futter beigemischt und ihre Wirksamkeit dann in Milligramm pro Kilogramm aufgenommener Nahrung angegeben. Im 3-Tage-Test nach Dam wird das Präparat an 3 aufeinanderfolgenden Tagen den vitamin-K-frei ernährten Küken eingegeben, entweder in Öl gelöst mit einer Sonde oder mit etwas Keks und Wasser zu einzelnen Bröckchen geformt. Neuerdings werden Vitamin K-Präparate in Öl gelöst und in den Kropf eingespritzt. 2-Methyl-naphthochinon kann als Natriumsalz oder Succinat seines Hydrochinons auch subcutan oder intravenös injiziert werden.

Die Vitamin K-Wirkung ist nach Verabreichung einer gerade ausreichenden Dosis meist nur von kurzer Dauer. Küken können daher bis zu einem Alter von 50 Tagen wiederholt zur Austestung von Präparaten verwendet werden.

Durch die vielfältige Art der Austestung der Vitamin K-Präparate erklären sich die oft widersprechenden Angaben verschiedener Autoren. Vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Methoden unter Verwendung geeigneter konstanter Testsubstanzen sind erst in geringer Zahl durchgeführt worden. Die Einheit nach Ansbacher ist etwa 20mal, diejenige nach Doisy und Thayer (42) wahrscheinlich ungefähr 30 mal größer als die von Dam benutzte Einheit. Eine wertvolle vergleichende Übersicht über die verschiedenen Testmethoden gibt die Firma E. Merck in ihrem Jahresbericht 1939.

VII. Zur Physiologie des Vitamins K.

Die ausführliche Darstellung, die Dam vor 3 Jahren in dieser Zeitschrift über das gesamte Erscheinungsbild der K-Avitaminose beim Küken gegeben hat, gilt noch heute in allen Einzelheiten. Während jedoch dänals die Frage, ob die Bedeutung des antihämorragischen Vitamins nur auf gewisse Vögel beschränkt ist, noch unentschieden bleiben mußte, wissen wir heute, daß das Vitamin K auch im Organismus der Säugetiere und auch des Menschen eine bedeutsame Rolle spielt. Daß es zunächst nicht gelungen war, Vitamin K-Mangelerscheinungen bei letzteren mit derselben Regelmäßigkeit wie bei Vögeln zu erzeugen, beruht darauf, daß das Vitamin K, das von Darmbakterien, insbesondere von *Bacterium coli*, gebildet wird, bei Säugetieren in genügender Menge von der Darmwand resorbiert werden kann, während dieses bei Vögeln infolge des wesentlich kürzeren Dickdarms und des raschen Stoffwechsels nicht in ausreichendem Maße möglich ist. Es ist bekannt, daß auch Vögel bei vitamin-K-armen Ernährung von den Erscheinungen eines ausgeprägten Vitamin K-Mangels verschont bleiben, wenn sie die Möglichkeit haben, Teile ihrer Faeces mit der Nahrung wieder aufzunehmen. Bei jeder experimentell zu erzeugenden K-Avitaminose ist daher sorgfältig jede Verunreinigung der Nahrung mit Kot zu vermeiden. Die Notwendigkeit des Vitamins K für Säugetiere läßt sich in einfacher Weise aufzeigen, wenn die Fettresorption im Darm und damit auch die Resorption des Vitamins durch Unterbindung der Gallenzufluhr gestört wird. So konnten an Ratten (5) und Hunden (48) durch operativ angelegte Gallenfisteln oder Abbindung der Gallengänge Vitamin K-Mangelerscheinungen beobachtet werden, die sich wie bei Küken durch Hämorragien und vermindernden Prothrombingehalt des Blutes äußern. Bei Fütterung eines Gallensäure-Vitamin K-Gemisches, nicht aber der Komponenten allein, steigt auch bei Gallenfistelratten der Prothrombinspiegel wieder an.

