

### 134. Über die Acetylierung von primären aromatischen Aminen in vivo und in vitro.

Versuche mit p-Aminobenzoesäure, 2-Sulfanilamido-thiazol, Anilinhydrochlorid und Sulfanilsäure

von F. Zehender.

(16. VI. 43.)

Der menschliche und tierische Organismus vermag durch eine Reihe von Kupplungsreaktionen körperfremde Substanzen zu entgiften. Primäre, aromatische Amine werden meist acetyliert. Die Reaktion vollzieht sich in der Leber; die entgifteten Verbindungen werden im Harn ausgeschieden. An den Aminobenzoesäuren, den Aminophenyllessigsäuren, an p-Aminobenzolsulfonsäure-amid und seinen Derivaten ist diese Fähigkeit des Menschen und verschiedener Tierarten eingehend untersucht worden (vgl. *F. Knoop*<sup>1)</sup>, *O. Neubauer* und *O. Warburg*<sup>2)</sup>, *A. Ellinger* und *M. Hensel*<sup>3)</sup>, *J. B. Muenzen*, *L. R. Cerecedo* und *C. P. Sherwin*<sup>4)</sup>, *E. K. Marshall*, *W. C. Cutting* und *K. Emerson*<sup>5)</sup>). Es wurde namentlich die Frage geprüft, von welchen Faktoren die Acetylierung abhängig sei. Man hat gefunden, dass diese verstärkt wird, wenn dem Organismus mit dem Amin gewisse Zusatzstoffe angeboten werden. Solche können sein Essigsäure, Intermediärprodukte des Stoffwechsels, die als unmittelbare Vorstufen der Essigsäure angesehen werden können, oder gewisse Stoffe der Nahrung, d. h. Bausteine von Kohlehydrat, Fett und Eiweiss (vgl. *M. Hensel*<sup>6)</sup>, *B. Harrow*, *Power* und *C. P. Sherwin*<sup>7)</sup>, *J. R. Klein* und *J. S. Harris*<sup>8)</sup>). Einen die Ausbeute ebenfalls steigern den Einfluss hat auch das Insulin (*B. Harrow* und *A. Mazur*<sup>9)</sup>). All dies deutet auf eine direkte Verknüpfung der Acetylierung mit dem Stoffwechsel. Es können aber auch mit der Nahrung aufgenommene Acetyl-Vorstufen direkte Verwendung finden. Unter Benützung von Essigsäure oder Äthylalkohol, welche mit schwerem Wasserstoff indiziert waren, ist dies von *K. Bernhard*<sup>10)</sup> streng bewiesen worden.

<sup>1)</sup> *F. Knoop*, Z. physiol. Ch. **67**, 489 (1910).

<sup>2)</sup> *O. Neubauer* und *O. Warburg*, Z. physiol. Ch. **70**, 1 (1910).

<sup>3)</sup> *A. Ellinger* und *M. Hensel*, Z. physiol. Ch. **91**, 21 (1914).

<sup>4)</sup> *J. B. Muenzen*, *L. R. Cerecedo* und *C. P. Sherwin*, J. Biol. Chem. **67**, 469 (1926).

<sup>5)</sup> *E. K. Marshall*, *W. C. Cutting* und *K. Emerson*, J. Am. Med. Ass. **108**, 953 (1937).

<sup>6)</sup> *M. Hensel*, Z. physiol. Ch. **93**, 401 (1915).

<sup>7)</sup> *B. Harrow*, *Power* und *C. P. Sherwin*, Proc. Soc. exptl. Biol. Med. **24**, 422 (1927).

<sup>8)</sup> *J. R. Klein* und *J. S. Harris*, J. Biol. Chem. **124**, 613 (1938).

<sup>9)</sup> *B. Harrow* und *A. Mazur*, J. Biol. Chem. **102**, 35 (1933).

<sup>10)</sup> *K. Bernhard*, Z. physiol. Ch. **267**, 91, 99 (1940).

Wird der Grad der Acetylierung aus den im Harn ausgeschiedenen Stoffen bestimmt, so ist noch zu berücksichtigen, dass eine rasche Ausscheidung die Ausbeute an gebundenem Amin herabsetzen und umgekehrt eine langsame Ausscheidung jene vergrössern kann.

