

es mit Oleyl-N-methyl-aurin, wie wir früher mitteilten, nicht selten gelingt, solche Reaktionen auszulösen, gelingt es mit 2'-Oxy-8'-acylaminonaphthalin-1'-azobenzol-2,5-disulfosaurem Natrium fast ausnahmslos, doch nur mit denjenigen Verbindungen, bei denen der Fettsäurerest mehr als 12 C-Atome enthält. Sehr häufig, aber nicht immer, wird durch die Voraugabe eines Vertreters aus dieser Substanzserie volle Reaktionsunfähigkeit des Uterus auf die nachfolgende Gabe einer andern Substanz aus der gleichen Serie erzielt. Gelegentlich, aber nicht häufig, haben auch Substanzen mit kürzerer Fettsäure, die selber keine Reaktion auslösen, neutralisiert. Die Auslösung einer Reaktion mit den von uns verwendeten Substanzen bewirkt keine Aufhebung anaphylaktischer Überempfindlichkeit, und umgekehrt können mit unseren Substanzen Reaktionen ausgelöst werden, nachdem vorher anaphylaktische Kontraktionen des Muskels ausgelöst worden sind. Anaphylaxieähnliche Reaktionen, wie sie hier mit chemisch bekannten Substanzen ausgelöst wurden, sind von *Kellaway* für Schlangengifte beschrieben. Auf die Analogie der hier beschriebenen Reaktionen mit der sog. Tachyphylaxie haben wir hingewiesen. Es handelt sich hier um ein noch ungeklärtes Phänomen, dem unserer Ansicht nach allgemeines Interesse zukommt.

Aus dem biochemischen Laboratorium des chem.-techn.  
Institutes der Eidgen. Techn. Hochschule Zürich.

## 176. Über die Isolierung des $\alpha$ -Phyllochinons (Vitamin K aus Alfalfa) sowie über dessen Entdeckungsgeschichte

von P. Karrer, A. Geiger, R. Legler, A. Rügger und H. Salomon.

(23. X. 39.)

In zwei früheren Mitteilungen<sup>1)</sup> haben wir über die Isolierung und das physikalische und chemische Verhalten des Vitamins K aus Alfalfa, das Phyllochinon, kurz berichtet. Die vorliegende Abhandlung enthält die genaue Beschreibung der Methode, die zuerst zur Isolierung dieses Vitamins geführt hat. Sie beruht auf einer Kombination von Adsorptionsverfahren und einer Molekulardestillation; als Kriterium der fortschreitenden Reinigung der Präparate diente ihre spektrographische Untersuchung bzw. die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten für die Wellenlänge 248  $m\mu$ . Der früheren Beschreibung des  $\alpha$ -Phyllochinons haben wir nichts hin-

<sup>1)</sup> H. Dam, A. Geiger, J. Glavind, P. Karrer, W. Karrer, E. Rothschild, H. Salomon, Helv. **22**, 310 (1939). — P. Karrer, A. Geiger, Helv. **22**, 945 (1939).

zuzufügen, indem alle jene Angaben auch weiterhin in vollem Umfang bestätigt werden konnten.

Dagegen nötigt uns leider die soeben erschienene Mitteilung von *E. A. Doisy* und Mitarbeitern<sup>1)</sup> über Vitamin K aus Alfalfa auf die Entdeckungsgeschichte dieses Vitamins nochmals zurückzukommen. In dieser Mitteilung wird von *Doisy* erneut die unrichtige Behauptung aufgestellt, das von uns in *Helv.* **22**, 310 (1939) beschriebene Präparat von Vitamin K hätte nur einen Reinheitsgrad von 50% besessen und das erste reine Vitamin-K<sub>1</sub>-Präparat sei im *Doisy'schen* Laboratorium erhalten worden.