Über die Wirkungsweise des Vitamins K haben auch neuere Untersuchungen kaum zuverlässigeren Anhaltspunkte

gebracht. Es ist anzunehmen, daß das Vitamin K irgendein Organ oder irgendein Gewebe befähigt, Prothrombin zu bilden, daß es vielleicht selbst einen Bauteil, etwa die prosthetische Gruppe, des Prothrombins darstellt. Diese Auffassung wird gestützt durch Dams (14) Beobachtung, daß auch per os verabfolgte Prothrombinpräparate Vitamin K-Wirksamkeit besitzen. In vitro vermag das Vitamin K jedoch kein Prothrombin zu bilden und besitzt daher auch keinen Einfluß auf die Blutgerinnung; auch die Wirkung der Thrombokinase wird durch Vitamin K in vitro nicht beeinflußt. In vivo läßt sich nach Injektion hochaktiver Präparate bei K-avitaminotischen Tieren das Ansteigen des Prothrombinspiegels zeitlich verfolgen; die Wirkung setzt nicht sofort ein, sondern erst nach einer gewissen Zeit. Nach einigen Stunden, nach Cheney (49) schon nach 1 h, ist bei genügend hoher Vitamin K-Applikation die Blutgerinnung wieder normal. Den Ort der Prothrombinbildung im Organismus kennt man nicht genau; man war zuerst geneigt, die Leber als die Wirkungsstätte des Vitamins K anzunehmen. Injektion von Vitamin K führt jedoch auch bei einer Gans mit ausgeschalteter Leber zu einer Aufhebung der Gerinnungsanomalie. Noch deutlicher läßt sich zeigen, daß das Vitamin bei entmilzten Tieren genau so wirkt wie bei intakter Milz (4). Untersuchungen, die die mögliche Rolle des Knochenmarks und anderer Teile des reticulo-endothelialen Systems aufdecken sollen, haben noch nicht zu endgültigen Ergebnissen geführt.

VIII. Vitamin K-Therapie beim Menschen.

Beim Menschen können K-avitaminotische Erscheinungen häufig dann beobachtet werden, wenn der Zufluß der Galle zum Darm fehlt oder zumindest stark verringert ist und infolgedessen die natürliche Resorption des Vitamins K ungenügend ist, so bei Verschluß der Gallenwege durch Entzündungen, Tumoren oder Gallensteine. Es ist schon lange bekannt, daß ein längere Zeit bestehender Okklusionsikterus (Gelbsucht mit vollständigem Verschluß des Gallenabflusses) immer eine Neigung zu Blutungen mit sich führt, die für chirurgische Eingriffe an solchen Patienten außerst gefährlich sein kann. Dieser hämorragischen Diathese (Neigung zu Blutungen) geht stets ein herabgesetzter Prothrombingehalt des Blutes parallel. Daß diese Gerinnungsanomalie bei Patienten mit Okklusionsikterus durch Vitamin K-Präparate behoben werden kann, ist 1938 unabhängig voneinander von Dam und Glavind (14) sowie von Warner, Brinkhous und Smith (50) und auch von Butt, Snell und Osterberg (51) beobachtet worden. Durch intramuskuläre Injektion von Vitamin K als Emulsion gelang es ohne Ausnahme, im Laufe von 5—7 Tagen normale Blutgerinnungszeiten zu erzielen und damit die Blutungsgefahr zu beheben.

Nach Caroli (52) können Operationen ganz allgemein an sich schon einen starken Prothrombinabfall des Blutes nach sich ziehen infolge eines zu geringen Gehaltes der Galle an Gallensäuren. Sinkt der Prothrombinspiegel auf etwa 25%, so muß mit dem Auftreten mitunter lebensgefährlicher Blutungen gerechnet werden. Die voroperative und nachoperative Anwendung von Vitamin K-Präparaten, entweder allein subcutan oder zusammen mit gallensauren Salzen per os, wird daher in letzter Zeit immer häufiger befürwortet (53).

Auch die Hypothrombinämie bei einheimischer Sprue (meist in den Tropen vorkommende Verdauungsstörung) (54) und Zöliakie der Kinder (schwere Verdauungsstörung jenseits des Säuglingsalters), sowie andere Ernährungsschäden im Zusammenhang mit skorbutischen und pellagraähnlichen Erscheinungen (55) werden auf mangelnde Vitamin K-Aufnahme des Organismus zurückgeführt und können mit einer Vitamin K-Therapie günstig beeinflußt werden.

Hämophilie (erbliche Bluterkrankheit), essentielle Thrombopenie (Blutplättchenmangel, Werlhofsche Krankheit), toxische Purpura (Hautblutung), Menorrhagie (überreichliche Monatsblutung), Metrorrhagie (Gebärmutterblutung) und aplastische Anämie (Hämoglobinmangelstörung) beruhen dagegen nicht auf einem Mangel an Prothrombin und sind daher durch Vitamin K nicht zu beheben. Die von manchen Autoren als durch Vitamin K-Mangel verursacht angesehene Encephalomalacie (Gehirnerweichung) wird nach Mason (56) bei Küken durch Vitamin K-Gaben nicht verhindert.

