

Über das Verhalten von Phenylhydroxylamin und dessen Nitrosoderivat im Organismus.

Von

E. Sieburg.

Aus dem Institut für Pharmakologie und physiologische Chemie der Universität zu Rostock.)

(Der Redaktion zugegangen am 23. Juli 1914.)

Das Ammoniumsalz des Nitrosophenylhydroxylamins ist von seinem Darsteller O. Baudisch¹⁾ als «Cupferron» bezeichnet worden. Diese Verbindung hat deswegen ein etwas erhöhtes Interesse gefunden,²⁾ weil sie in der analytisch-chemischen Praxis Verwendung findet als Trennungsmittel des Kupfers und Eisens von den meisten übrigen Schwermetallen. Cupferron bildet nämlich mit den genannten Elementen innere komplexe Salze im Sinne der Wernerschen Anschauung, die eine bequeme Trennung und quantitative Bestimmung namentlich auch des Eisens in der physiologischen Chemie ermöglichen.

Das Nitrosophenylhydroxylamin ist nun zwar auch wie seine Muttersubstanzen ein Protoplasmagift, aber ist sehr viel weniger giftig wie das Phenylhydroxylamin und das Hydroxylamin selbst. Es ist als Methämoglobin bildender Körper ein Blutgift. Die Leistungsfähigkeit des Herzens setzt es herab, erweitert die peripheren Gefäße und erniedrigt den Blutdruck. Zudem schädigt es die Niere. Direkte Wirkungen auf das Nervensystem hat es nicht.

Kaninchen vertragen subcutan, wohl wegen des höheren Alkaligehaltes des Blutes, der das gebildete Methämoglobin wieder für die Atmung disponibel macht, mindestens die zehnfache Menge Cupferron wie Katzen, die bei ca. 50 mg zugrunde

¹⁾ O. Baudisch, Chem. Ztg., 1909, Nr. 49, S. 1298.

²⁾ Ausführliche Literatur siehe bei N. Spindler, Über das biologische Verhalten des Cupferrons, Med. Inaug.-Diss., Rostock 1914.

gehn. Verhältnismäßig große Mengen lassen sich Hunden per os beibringen, ohne die Tiere allzusehr zu schädigen.

Bei einem Hunde, der innerhalb drei Tagen 2,5 g Cupferron erhalten hatte, fanden sich am Ende dieser Periode Zeichen einer leichten Nephritis: Spuren von Eiweiß im Harn und im Sediment rote Blutkörperchen und einige hyaline Zylinder. Der Harn an und für sich reduzierte nicht, wohl aber, nachdem er 30 Minuten mit Salzsäure erwärmt war. Der die Reduktion bedingende, durch Hydrolyse entstandene Körper gab, wenn auch in dieser Form im Harn unschön, die Reaktionen der Glukuronsäure. Somit war der Gedanke an einen Übergang des Cupferrons in den Harn in Form einer gepaarten Glukuronsäure gegeben und es wurde nun versucht, größere Mengen dieser Substanz in reinem Zustande zu isolieren.

Es wurde mehreren Hunden gleichzeitig drei bis fünf Tage hindurch je 1 g Cupferron verfüttert. Vorher wurden die Tiere einige Tage unter normalen Bedingungen im Versuchskäfig gehalten, im Harn aber niemals nachweisbare Mengen von Glukuronsäure frei oder in Paarung gefunden. Die Harne wurden vereinigt und, um sie von dem eventuell vorhandenen Eiweiß zu befreien, zum Sieden erhitzt und filtriert. Der nun zunächst durch Bleiacetat hervorgerufene Niederschlag zeigte sich bei der Verarbeitung frei von den gesuchten Stoffen. Nunmehr wurde mit Bleiessig gefällt. Wie durch Reduktionsproben festgestellt werden konnte, ging die gepaarte Glukuronsäure auch nicht völlig in diesen durch basisches Blei gebildeten Niederschlag. Erst durch Bleiessig + Ammoniak wurde eine völlige Ausfällung der Substanz erzielt.

Bei der Verarbeitung dieses Bleiniederschlags erwies sich Schwefelsäure, Natriumsulfat oder Natriumcarbonat nicht als zweckmäßig. Denn selbst der vorsichtige Zusatz von Schwefelsäure schien Zersetzung der Glukuronsäure herbeizuführen und bei Anwendung von Sulfat oder Natriumcarbonat ließen die Ausbeuten zu wünschen übrig.