Bereits im Jahre 1938 hatten *Doisy* und Mitarbeiter angegeben, Vitamin K aus Alfalfa in Form von farblosen Krystallen mit dem Smp. 69° rein isoliert zu haben<sup>2)</sup>. Jene Verbindung hatte jedoch, wie wir heute wissen, mit Vitamin K nichts zu tun, und die betreffenden Angaben mussten von den Autoren selbst zurückgenommen werden<sup>3)</sup>. In unserer ersten Abhandlung über Vitamin K<sup>4)</sup> vom 31. Januar 1939 haben wir dann über die Isolierung dieser Verbindung berichtet. Unser Vitamin K-Präparat wurde durch Analyse, Absorptionsspektrum und durch die blaue Farbreaktion, die es beim Zusammenbringen mit alkoholischer Natriumalkoholatlösung zeigt, charakterisiert, ferner durch die biologische Wirksamkeit. Erst am 20. April 1939, also ca. 3 Monate später, haben *Doisy* und Mitarbeiter ihr zweites Manuskript in Druck gegeben<sup>5)</sup>, in welchem nun die Isolierung des richtigen Vitamins K aus Alfalfa und eines zweiten Vitamins K<sub>2</sub> aus faulem Fischmehl mitgeteilt wurde.

Die Reinheit des von uns zuerst isolierten Vitamins aus Alfalfa wurde nun von zwei Seiten angezweifelt: *Fernholz*, *Ansbacher* und *Moore*<sup>6)</sup> gaben an, die blaue Farbreaktion mit Alkoholat. komme nicht dem Vitamin K selbst, sondern einem Abbauprodukt zu, da angeblich Fraktionen mit Vitamin-K-Wirkung erhalten worden seien, die jene Reaktion nicht aufwiesen. Dieser Einwand ist am augenfälligsten dadurch entkräftet worden, dass *L. F. Fieser*<sup>7)</sup> die Reaktion auch an synthetischem Phyllochinon (Vitamin K<sub>1</sub>) positiv fand; auch das in der nachfolgenden Abhandlung beschriebene synthetische Nor- $\alpha$ -phyllochinon verhält sich analog. Wir haben über die Konstitution jener blauen Salze kürzlich eingehend berichtet<sup>8)</sup>.

<sup>1)</sup> *J. Biol. Chem.* **130**, 219 (1939).

<sup>2)</sup> *Thayer*, *Mac Corquodale*, *Binkley* und *Doisy*, *Science* **88**, 243 (1938) sowie telegraphische Mitteilung an den Internationalen Physiologen-Kongress 1938 in Zürich.

<sup>3)</sup> *Mac Corquodale*, *Binkley*, *McKee*, *Thayer*, *Doisy*, *Proc. Soc. Exptl. Biol. et Med.* **40**, 482 (1939). — *Binkley*, *Mac Corquodale*, *Thayer*, *Doisy*, *J. Biol. Chem.* **130**, 220 (1939).

<sup>4)</sup> *Dam*, *Geiger*, *Glavind*, *P. Karrer*, *W. Karrer*, *Rothschild*, *Salomon*, *Helv.* **22**, 310 (1939). <sup>5)</sup> *Am. Soc.* **61**, 1295 (1939). <sup>6)</sup> *Am. Soc.* **61**, 1613 (1939).

<sup>7)</sup> *Am. Soc.* **61**, 2560 (1939).

<sup>8)</sup> *Helv.* **22**, 1146 (1939).

Der zweite Einwand gegen die Reinheit unseres Präparates stammte von *Doisy*, der angab, dass der Extinktionskoeffizient für die Wellenlänge 248 m $\mu$  bei seinem Präparat bedeutend höher liege als beim unsrigen. Wir möchten jetzt nochmals die in unseren beiden Abhandlungen über Vitamin K aus Alfalfa veröffentlichten Angaben über die Eigenschaften dieses Stoffes zusammenstellen, wobei ausdrücklich bemerkt sei, dass sich das Präparat, das zur zweiten Untersuchung diente (Helv. **22**, 945 (1939)) spektrographisch von jenem, das in der ersten Untersuchung (Helv. **22**, 310 (1939)) benutzt wurde, nicht unterschied und mit jenem identisch war.

