

Ueber das Verhalten der Phosphorsäurephenolester im Thierkörper.

Von

Dr. W. Autenrieth und **Dr. med. Zoltán von Vamóssy**,

Privatdocent in Freiburg i. B.

aus Budapest.

(Mittheilung aus der medicinischen Abtheilung des Universitätslaboratoriums in
Freiburg i. B.)

(Der Redaction zugegangen am 7. Juli 1898.)

Wie der eine von uns¹⁾ vor Kurzem gezeigt hat, lassen sich Phenole leicht in Phosphorsäureester überführen, wenn man ihre Lösung in verdünnter Natronlauge (10%) mit etwas mehr als der berechneten Menge Phosphoroxychlorid kräftig durchschüttelt. Hierbei erhält man immer den betreffenden neutralen Phosphorsäureester und das Natriumsalz der entsprechenden einbasischen disubstituirten Phosphorsäure, z. B. aus Carbolsäure das Triphenylphosphat $\text{OP}(\text{OC}_6\text{H}_5)_3$ und das Salz der Diphenylphosphorsäure $\text{OP}(\text{OC}_6\text{H}_5)_2\text{OH}$. Die erstere Substanz scheidet sich nach beendeter Reaction als eine weisse, amorphe Masse aus, während die letztere in Lösung bleibt. Nach diesem Verfahren sind die Phosphorsäurederivate der Phenole leicht zugängliche und in grösserer Menge erhältliche Substanzen; Autenrieth (l. c.) hat auch seiner Zeit nach dieser Methode eine ganze Reihe derselben dargestellt. — Die neutralen Phosphorsäureester sind meist farb-, geruch- und geschmacklose, gut krystallisirende Stoffe, die in Wasser unlöslich, in Alkohol und Aether ziemlich leicht löslich sind. Die disubstituirten Phosphorsäuren werden von Wasser gelöst und dann aus diesen Lösungen durch starke Salzsäure meist in

1) Berichte d. deutsch. chem. Ges., Bd. XXX, S. 2367.

Krystallblättchen ausgefällt; durch dieses merkwürdige Verhalten lassen sich diese Säuren leicht rein erhalten und näher charakterisiren.

Es schien uns von Interesse zu sein, das Verhalten der Phosphorsäurephenolester im Thierkörper näher kennen zu lernen, was umsomehr angezeigt war, als sich dieselben vielleicht vortheilhaft als Darmdesinficientien verwenden lassen. Einmal sollte bei dieser Untersuchung festgestellt werden, ob diese Stoffe im Organismus ähnlich wie andere Ester, z. B. Salol gespalten werden, und dann, wenn dies der Fall wäre, ob diese Spaltungen vollständige sind in Phenol und Phosphorsäure oder nur partielle in Phenol und phenylirte Phosphorsäuren. — Der Thierversuch hat zu dem Ergebniss geführt, dass das Triphenylphosphat eine fast ungiftige Substanz ist, von welcher man Hunden längere Zeit hindurch grössere Mengen verfüttern kann, ohne dass irgend welche Vergiftungserscheinungen auftreten; dabei wird es im Organismus zum grossen Theil in Phenol und Diphenylphosphorsäure gespalten. Entsprechend dieser Spaltung des Esters ist die gepaarte Schwefelsäure im Harn stark vermehrt, wenn man während einiger Tage grössere Mengen Triphenylphosphat verfüttert, während andererseits die Sulfatschwefelsäure fast vollständig verschwindet. Eine totale Spaltung des Esters in Phenol und Phosphorsäure erfolgt nicht, was schon daraus hervorgeht, dass nach Verfütterung des Esters die Phosphorsäuremenge im Harn kaum eine wesentliche Vermehrung erfährt, wenigstens kann aus der beobachteten geringen Zunahme von PO_4H_3 nicht der Schluss auf eine vollständige Spaltung gezogen werden. — Bei Eingabe von grossen Dosen bleibt eine erhebliche Menge Triphenylphosphat unresorbirt und findet sich dann unverändert in den Kothmassen vor.