Einen weiteren und wesentlichen Einfluss übt nun aber die Substanz selbst aus, welche acetyliert wird. Man kennt sowohl Amine, die nicht oder nur wenig, als auch solche, die in hohem Masse mit Essigsäure gekuppelt werden. In dieser Hinsicht zeigen vor allem die Sulfamide ein sehr verschiedenes Verhalten. Für gewisse Heilmittel dieser Gruppe wird gerade ihre gering ausfallende Acetylierung als besonders günstig hervorgehoben. Denn einerseits sind die Acetylverbindungen therapeutisch nicht mehr wirksam und andererseits können sie infolge ihrer meist geringen Löslichkeit in der Niere auskristallisieren, was eine schwere Schädigung für den Körper bedeutet.

Wenn schliesslich die Kupplung von Aminen durch den Organismus in erster Linie als „Entgiftung“ zu betrachten ist, so müsste auch ein direkter Zusammenhang zwischen Acetylierungsgrad und Toxizität der Verbindungen bestehen.

Die vorliegende Untersuchung prüft den Einfluss der Substanzen, welche acetyliert werden, auf die Kupplungsreaktion und richtet sich nach folgenden Fragestellungen:

1. Welche Unterschiede zeigen sich, wenn dem lebenden Organismus unter möglichst gleichen Versuchsbedingungen verschiedene Verbindungen eingegeben werden?
2. Lassen sich die in vivo gefundenen Ergebnisse auch in vitro feststellen? Lässt sich der Grad der Acetylierung auf die Stärke der Reaktionsfähigkeit der  $\text{NH}_2$ -Gruppe zurückführen?

#### Untersuchungsmethode.

Die Menge der gekuppelten Verbindungen wurde bestimmt durch kolorimetrische, quantitative Analysen von Blutserumproben und Urinfraktionen, welche fortlaufend in bestimmten Zeitabständen entnommen bzw. gesammelt wurden. Durch eine solche Untersuchung kann sowohl der Acetylierungsverlauf, als auch die Bilanz der im ganzen Versuch umgesetzten Substanzmenge angegeben werden. Die so gemessenen Werte hängen, wie oben dargestellt worden ist, von mehreren Faktoren ab und sind stets einer gewissen physiologischen Schwankung unterworfen. Die Unterschiede können bei verschiedenen Individuen, aber auch beim gleichen Individuum an mehreren Tagen auftreten. Es ist deshalb notwendig, bei vergleichenden Messungen stets Durchschnittszahlen grösserer Untersuchungsreihen zur Auswertung zu verwenden.

Ich benützte die von *G. Oesterheld*<sup>1)</sup> angegebene Bestimmungsmethode, die auf der Diazotierung der freien bzw. freigemachten aromatischen Aminogruppen und nachfolgenden Kupplung mit Acetyl-H-Säure beruht. Zur Kolorimetrie der Farblösungen wurde das *Pulfrich-Stufenphotometer* mit Filter S 53 verwendet. Der mittlere Fehler der Bestimmungen betrug  $\pm 4\%$  (vgl. *F. Zehender*<sup>2)</sup>).

<sup>1)</sup> *G. Oesterheld*, Schweiz. med. W'schr. **70**, 459 (1940); vgl. auch *J. Druey* und *G. Oesterheld*, *Helv.* **25**, 753 (1942).

<sup>2)</sup> *F. Zehender*, *Dermatologica* **85**, 132 (1942).