| Experimentell gefunden   | Theorie          |
|--|------------------|
| Analyse des Phyllochinons:<br>C 82,2 <sup>1)</sup> ; 82,3 <sup>2)</sup> H 10,7 <sup>1)</sup> ; 10,5% <sup>2)</sup> | C 82,5 H 10,31%  |
| Analyse des Phyllohydrochinon-acetats:<br>C 78,00 <sup>2)</sup> H 10,05 <sup>2)</sup>                              | C 78,00 H 10,10% |
| Mol.-Gew. in Campher 445, 450 <sup>1)2)</sup>  | 450              |
| Potentiometrisch bestimmtes Mol.-Gew. 446 <sup>2)</sup>  | 450              |

Hr. Dr. *H. J. Almquist* hatte die Freundlichkeit, unser  $\alpha$ -Phyllochinon mit einem Präparat von Hrn. Prof. *Doisy* biologisch zu vergleichen; er teilte dem einen von uns (*P. K.*) mit, dass die Vitamin-K-Wirkung beider Präparate genau gleich gross sei.

Die vorstehenden Darlegungen lassen gewiss nicht den geringsten Zweifel zu, dass wir schon in der Abhandlung vom 31. Januar a. e. das reine Phyllochinon beschrieben haben und dass die von *Doisy* später dargestellten Präparate nicht reiner waren. Übrigens haben wir auch zuerst die heute anerkannte Bruttoformel C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub> für Phyllochinon vorgeschlagen<sup>3)</sup>, während sich *Doisy* und Mitarbeiter für die Zusammensetzung C<sub>32</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub> aussprachen<sup>4)</sup>.

Es bleibt noch die ungeklärte Diskrepanz in bezug auf die Höhe der Extinktionskoeffizienten der Präparate unseres Laboratoriums und derjenigen der amerikanischen Forscher. *L. F. Fieser*<sup>5)</sup> konnte an seinem synthetischen  $\alpha$ -Phyllochinon den hohen, von *Doisy* angegebenen Extinktionskoeffizienten ebenso wenig beobachten wie wir am natürlichen Präparat. Für Vitamin K<sub>2</sub> fanden wir fast genau denselben Extinktionskoeffizienten wie für Vitamin K<sub>1</sub><sup>3)</sup>, und da andererseits nach *Doisy*<sup>6)</sup> die Acetate der Dihydro-vitamine K<sub>1</sub> und K<sub>2</sub> unter sich auch gleich hohe Extinktionen besitzen, muss man annehmen, dass auch für die freien Vitamine K<sub>1</sub> und K<sub>2</sub> im *Doisy*'schen Laboratorium sehr ähnliche Extinktionen gefunden

<sup>1)</sup> Helv. **22**, 310 (1939).

<sup>2)</sup> Helv. **22**, 945 (1939).

<sup>3)</sup> Helv. **22**, 945 (1939).

<sup>4)</sup> Am. Soc. **61**, 1295 (1939).

<sup>5)</sup> Am. Soc. **61**, 2560 (1939).

<sup>6)</sup> Am. Soc. **61**, 1612 (1939).

worden sind. Wenn diese von den unserigen abweichen sollten, so kann es sich nicht um Verschiedenheiten der Präparate handeln, da uns zur Messung des Extinktionskoeffizienten von Vitamin K<sub>2</sub> ein Präparat aus dem *Doisy'schen* Laboratorium zur Verfügung stand<sup>1)</sup>. Übrigens sind die Angaben von *Doisy* und Mitarbeitern über das Absorptionsspektrum des Dihydro-phylochinon-acetats unvollständig. Die Autoren haben eine allgemeine Absorption in der Gegend von 200 m $\mu$ —300 m $\mu$  mit Maximum bei 230 m $\mu$  beobachtet, und es ist ihnen entgangen, dass das Spektrum von dem starken Maximum bei 282 m $\mu$  beherrscht wird. Ausserdem liegt der Extinktionskoeffizient für 232,5 m $\mu$  höher als die amerikanischen Autoren angeben; wir finden  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1580$  (232,5 m $\mu$ ). (Vgl. unsere Absorptionskurve, *Helv.* **22**, 945 (1939), und das untenstehende, im Kurzwelligen ergänzte Bild, Fig. 1).