So wurde denn der Bleiniederschlag in Wasser suspendiert und durch Einleiten von Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Bleisulfid wurde noch einige Male mit etwas warmem Alkohol

ausgelaugt. Das fast wasserhelle Filtrat wurde zwecks Neutralisierung mit einem Überschuß von Baryumcarboat versetzt und die ganze Masse auf dem Wasserbad zur Trockene verdampft. Dieser Trockenrückstand wurde mit einem Gemisch von Alkohol und Äther ausgezogen und der Auszug eingedunstet. Er hinterließ als weiße mit einzelnen Krystallnadeln durchsetzte Masse. Sie löste sich spielend in Äther, gut in Alkohol, schlecht in kaltem, besser in warmem Wasser. Zwecks Reinigung wurde mit Wasser aufgenommen und im Scheidetrichter mit Äther ausgeschüttelt. Der mittels geglühten Natriumsulfats getrocknete Ätherauszug wurde etwas eingeeengt mit Alkohol und wenig Wasser versetzt und der Krystallisation überlassen. Es krystallisierten prachtvolle bis 1,5 cm lange farblose zu Büscheln angeordnete Nadeln.

Es gelangte so der Harn von Hunden zur Verarbeitung, die zusammen im ganzen 14 g Cupferron verabfolgt bekommen hatten. Trotzdem durch Vorproben natürlich Verluste entstanden waren, konnten so ca. 2,3 g der reinen Substanz isoliert werden.

Der Körper war aschefrei und löste sich mit neutraler Reaktion sehr leicht in Äther, leicht in Alkohol, schwer in kaltem, besser in warmem Wasser. Alkalizusatz begünstigte momentan die Löslichkeit in Wasser nicht. Die Substanz war stickstoffhaltig, krystallwasserfrei und schmolz zwischen 179° und 180° unter Zersetzung. 0,2074 g in 26,28 g absolutem Alkohol gelöst gaben im 200 mm-Rohr $\alpha_D^{22} = -1,56^\circ$.

0,1864 g Substanz gaben 0,3621 g CO₂ und 0,0848 g H₂O
= 53,49% C und 5,09% H.

0,2331 g Substanz gaben 0,4585 g CO₂ und 0,1064 g H₂O
= 53,64% C und 5,03% H.

0,4102 g Substanz verbrauchten nach Kjeldahl 15,2 ccm $\frac{n}{10}$ -H₂SO₄
= 0,02128 g N = 5,11% N.

Ein Körper von der empirischen Formel C₁₂H₁₃NO₆ verlangt theoretisch: C = 53,93%, H = 4,87%, N = 5,24%.

Obgleich die gefundene Substanz gar keine sauren Eigenschaften hatte, gab sie doch nach dem Zerkochen mit Salzsäure die typischen Reaktionen einer gepaarten, bzw. der nunmehr abgespaltenen freien Glukuronsäure. Fehlingsche Lösung wurde sofort reduziert. Mit Phloroglucin und Salzsäure färbte

sich die Lösung kirschrot, welche Farbe sich mit Amylenhydrat ausschütteln ließ und hier ein Absorptionsband in Gelb und Gelbgrün zeigte. Mit Orcin und Salzsäure gekocht entstand zunächst eine violette Verfärbung, die schließlich mit smaragdgrüner Farbe in Amylenhydrat übergang und das Spektrum in Orange und Gelb verdunkelte. Die Tollenssche Naphtoresorcinprobe lieferte den prachtvoll violettblauen ätherlöslichen Farbstoff mit dem Absorptionsband in Gelb.

Was den an die Glukuronsäure gebundenen Paarling angeht, so fiel auf, daß beim Neutralisieren des Hydrolysates mit Natriumcarbonat eine schwache Violettfärbung auftrat und daß Eisenchlorid in ganz schwach salzsaurer Lösung kurz vor dem Neutralisationspunkt ebenfalls intensiv violett verfärbte. Es wurde nun eine etwas größere Menge der Substanz mit 10%iger Salzsäure 15 Minuten im Wasserbade erhitzt, nach dem Erkalten mit Natronlauge übersättigt und mit Äther ausgeschüttelt. Der Ätherrückstand bestand aus winzigen, etwas schmutzig braun verfärbten Nadelchen, die folgende Reaktionen gaben:

1. Millons Reagens färbte schon in der Kälte rosa, beim Erwärmen tiefrot.

2. Mit Eisenchlorid entstand sofort eine intensiv violette Farbe.

3. Natriumhypochlorit erzeugte einen grünen Farbenton, der bald zu Gelb verblaßte.

4. Die Indophenolreaktion trat prompt ein; denn nach Erwärmen mit Salzsäure und etwas wässriger Phenollösung riefen einige Tropfen Natriumhypochlorit eine rotviolette Färbung hervor, und nach Überschichten mit Ammoniak färbte sich die obere Schicht indigblau.