Ein neues, erfolgversprechendes Indicationsgebiet für Vitamin K-Präparate scheint sich bei der Hypothrombinämie der Neugeborenen zu erschließen (57, 58). Die abnorm hohe Blutgerinnungszeit bei Neugeborenen, verursacht durch die in der ersten Lebenswoche ungenügende Nahrungsaufnahme und die Abwesenheit einer Vitamin K produzierenden Darmflora, kann zu schweren Blutungen Anlaß geben. Auch ein hochgradiges Prothrombindefizit wird bei Neugeborenen durch Vitamin K prompt beeinflußt und manifeste Blutungen können zum Stillstand gebracht werden.

Von besonderem Vorteil ist die große therapeutische Breite der Vitamin K-Präparate; hypervitaminotische Störungen konnten auch bei Verabfolgung großer Vitamin K-Dosen bisher nicht beobachtet werden.

Schrifttum.

- (1) *Dam*, diese Ztschr. **50**, 807 [1937]. — (2) *Almquist*, J. biol. Chemistry **117**, 517 [1937]; **125**, 631 [1933]. — (3) *Dam*, Biochem. Z. **215**, 485 [1929]; **220**, 159 [1930]. — (4) *Dam* u. *Glavind*, Biochem. J. **30**, 1073 [1933]; **31**, 22 [1937]; Z. Vitaminforsch. **9**, 71 [1933]. — (5) *Greasies* u. *Schmidt*, Amer. J. Physiol. **125**, 429 [1939]; Proc. Soc. exp. Biol. Med. **41**, 443 [1933]. — (6) *Murphy*, Science [New York] **89**, 203 [1939]. — (7) *Dam* u. *Glavind*, Skand. Arch. Biochem. **22**, 239 [1933]; Naturwiss. **21**, 201 [1940]. — (8) *Dam* u. *Glavind*, Biochem. J. **33**, 435 [1933]. — (9) *MacCorquodale*, *Binkley*, *McKee*, *Thayer* u. *Doisy*, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **49**, 482 [1933]; **41**, 194 [1933]. — (10) *Almquist*, *Mechi* u. *Klose*, Biochemic. J. **32**, 1837 [1933]; Proc. Soc. exp. Biol. Med. **33**, 333 [1939]. — (11) *Dam*, Z. Vitaminforsch. **8**, 248 [1933]. — (12) *Binkley*, *Thayer*, *MacCorquodale* u. *Doisy*, J. biol. Chemistry **130**, 219 [1933]; **131**, 327 [1933]. — (13) *Karrer*, *Geiger*, *Legler*, *Ruegger* u. *Salomon*, Helv. chim. Acta **22**, 1464, 1513 [1933]. — (14) *Dam*, *Glavind*, *Lewis* u. *Tage-Hansen*, Skand. Arch. Physiol. **79**, 121 [1939]; Biochemic. J. **32**, 1018 [1939]. — (15) *Almquist* u. *Klose*, J. biol. Chemistry **114**, 241 [1936]; **120**, 636 [1937]; J. Amer. chem. Soc. **61**, 582, 745 [1939]. — (16) *Dam*, *Geiger*, *Glavind*, *P. Karrer*, *W. Karrer*, *Rothschild* u. *Salomon*, Helv. chim. Acta **23**, 310 [1939]. — (17) *Fieser*, *Campbell*, *Fry* u. *Gates*, J. Amer. chem. Soc. **61**, 2559, 2561, 3467 [1939]; Science [New York] **91**, 81 [1940]. — (18) *Riegel*, *Schweitzer* u. *Smith*, J. biol. Chemistry **129**, 272, 495 [1939]. — (19) *Karrer* u. *Geiger*, Helv. chim. Acta **22**, 945 [1939]. — (20) *McKee*, *Binkley*, *MacCorquodale*, *Thayer* u. *Doisy*, J. Amer. chem. Soc. **61**, 1295 [1939]. — (21) *Ewing*, *Vandenbelt* u. *Kamm*, J. biol. Chemistry **131**, 345 [1939]. — (22) *Karrer*, Helv. chim. Acta **23**, 1146 [1939]. — (23) *Fernholz*, *Ansbacher* u. *Moore*, J. Amer. chem. Soc. **61**, 1613 [1939]. — (24) *MacCorquodale*, *Cheney*, *Binkley*, *Holcomb*, *McKee*, *Thayer* u. *Doisy*, J. biol. Chemistry **131**, 357 [1939]; J. Amer. chem. Soc. **61**, 1613, 1928, 2558 [1939]. — (25) *Fieser*, *Bowen*, *Campbell*, *Fries*, *Jones*, *Riegel*, *Schweitzer* u. *Smith*, J. Amer. chem. Soc. **61**, 