Da durch den Versuch sicher nachgewiesen war, dass die Diphenylphosphorsäure im Thierkörper keine weitere Zerlegung erleidet, so schien die Entstehung dieser Säure durch eine Synthese im Organismus aus Phenol und Phosphorsäure bezw. phosphorsaurem Natrium nicht ausgeschlossen zu sein. Es schien die Annahme berechtigt zu sein, dass bei gleichzeitiger

Verfütterung von viel Phenol und Phosphorsäure neben der Phenolschwefelsäure auch Phenolphosphorsäure entstehen würde. Um eine derartige Synthese im Thierkörper zu verwirklichen, haben wir 10 Tage lang einem Hunde in 3 Dosen täglich 3 gr. Carbolsäure und je 10 gr. Phosphorsäure und phosphorsaures Natrium verfüttert und den während dieser Versuchsperiode gelassenen Harn nach dem weiter unten angegebenen Verfahren auf Phenolphosphorsäure verarbeitet. Hierbei wurde aus angesäuerter Lösung ein Aetherauszug erhalten, der, eingedampft, dann mit Aetznatron und Salpeter zusammengeschmolzen, eine Schmelze lieferte, welche mit molybdän-saurem Ammonium einen geringen gelben Niederschlag gab. Der Aetherrückstand aus dem sauren Harn hat somit Spuren einer phosphorhaltigen organischen Substanz enthalten. Es ist uns aber bis jetzt nicht geglückt, aus dem Harn des betreffenden Thieres eine phenylirte Phosphorsäure darzustellen. Höchst bemerkenswerth scheint die beobachtete Thatsache zu sein, dass ein Hund bei gleichzeitiger Verfütterung von Phosphorsäure bezw. phosphorsaurem Natrium grosse Mengen von Carbolsäure vertragen kann. Bei einem derartigen Versuche haben wir einmal einem mittelgrossen Hunde 6 gr. Carbolsäure pro die appliciren können, ohne dass Symptome einer Vergiftung aufgetreten wären. Das phosphorsaure Natrium scheint demnach auf die Carbolsäure in ähnlicher Weise eine entgiftende Wirkung auszuüben, wie dies E. Baumann seiner Zeit für das schwefelsaure Natrium gefunden hat. Dieses Verhalten des phosphorsauren Salzes findet ohne Zweifel seine richtige Erklärung darin, dass hierbei das ungiftige Alkalisalz einer phenylirten Phosphorsäure entsteht.

Versuche mit neutralem Phosphorsäurephenylester $\text{OP}(\text{OC}_6\text{H}_5)_3$.

Nach Verfütterung von Phosphorsäurephenylester konnte die Bestimmung der Phosphorsäure, der Sulfatschwefelsäure und Aetherschwefelsäure im Harn darüber Aufschluss geben, ob eine Spaltung des Esters, und zwar ob eine vollständige oder

nur theilweise eingetreten ist oder nicht. Für diese Versuche musste das betreffende Thier, ein kleiner Hund, zunächst in das Phosphorsäure- und Schwefelsäuregleichgewicht gebracht werden; das Versuchsthier bekam zu dem Zwecke während einer Reihe von Tagen das gleiche Futter, nämlich täglich 150 gr. Hundekuchen, 500 ccm. Milch und 300 ccm. Wasser. Wie aus der folgenden Tabelle zu ersehen ist, wurde das gewünschte Stoffwechselgleichgewicht nach einer achttägigen Fütterungsperiode erzielt. Das Körpergewicht des Hundes blieb während dieser Zeit, wie auch während der Fütterungsperiode mit Triphenylphosphat, nahezu das gleiche; es schwankte zwischen 10120 und 10350 gr. — Die Phosphorsäure wurde in allen Fällen durch Titration mit Uranylacetat bestimmt und zwar unter Verwendung von Ferrocyankalium als Indicator.

Tabelle I.