5. Nach nochmaligem Sublimieren zwischen Uhrgläsern zeigten die Kryställchen bei schnellem Erhitzen den Schmelzpunkt 183°.

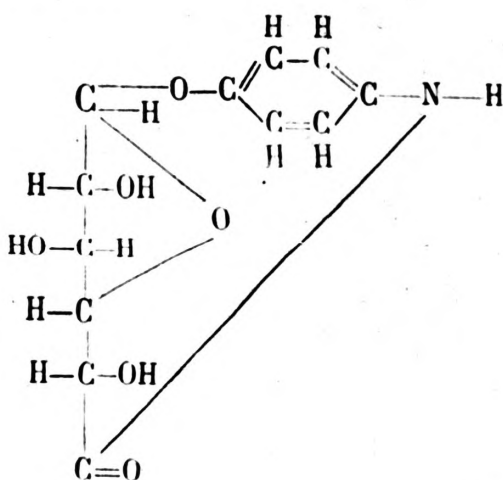
Hiermit ist bewiesen, daß der Glukuronsäurepaarling p-Aminophenol ist.

Diese Verbindung zwischen p-Aminophenol und Glukuronsäure reduzierte, wie bereits erwähnt, Fehlingsche Lösung nicht, sie gab auch mit Eisenchlorid keine Violettfärbung und

— sie veränderte das Spektrum einer Hämoglobinlösung nicht. Zufällig blieb eine Suspension der Substanz in Wasser mit reichlich ungelöstem Bodensatz, die mit einigen Tropfen Natriumcarbonatlösung versetzt war, einige Tage stehen. Die Substanz war völlig in Lösung gegangen und hatte sich dabei dunkel gefärbt. Auch jetzt wurde Fehlingsche Lösung nicht reduziert; die neutralisierte Flüssigkeit erzeugte nun aber in einer Oxyhämoglobinlösung ein deutliches Methämoglobin-Spektrum. Da Alkali in solchen Verdünnungen auf gepaarte Glukuronsäuren nicht spaltend einwirkt, mußte irgend eine andere intramolekulare Umwandlung stattgefunden haben oder eine Bindung gelöst sein.

Die Glukuronverbindung gehört ferner zum Typus der β -Glukoside. Denn nach sehr kurzer Einwirkung von Emulsin ließ sich in der neutralen Suspension durch Reduktion freie Glukuronsäure und durch Eisenchlorid p-Aminophenol nachweisen.

Diesen Tatsachen zufolge läßt sich der Körper von der Formel $C_{12}H_{13}NO_6$ auffassen als das Lactam der p-Aminophenolglukuronsäure:



Eine mit p-Aminophenol gepaarte Glukuronsäure ist übrigens in der Literatur schon erwähnt, nämlich von Jaffe und Hilbert¹⁾ als Ausscheidungsprodukt des Acetanilids und von Mörner²⁾ als Stoffwechselprodukt desselben Körpers. Rein

¹⁾ M. Jaffe und P. Hilbert, Diese Ztschr., Bd. 12, 1888, S. 295.

²⁾ K. A. H. Mörner, Ebenda, Bd. 13, 1889, S. 12.

Teil wird vielleicht verbrannt, und nicht unwahrscheinlich ist, daß ein anderer Teil in anders entgifteter Form, z. B. als Ätherschwefelsäure im Harn erscheint, wenn diese auch nicht nachgewiesen, bezw. wenn auch nicht daraufhin untersucht wurde.

Es lag nun nahe, die direkte Muttersubstanz des Cupferons, nämlich das Phenylhydroxylamin, bezüglich seines Verhaltens im Tierkörper zu studieren. Allzu reichlich sind die Mitteilungen über die biologischen Eigenschaften dieses Körpers nicht.¹⁾ Es scheint ein starkes und rasch wirkendes Gift zu sein, denn es tötet per os eingeführt Kaninchen innerhalb zwei bis drei Tagen schon in Gaben von 0,01—0,02 g. Während Lewin die durch das Gift gesetzte Blutveränderung — Methämoglobinbildung — als die wesentliche Ursache des Krankwerdens und des Todes der Versuchstiere hinstellt, möchte Binz dies mehr durch Lähmung der Nervenzentren erklären.