1925, 1926, 2206 [1939]. — (26) *Binkley*, *McKee*, *Thayer* u. *Doisy*, J. biol. Chemistry **133**, 721 [1940]. — (27) *Almquist* u. *Klose*, J. Amer. chem. Soc. **61**, 2557 [1939]; J. biol. Chemistry **130**, 791 [1939]; **132**, 469 [1940]. — (28) *Binkley*, *Cheney*, *Holcomb*, *McKee*, *Thayer*, *MacCorquodale* u. *Doisy*, J. Amer. chem. Soc. **61**, 2558 [1939]; J. biol. Chemistry **130**, 433 [1939]. — (29) *Makino* u. *Morii*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **283**, 80 [1939]. — (30) *Almquist* u. *Klose*, J. Amer. chem. Soc. **61**, 1611, 1923, 2557 [1939]; J. biol. Chemistry **130**, 787 [1939]. — (31) *Dam*, *Glavind* u. *Karrer*, Helv. chim. Acta **23**, 224 [1940]. — (32) *Thayer*, *Cheney*, *Binkley*, *MacCorquodale* u. *Doisy*, J. Amer. chem. Soc. **61**, 1932 [1939]. — (33) *Fernholz* u. *Ansbacher*, ebenda **61**, 1924 [1939]; J. biol. Chemistry **131**, 399 [1939]; Science [New York] **90**, 215 [1939]. — (34) *Fernholz*, *MacCorquodale* u. *Ansbacher*, J. Amer. chem. Soc. **62**, 1619 [1940]. — (35) *Fieser*, *Campbell*, *Fry* u. *Gates*, ebenda **61**, 3216 [1939]; **62**, 996, 1829 [1940]. — (36) *Kuhn*, *Wallenfels*, *Weygand*, *Moll* u. *Hedding*, Naturwiss. **27**, 518 [1939]. — (37) *Sjögren*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **282**, 243 [1940]. — (38) *Tishler* u. *Sampson*, J. Amer. chem. Soc. **61**, 2559, 2563 [1939]. — (39) *Merck*, Jahresbericht 1939, 20. — (40) *Karrer*, *Geiger*, *Ruegger*, *Schwarz*, Helv. chim. Acta **23**, 585 [1940]. — (41) *Thayer*, *Binkley*, *MacCorquodale*, *Doisy*, *Emmett*, *Brown* u. *Bird*, J. Amer. chem. Soc. **61**, 2563 [1939]. — (42) *Thayer*, *MacCorquodale*, *McKee* u. *Doisy*, J. biol. Chemistry **132**, 120 [1939]; Proc. Soc. exp. Biol. Med. **40**, 478; **41**, 194 [1939]. — (43) *Schöniger*, Biochemie **J** **80**, 890 [1933]. — (44) *Quick*, Amer. J. Physiol. **118**, 230 [1937]; J. Amer. med. Assoc. **110**, 1658 [1933]. — (45) *Almquist* u. *Klose*, Biochemie. J. **31**, 1055 [1933]. — (46) *Warner*, *Brinkhous* u. *Smith*, Amer. J. Physiol. **114**, 657 [1935]; **123**, 236 [1935]. — (47) *Ansbacher*, J. Nutrit. **17**, 303 [1939]. — (48) *Dam* u. *Glavind*, diese Ztschr. **51**, 741 [1933]; Uebersicht für Liege **10**, 248 [1938]; Lancet **1938**, 720. — (49) *Cheney*, J. Lab. clin. Med. **21**, 933 [1933]. — (50) *Warner*, *Brinkhous* u. *Smith*, Amer. J. Physiol. **125**, 293 [1938]; Amer. J. med. Sci. **198**, 50 [1938]. — (51) *Butt*, *Snell* u. *Osterberg*, J. Amer. med. Assoc. **118**, 333 [1939]. — (52) *Caroli*, *Lavergne* u. *Bose*, Paris Med. **29**, 75 [1933]. — (53) *Stewart*, Ann. Surgery **109**, 588 [1939]. — (54) *Franchon*, Disselmeier, Wschr. **1933**, 1563. — (55) *Kark* u. *Looser*, Lancet **1938** II, 1162. — (56) *Mason*, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **41**, 50 [1939]. — (57) *Koller* u. *Flechter*, Klin. Wschr. **18**, 1058 [1939]; Schw. med. Wschr. **1939**, I, 188, 259. — (58) *Waddell*, *Guerry*, *Bray* u. *Kelly*, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **40**, 432 [1939]. — Eingang 27. November 1940. [A. 113.]