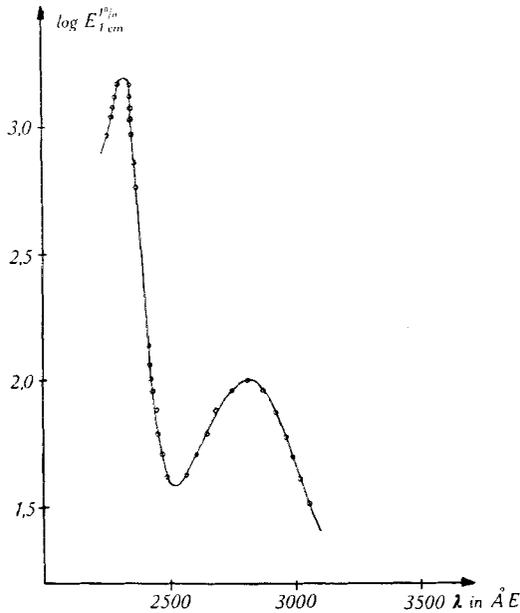


Fig. 1.

Diacetyl- $\alpha$ -dihydro-phylochinon. Smp. 60°. Maxima: 2325 Å (3,20); 2820 Å (2,00)

- Die eingeklammerten Zahlen bedeuten  $\log E_{1\text{cm}}^{1\%}$

<sup>1)</sup> Vgl. *Helv.* **22**, 945 (1939). — In der Arbeit von *Doisy* und Mitarbeitern, *J. Biol. Chem.* **130**, 232 (1939), findet sich die weitere unrichtige Angabe, wir hätten im Absorptionsspektrum des Vitamins K die Bande 243 m $\mu$  nicht gefunden. In Wirklichkeit ist diese Bande in der veröffentlichten Absorptionskurve (*Helv.* **22**, 311 (1939)) eingezeichnet und genau zu sehen! Da sie sehr schwach ist, fand sie im Text keine besondere Erwähnung.

Diese Darlegungen sollen die Bedeutung der Untersuchungen von *Doisy* und seinen Mitarbeitern über Vitamin K, die wesentlich zur Aufklärung dieses Vitamins beitrugen, nicht herabmindern. Dagegen können wir nicht zugeben, dass das Vitamin K aus Alfalfa, das wir in Helv. **22**, 310 (1939) beschrieben haben, unrein gewesen sei; es war das erste reine Präparat von Vitamin K, das isoliert worden ist.

Der Jubiläumsspende an der Universität Zürich und der Chemischen Fabrik F. Hoffmann-La Roche & Co., A.G. in Basel danken wir bestens für die Unterstützung dieser Untersuchungen.

### Isolierung von $\alpha$ -Phyllochinon (Vitamin K aus Alfalfa).

Als Ausgangsmaterial diente getrocknete und gemahlene Luzerne (Alfalfa). Diese wurde mit Petroläther vom Sdp. 40—60° in Extraktionsapparaten siedend extrahiert, wobei man auf je 30 kg trockenes Alfalfapulver ca. 40 Liter Petroläther anwandte. Dieser Extrakt enthält ungefähr 400—600 g Trockensubstanz; er wurde auf 20 Liter eingengt.