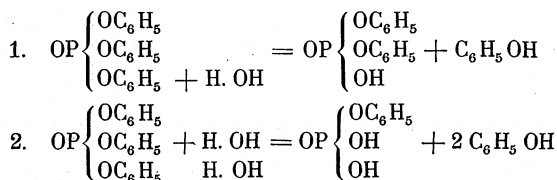
| Datum | Tages- menge Harn in ccm. | P ₂ O ₅ in der Tagesmenge Harn | A/BaSO ₄ in 100 ccm. Harn | B/BaSO ₄ in 100 ccm. Harn | A/H ₂ SO ₄ in der Tagesmenge Harn | B/H ₂ SO ₄ in der Tagesmenge Harn | Verhältniss zwischen A/H ₂ SO ₄ u. B/H ₂ SO ₄ |
|---------|------------------------------------|---|---|---|--|--|--|
| XI. 97 | | | | | | | |
| 26. | 500 | 1,083 | 0,1301 | 0,0356 | 0,2736 | 0,0748 | 3,7 |
| 27. | 470 | 0,980 | 0,1512 | 0,0340 | 0,2989 | 0,0672 | 4,4 |
| 28. | 520 | 1,004 | 0,1487 | 0,0336 | 0,3252 | 0,0735 | 4,4 |
| 29. | 540 | 1,101 | 0,1478 | 0,0348 | 0,3357 | 0,0790 | 4,2 |
| 30. | 480 | 0,847 | 0,1103 | 0,0292 | 0,2226 | 0,0589 | 3,8 |
| 1. XII. | 580 | 1,082 | 0,1688 | 0,0370 | 0,4117 | 0,0902 | 4,6 |
| 2. | 600 | 1,120 | 0,1560 | 0,0340 | 0,3924 | 0,0858 | 4,6 |
| 3. | 580 | 1,019 | 0,1595 | 0,0352 | 0,3891 | 0,0858 | 4,5 |
| 4. | 580 | 1,062 | 0,1639 | 0,0344 | 0,3998 | 0,0838 | 4,8 |

Bei einer sich hieran schliessenden ebenfalls achttägigen Versuchsreihe bekam der Hund in seinem Futter täglich 4 gr. Triphenylphosphat; Erbrechen oder sonstige Vergiftungserscheinungen konnten hierbei nicht constatirt werden. Das Thier blieb während der ganzen Zeit vollkommen munter und frass gerne das ihm dargereichte Futter.

Tabelle II.

| Datum | Tages- menge Harn in ccm. | P ₂ O ₅ in der Tagesmenge Harn | A/BaSO ₄ in 100 ccm. Harn | B/BaSO ₄ in 100 ccm. Harn | A/H ₂ SO ₄ in der Tagesmenge Harn | B/H ₂ SO ₄ in der Tagesmenge Harn | Verhältniss zwischen A/H ₂ SO ₄ u. B/H ₂ SO ₄ |
|---------|------------------------------------|---|---|---|--|--|--|
| XII. 97 | | | | | | | |
| 5. | 580 | 1,1327 | 0,0553 | 0,0860 | 0,1349 | 0,2098 | 0,6 |
| 6. | 660 | 1,1457 | 0,0168 | 0,1190 | 0,0476 | 0,3304 | 0,1 |
| 7. | 500 | 1,0524 | 0,0103 | 0,1030 | 0,0216 | 0,2166 | 0,1 |
| 8. | 460 | 0,8364 | 0,0110 | 0,1016 | 0,0212 | 0,1965 | 0,1 |
| 9. | 460 | 1,2377 | 0,0270 | 0,1080 | 0,0522 | 0,2089 | 0,2 |
| 10. | 480 | 1,1041 | 0,0253 | 0,0904 | 0,0510 | 0,1825 | 0,2 |
| 11. | 620 | 1,2799 | 0,0197 | 0,0864 | 0,0513 | 0,2253 | 0,2 |
| 12. | 520 | 1,2475 | 0,0252 | 0,0886 | 0,0551 | 0,1937 | 0,2 |
| 13. | 460 | 1,1479 | 0,0272 | 0,0846 | 0,0526 | 0,1638 | 0,2 |

Aus dieser Versuchsreihe ist zu ersehen, dass nach Eingabe von je 4 gr. Triphenylphosphat pro die die Phosphorsäuremenge im Harn nicht wesentlich vermehrt wird; der Ester konnte somit im Organismus des Hundes nicht vollständig in Phenol und Phosphorsäure gespalten worden sein. Da andererseits die gepaarte Schwefelsäure eine beträchtliche Vermehrung erfahren hat, während gleichzeitig die Sulfat-schwefelsäure fast vollständig verschwunden ist, so musste unbedingt Phenol aus dem Triphenylphosphat abgespalten worden sein. Im Hinblick hierauf war es von vornherein wahrscheinlich, dass der Phosphorsäurephenolester im Thierkörper eine Aufspaltung im Sinne einer der beiden folgenden Formeln erfahren hat:



Um dies zu entscheiden, wurde versucht, aus dem Harn des Hundes die entstandene phenylierte Phosphorsäure darzustellen. Zu dem Zwecke wurde der von der letzten Versuchsperiode noch vorhandene Harn, etwa 6 Liter, mit Natriumcarbonat übersättigt,

dann mit einer grösseren Menge Aether wiederholt ausgeschüttelt. Die vereinigten Aetherauszüge hinterliessen beim Abdestilliren des Lösungsmittels einen geringen schmierigen Rückstand, der beim Erhitzen mit Salpeter und Aetznatron eine Schmelze lieferte, die schwache Reaction auf Phosphorsäure gab. In den Harn des Hundes sind somit ganz geringe Mengen Triphenylphosphat unverändert übergegangen. Der nach dem Ausschütteln mit Aether gebliebene Harn wurde hierauf mit Salzsäure stark angesäuert, dann mehrere Male mit viel Aether ausgezogen. Die hierbei erhaltenen Aetherauszüge lieferten als Rückstand ziemlich viel eines bräunlich gefärbten Oeles, welches bei längerem Stehen in der Kälte grösstentheils krystallinisch erstarrte. Dieser Rückstand wurde mit kalter Sodalösung im Ueberschusse und Thierkohle tüchtig durchgeschüttelt, dann wurde abfiltrirt und das Filtrat mit viel starker Salzsäure versetzt; dasselbe trübte sich zunächst milchig und nach einiger Zeit schieden sich glänzende, wenig gefärbte Krystallblättchen aus. Dieselben wurden zur weiteren Reinigung nochmals in kaltem Wasser gelöst und aus dieser Lösung wiederum mit Salzsäure gefällt. Dabei wurden etwa $1\frac{1}{2}$ gr. vollkommen farblose Krystalle vom Schmelzpunkt 53° erhalten. Die so charakteristische Eigenschaft, aus wässriger Lösung durch Salzsäure gefällt zu werden, kommt, wie der eine von uns gezeigt hat (l. c.), der Diphenylphosphorsäure $OP(OC_6H_5)_2OH$ zu.

Zur weiteren Bestätigung des Befundes wurde die Substanz (Schmelzpunkt 53°) analysirt.

Analyse: I. 0,25 gr. Substanz gaben 0,5234 gr. $CO_2 = 57,1\%$ C und 0,1057 gr. $H_2O = 4,5\%$ H.

II. 0,185 gr. Substanz gaben 0,0787 gr. $Mg_2P_2O_7 = 11,9\%$ P.

Berechnet für:

$C_{12}H_{11}PO_4$: Procente: C 57,6, H 4,4, P 12,4.

Gefunden: Procente: C 57,1, H 4,7, P 11,9.

Der Versuch hat somit in unzweideutiger Weite ergeben, dass der neutrale Phosphorsäurephenylester im Thierkörper zum grossen Theil eine partielle Verseifung in Phenol und Diphenylphosphorsäure erleidet. — Aber nicht die ganze dem Körper einverleibte Menge Triphenylphosphat wird hierbei

resorbirt und in der angegebenen Weise gespalten; ein erheblicher Theil des Esters geht unverändert in die Faeces über. Den während der Versuchsperiode gesammelten Kothmassen entzog Aether ein bräunlich gefärbtes dickes Oel, welches bei längerem Stehen in der Kälte zum grossen Theil fest und krystallinisch wurde und das stark phosphorhaltig war, wie eine mit Aetznatron und Salpeter ausgeführte Schmelze ergeben hat. Diese Masse stellte ein Gemenge von Fettsubstanz und Triphenylphosphat dar; nur durch wiederholtes Lösen in Alkohol, Behandeln der Lösung mit Thierkohle und Ausfällen mit viel Wasser konnte hieraus reines Triphenylphosphat vom Schmelzpunkt 48—50° erhalten werden. Das Fett schied sich zuletzt oben auf der Flüssigkeit aus, während die untere krystallinische Schicht aus fast reinem Triphenylphosphat bestand.

Der neutrale Phosphorsäurephenylester wirkt nicht cumulativ; während am letzten Versuchstage, 13. XII. 97, nach Tabelle II das Verhältniss von A- zu B-Schwefelsäure 0,2 betragen hat, ist dasselbe am darauf folgenden Tage, nachdem zum ersten Mal kein Ester mehr verfüttert worden war, auf 2,3 gestiegen, um alsbald wieder den Durchschnittswerth von 4,5 zu erreichen. Wir lassen in Tabelle III diese Werthe folgen.