Ist der Nachweis von Blutspuren durch 3-Amino-phthalsäurehydrazid ein kennzeichnendes Verfahren?

Von Dr. phil. R. KRAUL, Dr. rer. nat. HANS HEINRICH MEYER und Dr. med. HANS HEINRICH MEYER
Aus dem Chemischen und Physikalischen Staatsinstitut der Universität Hamburg

Zum forensischen Nachweis alter Blutspuren, bei denen das Globin schon abgespalten ist, empfiehlt Specht¹⁾ das 3-Amino-phthalsäurehydrazid (Luminol), das, wie schon Gleu u. Pfannstiel²⁾ angaben, in wasserstoffperoxydhaltiger, sodaalkalischer Lösung mit Hämin Chemiluminescenz erzeugt. Nach Specht sollen weder anorganische Stoffe (Erde, Rost, Metalle und deren Oxyde) noch organische Stoffe (Speichel, Harn, Samen) die Reaktion auslösen. Frisches Blut erzeugt keine deutliche Reaktion. Als die Probe in einem Fall, bei dem möglicherweise Mord vorlag, angewendet wurde, gab ein Tuch mit verschiedenen farbigen Flecken die Lumineszenzreaktion. Die leuchtenden Stellen waren weiß. Die weiße Farbe rührte von Bleiweiß her, während Blutflecke nicht vorhanden waren. Daraufhin wurde die Spezifität der Reaktion genauer untersucht, u. zw. wurden die Wellenlängenmaxima der durch verschiedene Stoffe ausgelösten Chemiluminescenz bestimmt, weiterhin die Wirkung einer Reihe von Substanzen, die bei forensischen Untersuchungen zugegen sein können.

In der Literatur liegen über das Luminol folgende Angaben vor: Es leuchtet schwach in sodaalkalischer, nicht dagegen in einer Spur von Indazoloncarbonsäure enthaltenden Lösung; das Fluoreszenzmaximum liegt bei UV-Bestrahlung nach Albrecht³⁾ bei 4370 Å. Bei Zusatz von Natriumhypochlorit, Braunstein oder Platinmohr tritt eine intensive Chemiluminescenz auf (Maximum nach Albrecht bei 4570 Å, nach Harris u. Parker⁴⁾ bei 4400 Å). Das Spektrum reicht von 3800—5000 Å. Das Leuchten des Luminols ist ein empfindliches Reagens auf H₂O₂ und Peroxyde, z. B. in Äther, (Langenbeck u. Ruge⁵⁾, Schales⁶⁾) und dient nach Henze⁷⁾ zum Nachweis von Stoffen, die durch Peroxydbildung Hämolysen bewirken. Weiterhin kann das Luminol als hochempfindlicher Häminnachweis (10⁻⁸%) nach Plotnikow u. Kubal⁸⁾ benutzt werden. Mesohämin (Hämin + 2H) steigert die Luminescenz, ebenso Parahämatine wie Pyridin und Nicotin⁹⁾; diese rufen ohne Hämin ebenfalls, wenn auch schwächer, ein Leuchten hervor. In gleicher Weise wirksam sind peroxydasehaltige Kartoffel¹⁰⁾ und Rettigsäft¹¹⁾. Nach Holtz u. Trien¹¹⁾ erzeugen Ascorbinsäure, Cystein, Thioglykolsäure, Glutathion, Adrenalin und H₂S^{12), 13)} (besonders intensiv bei Gegenwart von