Der zweite Schritt ist die Entfernung des Chlorophylls aus der Lösung. Dies erreichten wir in bequemer Weise durch Einrühren von Zinkcarbonat in die petrolätherische Flüssigkeit, indem Chlorophyll von Zinkcarbonat viel leichter adsorbiert wird als  $\alpha$ -Phyllochinon (Vitamin K). Von dem oben erwähnten Petrolätherauszug wurden Portionen von 5 Liter durch Petrolätherzusatz auf 10 Liter verdünnt, in einer Probe der Gehalt der Lösung an Trockensubstanz ermittelt und hierauf fein gepulvertes Zinkcarbonat in kleinen Portionen und unter Rühren eingetragen. Die Menge des Zinkcarbonats soll das 20-fache Gewicht der vorher ermittelten Trockensubstanz der Lösung betragen. Nach 2-stündigem Turbinieren lässt man das Adsorbens absitzen; sollte die überstehende, klar gewordene Flüssigkeit noch grüne Farbe aufweisen, so rührt man so viel neues Zinkcarbonat ein, bis die Lösung rotorange aussieht. Ein Überschuss an Zinkcarbonat ist zu vermeiden, da sonst Verluste an  $\alpha$ -Phyllochinon entstehen.

Nachdem sich das Zinkcarbonat abgesetzt hat, wird die überstehende, klare Lösung abgehebert, der Zinkcarbonatrückstand nochmals mit 5 Liter Petroläther durchgerührt, nach erneuter Sedimentation die überstehende Lösung wieder abgehebert, der Rückstand auf eine grosse Nutsche gebracht und so lange mit Petroläther ausgewaschen, bis der Durchlauf farblos ist. Schliesslich engt man die gesamten Petrolätherlösungen auf 500 cm<sup>3</sup> ein.

Diese Lösung wird nun während 2 Tagen im Kälteschrank bei — 10° aufbewahrt. Hierbei scheiden sich farblose, feste Substanzen aus. Sie werden abgenutscht, mit etwas Petroläther ausgewaschen und die Filtrate im Vakuum auf dem erhitzten Wasserbad vom

Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand hat dunkle, braunrote Farbe und wachsartige Konsistenz. Er besitzt pro Gramm 100,000—150,000 *Dam'sche* K-Einheiten.

Die nächste Reinigungsstufe ist eine Molekulardestillation im Molekulardestillationsapparat. Man fängt die bis 150° übergehenden Anteile auf, die praktisch das gesamte Vitamin K enthalten. Dieses Destillat M enthält meistens ca. 200,000 E/g. Es erstarrt beim Erkalten grossenteils, indem dabei die früher<sup>1)</sup> von uns erwähnten Verbindungen: Triacontan, Medicagosterine I und II sowie andere Verbindungen auskrystallisieren. Zwecks Abtrennung der Hauptmenge dieser Stoffe verflüssigt man das Destillat durch leichtes Erwärmen und giesst es in dünnem Strahl unter Rühren in die 3- bis 4-fache Menge Aceton; die ausgefallenen festen Anteile werden abgenutscht, das Filtrat in den Eisschrank gestellt und nach 12-stündigem Stehen die neuerdings ausgeschiedenen festen Verbindungen durch Abnutschen entfernt. Nach dem Konzentrieren des Filtrats auf die Hälfte lassen sich weitere geringe Mengen fester, krystallisierter Verbindungen entfernen. Schliesslich verdampft man das Lösungsmittel Aceton im Vakuum und nimmt das zurückbleibende rotbraune Öl in 9 Teilen Petroläther auf.

Die nachfolgende Reinigungsoperation besteht in einer chromatographischen Zerlegung des Öls, wobei entwässertes Magnesiumsulfat als Adsorbens dient.

Zubereitung des Magnesiumsulfats: eine Schicht von krystallisiertem Magnesiumsulfat, die 6 cm hoch ist, wird in einem grossen Emailtopf stark erhitzt, bis die anfangs geschmolzene Masse erstarrt. Darauf wird 4 Stunden weiter erhitzt, dann die erkaltete Masse mit dem Meissel herausgeschlagen und in der Mühle fein gemahlen.