Tabelle III.

| Datum | Tagesmenge Harn in ccm. | P ₂ O ₅ in der Tagesmenge Harn | A/BaSO ₄ in 100 ccm. Harn | B/BaSO ₄ in 100 ccm. Harn | A/H ₂ SO ₄ in der Tagesmenge Harn | B/H ₂ SO ₄ in der Tagesmenge Harn | Verhältniss zwischen A/ und B/H ₂ SO ₄ |
|---------|-------------------------------|---|---|---|--|--|---|
| XII. 97 | | | | | | | |
| 14. | 400 | 1,1457 | 0,0889 | 0,0386 | 0,1496 | 0,0649 | 2,3 |
| 15. | 400 | 1,1458 | 0,0889 | 0,0386 | 0,1496 | 0,0648 | 2,3 |
| 16. | 500 | 1,0516 | 0,1731 | 0,0308 | 0,3641 | 0,0648 | 5,6 |
| 17. | 575 | 0,9437 | 0,1373 | 0,0298 | 0,3320 | 0,0725 | 4,5 |
| 18. | 580 | 0,9215 | 0,1385 | 0,0299 | 0,3351 | 0,0728 | 4,5 |
| 19. | 440 | 0,8212 | 0,1726 | 0,0382 | 0,3194 | 0,0706 | 4,5 |

Versuche mit Tri-p-Chlorphenylphosphat $OP(OC_6H_4Cl)_3$.

Um zu erfahren, ob auch Phosphorsäureester anderer Phenole sich im Thierkörper ähnlich verhalten, wie das Tri-

phenylphosphat, wurde noch das Tri-p-Chlorphenylphosphat in den Kreis der Untersuchung gezogen. Dieses Phosphat wird mit sehr guter Ausbeute erhalten, wenn man die Lösung von p-Chlorphenol in 10%iger Natronlauge mit der berechneten Menge Phosphoroxychlorid kräftig durchschüttelt. Der Ester wird zunächst als eine weisse, krümlige Masse ausgeschieden, die beim Umkrystallisiren aus viel Alkohol in feinen glänzenden Nadeln vom Schmelzpunkt 100° erhalten wird. — Der Thierversuch mit dem Tri-p-Chlorphenylphosphat hat ergeben, dass sich dasselbe im Organismus genau so verhält, wie der zuerst untersuchte Ester; die Substanz ist selbst in einer Dose von 6 gr. pro die für einen kleinen Hund ganz ungiftig. Im Verlaufe von 10 Tagen wurden gegen 50 gr. des Esters einem Hunde verfüttert; aus dem während dieser Versuchsperiode aufgesammelten Harn konnten nach dem oben angegebenen Verfahren gegen 3 gr. reine Di-p-Chlorphenylphosphorsäure $OP(OC_6H_4Cl)_2OH$ vom Schmelzpunkt 130° dargestellt werden. Auch diese Säure zeigt das höchst merkwürdige Verhalten, dass sie aus der wässerigen Lösung durch concentrirte Salzsäure in glänzenden Blättchen und flachen Nadeln ausgefällt wird.

Eine Phosphorbestimmung der erhaltenen Krystalle vom Schmelzpunkt 130° bestätigte weiterhin, dass dieselben aus Di-p-Chlorphenylphosphorsäure bestanden haben.

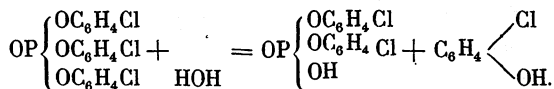
Analyse: 0,255 gr. Substanz gaben 0,083 gr. $Mg_2P_2O_7$,
entsprechend 9,1 Procent P.

Berechnet für:

$C_{12}H_9PO_4Cl_2$ Procente: P 9,69.

Gefunden: Procente: P 9,10.

Die Spaltung, welche das Tri-p-Chlorphenylphosphat im Thierkörper erleidet, lässt sich somit in der folgenden Gleichung ausdrücken:



Auch bei diesem Versuche ist ohne Zweifel ein grosser Theil des verfütterten Esters unverändert in die Faeces über-

gegangen. Da wir uns bei dieser Untersuchung hauptsächlich für die durch Spaltung entstandenen gepaarten Phosphorsäuren interessirten, so haben wir die Kothmassen nicht weiter untersucht, ebenso die Bestimmung der Phosphorsäure, der Sulfat- und Aetherschwefelsäure unterlassen.

Nach dem Ergebniss unserer Untersuchung scheint die Gesetzmässigkeit zu bestehen, dass die neutralen Phosphorsäureester der Phenole im Thierkörper so gespalten werden, dass als das eine Spaltungsprodukt stets eine diphenylirte Phosphorsäure von der allgemeinen Formel $OP(OR)_2OH$ entsteht.