Cu-Salzen, welche als Oxydationskatalysatoren dienen¹⁴⁾) die Lumineszenzreaktion. Als unwirksam gelten außer den von Specht genannten Stoffen synthetische Porphyrinverbindungen, die Co und V enthalten¹⁵⁾. Während nach Specht die Luminolprobe den serologischen Blutnachweis nicht stört, wies Schales⁶⁾ nach, daß Hämin durch Luminol zerstört wird, da durch H₂O₂ die α- und γ-Methinbrücke im Häminmolekül wahrscheinlich angegriffen wird. Also sind größere Blutmengen erforderlich. Schales zeigte weiterhin, daß die Probe in Gegenwart von Cu-Salzen, mit der bei forensischen Untersuchungen oft zu rechnen ist, trotz der Gegenwart von Hämin negativ aussäßt. m_{200} CuSO₄ in n-NH₃OH bringt dagegen Luminol ebenso stark zum Leuchten wie Blut; nur ist die Leuchtdauer verkürzt. Die Intensität der Luminescenz hängt u. a. von dem pH der Lösung ab^{9, 12)}, da sich nach Svesnikow¹³⁾ Luminol in alkalischer Lösung zersetzt, und weiterhin von der Temperatur⁹⁾, was für forensische Untersuchungen wichtig ist.

Zur Deutung der Chemiluminescenz nimmt Albrecht³⁾ in alkalischer Lösung folgenden Übergang an: Luminol → Azoverbindung → Luminol. Die zweite Reaktion soll das Leuchten bewirken. Die Azoverbindung wurde von ihm aber nicht isoliert. Wir halten dagegen den das Leuchten auslösenden Stoff für ein aus Luminol gebildetes Peroxyd, ähnlich dem von Drew u. Garwood¹⁴⁾ aus dem Na-Salz des 5-Amino-phthalaz-1,4-dions und H₂O₂ in kristallisierter Form dargestellt. Diese Ansicht wird auch durch die Versuche von Baur¹⁵⁾ gestützt. Die Leuchtfähigkeit ist nach Drew u. Pearman¹⁶⁾ an die Stellung der NH₂-Gruppe gebunden; nur o-, nicht m-Aminoverbindungen zeigen Luminescenz.

Spektrographische Lumineszenzmessung.

Die Lumineszenzspektren wurden mit einem Raman-Spektrographen von Dr. Carl Leiss auf Agfa-Isopauplatten¹⁷⁾ aufgenommen. Die leuchtenden Flüssigkeiten befanden sich in einer Glasküvette mit einer wirksamen Schichtdicke von 25 mm. Die Spaltweite betrug 0,4 mm. Auf jeder Platte wurden mehrere Spektren untereinander aufgenommen und oberhalb und unterhalb je eine Aufnahme des Hg-Spektrums zur Wellenlängenbestimmung gemacht. Die Belichtungszeiten betrugen je nach Stärke des Leuchtens 2—15 h. Die belichteten Platten wurden 5 min mit Agfa Rodinal 1:20 entwickelt. Zur Lagebestimmung der maximalen Schwärzungen wurden die Aufnahmen mit dem Registriermikrophotometer von P. P. Koch u.

¹⁾ Diese Ztschr. **50**, 155 [1937].

²⁾ J. prakt. Chem. **148**, 137 [1933].

³⁾ Z. physik. Chem. Abt. A **136**, 321 [1928].

⁴⁾ J. Amer. chem. Soc. **57**, 1939 [1935].

⁵⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. **70**, 337 [1937].

⁶⁾ Ebenda **71**, 447 [1938].

⁷⁾ Klin. Wschr. **17**, 24 [1938].

⁸⁾ R. Biologisch. **2**, 185 [1938] (Chem. Ztbl.). **1939** II, 484.

⁹⁾ O. Schales, Ber. dtsch. chem. Ges. **72**, 167 [1939].

¹⁰⁾ R. Wegler, J. prakt. Chem. **148**, 135 [1937].

¹¹⁾ H. Wiegand, J. prakt. Chem. **243**, 1 [1937].

¹²⁾ H. Wiegand, J. prakt. Chem. **243**, 1 [1937].

¹³⁾ E. Briner u. E. Perrotet, Helv. chim. Acta **23**, 1253 [1940].

¹⁴⁾ Acta physicochim. [Russ.] **8**, 441 [1933] (Chem. Ztbl.). **1938** II, 515.

¹⁵⁾ J. chem. Soc. [London] **1938**, 791.

¹⁶⁾ Helv. chim. Acta **23**, 419 [1940].

¹⁷⁾ J. chem. Soc. [London] **1937**, 586.

¹⁸⁾ Den Apparat stellte uns Prof. Dr. F. Dannmeyer freundlicherweise zur Verfügung.