Die verwendeten Adsorptionsröhren besaßen 8 cm Durchmesser, 60 cm Länge und wurden mit einer 35 cm hohen Schicht von Magnesiumsulfat beschickt. Man saugt zuerst pro Röhre 350 cm<sup>3</sup> Petroläther ein und gibt dann in jede Röhre 120 cm<sup>3</sup> der oben erwähnten, petrolätherischen Lösung des Rohöls, die man vorher mit dem gleichen Volumen Petroläther verdünnt. Zur Entwicklung des Chromatogramms wäscht man zuerst mit 800 cm<sup>3</sup> Petroläther und hierauf mit ca. 1500 cm<sup>3</sup> einer Mischung von Petroläther und 10% Benzolzusatz. Der Durchlauf, d. h. die Flüssigkeit, welche die Röhre völlig passiert hat, enthält ca. 70% des Gewichtes des angewandten Rohöls und darin das gesamte Phyllochinon. Die Filtration durch die Magnesiumsulfatkolonne erlaubt somit die Abtrennung von 30% Verunreinigungen. Das Lösungsmittel wird verdampft; der Rückstand sei mit D bezeichnet.

Die weitere Reinigung des Präparates D erfolgt jetzt durch Chromatographie an Zinkcarbonat. Nachfolgend soll der Verlauf eines solchen Versuches beschrieben werden:

<sup>1)</sup> Helv. **22**, 310 (1939).

27 Röhren von 3 cm Durchmesser und 60 cm Höhe werden mit 40 cm hohen Zinkcarbonat-Schichten gefüllt. Dann saugt man pro Röhre zuerst 50 cm<sup>3</sup> Petroläther und hierauf eine Lösung von 1,5 g Substanz D, in 50 cm<sup>3</sup> Petroläther gelöst, ein und entwickelt das Chromatogramm durch Nachwaschen mit 150 cm<sup>3</sup> Petroläther und schliesslich mit 100 cm<sup>3</sup> einer Mischung von Petroläther mit 10% Benzolzusatz.

Das Chromatogramm zeigt nun folgendes Aussehen:

|       |   | Extinktionskoeff.<br>$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ für $\lambda$ 248 m $\mu$ |
|-------|---|---|
| 6 cm  | Schicht, schmutzig braun bis orange (Schicht e) | 0   |
| 4 cm  | „ (gelb)orange ( „ d)                           | 15  |
| 18 cm | „ rosa ( „ c)                                   | 55  |
| 3 cm  | „ orange bis rosa ( „ b)                        | 0   |
| 8 cm  | „ (unterste Schicht) hellgelb ( „ a)            | 0   |

Nach der Vereinigung der in den 27 Röhren gleichgelegenen Schichten wird von jeder Schicht das Absorptionsspektrum aufgenommen und der Extinktionskoeffizient für  $\lambda$  248 m $\mu$  ermittelt. Wie ersichtlich, konnte dieses Maximum nur in den Zonen d und c festgestellt werden, die somit am meisten Phyllochinon enthalten. Die weitere Reinigung geht nun so vor sich, dass man Fraktionen mit ähnlich hohen Extinktionskoeffizienten zusammennimmt und einer weiteren chromatographischen Trennung an Zinkcarbonat unterwirft; in den neuen Chromatogrammen müssen wiederum alle Schichten spektrographisch untersucht werden, da die  $\alpha$ -Phyllochinon-reichsten Zonen, je nach den Begleitstoffen, etwas höher oder etwas tiefer im Chromatogramm liegen können. Bei jeder neuen chromatographischen Adsorption an Zinkcarbonat steigt  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  für  $\lambda$  248 m $\mu$  in der besten Zone um ca. 35, so dass man in 7 bis 8 Adsorptionen zum chromatographisch sich einheitlich verhaltenden  $\alpha$ -Phyllochinon gelangen kann. Die Aufarbeitung der unreineren Fraktionen und Mischschichten macht natürlich weitere chromatographische Trennungen notwendig.

Aus 200 g Molekulardestillat M können ca. 0,5 g reines Phyllochinon isoliert werden, d. h. ca. 15—20% des darin enthaltenen Vitamins K. Dazu sind aber hunderte von Einzelchromatographierungen erforderlich.

Die genaue Beschreibung des reinen Phyllochinons haben wir schon früher<sup>1)</sup> gegeben.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

<sup>1)</sup> Helv. 22, 310, 945 (1939).