Nach Verfütterung von Phenylhydroxylamin beim Kaninchen erhielt Lewin im Petrolätherextrakt des Harns einen Stoff, der nach Reduktion mit Zinn und Salzsäure durch Chlorkalk in wässriger Lösung «zuerst einen orangefarbenen, bei Mehrzusatz des Reagens rot werdenden, nach Zusatz eines Überschusses sich aufhellenden, resp. teilweise verschwindenden Niederschlag» bildete. Da Lewin mit reinem Azoxybenzol dieselbe Reaktion erhielt, so nimmt er an, daß das Phenylhydroxylamin in Form von Azoxybenzol in den Harn übergeht. Gewiß, beim Liegen an der Luft lagert sich Phenylhydroxylamin unschwer in Azoxybenzol um; aber um dies auf den Tierkörper zu übertragen, so ist doch zu bedenken, daß Azoxybenzol einmal noch recht giftig und dann auch gänzlich unlöslich in Wasser ist.

E. Meyer spaltete den Harn seiner mit Phenylhydroxylamin vergifteten Versuchstiere zuerst durch Kochen mit Säure

¹⁾ L. Lewin, Arch. für exper. Path., Bd. 35, 1895, S. 401. — Derselbe, Dtsch. med. Wchschr., Bd. 32, 1906, S. 710. — C. Binz, Arch. für exper. Path., Bd. 36, 1895, S. 403. — E. Meyer, Diese Zeitschrift, Bd. 46, 1905, S. 503.

und erhielt durch Ätherextraktion des wieder alkalisch gemachten Harns einen Körper, der eine sehr intensive Indophenolreaktion gab und der deshalb als p-Aminophenol angesprochen wurde.

Zu eigenen Versuchen wurden wieder kräftige Hunde von ca. 10 kg und mehr gewählt. Das verwendete Phenylhydroxylamin war frisch hergestellt und wurde vor jeder Darreichung, wenn es sich verfärbt hatte, von neuem umkristallisiert. Der erste Hund ging nach Verabfolgung von 0,3 g per os innerhalb drei Tagen zugrunde. Unter Zuzuzemachen der Tatsache, daß die auf Methämoglobinbildung beruhende Giftigkeit eines Stoffes durch gleichzeitige Alkalidarreichung abgeschwächt wird, da Alkali das Methämoglobin im Blute in alkalisches Methämoglobin umwandelt, dies beim Durchgang durch die Leber zu Hämoglobin reduziert und dann in der Lunge wieder zu Oxyhämoglobin oxydiert werden kann, wurden mit 0,3 g Substanz gleichzeitig mehrere Gramm Natriumcarbonat an zwei Tiere verfüttert. Dies erwies sich aber als ein schwerer Fehler. Denn die Tiere bekamen heftigstes Erbrechen und starben innerhalb 20 Minuten unter Krämpfen. Das Blut war enorm methämoglobinhaltig. Das Phenylhydroxylamin gehört eben zu der Klasse von Giften, die auf reduktivem Wege Methämoglobin bilden und deren reduzierende Kraft durch Alkali noch gesteigert wird.

Es gelang jedoch, den Hunden einige Tage hintereinander 0,2 g Phenylhydroxylamin beizubringen, das mit einigen Tropfen Salzsäure in Pillenform verarbeitet war. Die Untersuchung des Harns geschah in derselben Weise wie beim Nitrosophenylhydroxylamin. Auch hier gelang es, aus dem durch basisches Blei + Ammoniak hervorgerufenen Niederschlag das Lactam der p-Aminophenolglukuronsäure zu isolieren, das durch Schmelzpunkt und Charakterisierung der Spaltungsprodukte identifiziert wurde.

Was nun das Verhältnis der Giftigkeit des Nitrosophenylhydroxylamins zu der des Phenylhydroxylamins angeht, so scheint es a priori bei theoretischer Betrachtung nicht unwahrscheinlich, daß der Eintritt der an sich stark wirkenden Nitroso-

gruppe in das Molekül des Phenylhydroxylamins dessen Giftigkeit erhöhen würde. Gerade aber das Umgekehrte ist der Fall. Eine nicht veresterte oder sonstwie substituierte endständige Aminogruppe bedingt eine hohe Giftigkeit. Verschuß des Amino- oder Iminowasserstoffs selbst durch Nitrosogruppen schwächt die Giftwirkung ab; ein kleiner Beitrag zu dem viel diskutierten Thema: chemische Konstitution und physiologische Wirkung.