**Tabelle 1.**  
Versuche am Menschen

Eingabe (einmalige Dosen)		Ausscheidung										Acetylierung															
Substanz	g <sup>1)</sup>	Zahl der Fälle	in % der Eingabe										acetyliert total					acetyliert ausgesch. total					mg CH <sub>3</sub> CO— verbraucht				
			Stunden										in %					in %					Stunden				
			3	6	12	24	48	3	6	12	24	48	3	6	12	24	48	3	6	12	24	48	3	6	12	24	48
p-Aminobenzoesäure	1,0	2	51	68	72	75	—	51	92	98	100	—	56	65	66	68	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1,0	2	45	63	70	72	—	71	93	98	100	—	71	79	81	82	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1,0	2	14	40	55	63	—	100	100	100	100	—	100	100	100	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2,0	4	55	73	78	80	—	28	77	92	99	—	29	40	44	46	—	—	—	—	—	—	98	184	214	229	—
Sulfathiazol	0,08	2	30	45	65	92	—	14	24	24	38	—	14	17	19	29	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	0,40	1	25	38	60	75	79	14	27	28	36	31	14	19	22	25	25	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2,0	1	24	38	63	80	85	8	16	22	31	33	8	11	15	19	20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2,0	12	17	37	59	74	80	12	20	28	34	42	13	16	20	23	24	—	—	—	—	—	7	20	41	58	66
	2,0	3	11	22	38	47	52	24	31	51	53	67	24	27	37	40	43	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2,0	2	1	2	5	7	9	87	86	83	81	76	87	86	84	83	82	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

<sup>1)</sup> Bezogen auf freie Substanz.

Es wird jeweils die Konzentration des freien Amins und in einer besonderen Probe nach der Hydrolyse diejenige des freien + gebundenen Amins (= „total“) bestimmt. Die Konzentration des acetylierten Anteils ergibt sich dann aus der Differenz von „frei“ und „total“.

Das Verhalten des Menschen und des Meerschweinchens gegenüber p-Aminobenzoesäure (I) und 2-Sulfanilamidothiazol (II) (=Sulfathiazol).

Nach einmaliger Eingabe der krystallisierten Verbindungen per os in ungefähr äquivalenten Mengenverhältnissen (1,0 g I, bzw. 2,0 g II) wurden beim Menschen folgende Ergebnisse erhalten (siehe Tab. 1 und 2).

Dass von den beiden Substanzen die Monoacetylderivate im Harn ausgeschieden werden, ist von mehreren Autoren durch Isolierung und Identifizierung der Verbindungen gezeigt worden (vgl. *J. B. Muenzen*, *L. R. Cerecedo* und *C. P. Sherwin*<sup>1)</sup>, *K. Bernhard*<sup>2)</sup>, *F. W. Sunderman* und *D. S. Pepper*<sup>3)</sup>, *F. Zehender*<sup>4)</sup>).

Tabelle 2.  
Blut-Serumspiegel beim Menschen.

Substanz	Zahl der Fälle	Eingabe g	„frei“ mg%									
			nach ½	1	2	4	6	8				
			Stunden									
p-Amino-benzoesäure . . . . .	2	1,0	—	0,2	Sp.	0	—	—				
	4	2,0	1,4	1,8	0,9	0	—	—				
Sulfathiazol . . . . .	9	2,0	—	—	5,0	5,2	3,4	2,5				
Substanz	„total“ mg%						„acetyliert“ „total“ in % in den einzelnen Proben					
	½	1	2	4	6	8	½	1	2	4	6	8
	Stunden						Stunden					
p-Aminobenzoesäure . . . . .	—	0,5	1,0	0,8	—	—	—	60	(100)	100	—	—
	1,8	2,7	2,1	0,4	—	—	23	34	57	100	—	—
Sulfathiazol . . . . .	—	—	5,7	5,9	4,2	3,3	—	—	11	12	19	25

<sup>1)</sup> *J. B. Muenzen, L. R. Cerecedo* und *C. P. Sherwin*, *J. Biol. Chem.* **67**, 469 (1926).

<sup>2)</sup> *K. Bernhard*, *Z. physiol. Ch.* **267**, 91, 99 (1940).

<sup>3)</sup> *F. W. Sunderman* und *D. S. Pepper*, *Am. J. Med. Sci.* **200**, 790 (1940).

<sup>4)</sup> *F. Zehender*, *Dermatologica* **85**, 132 (1942).

Die Resorption lässt sich nicht genau zahlenmässig festhalten. Der Blutserumspiegel gibt kein genaues Bild, da sofort nach dem Übertritt der Stoffe ins Blut auch ihre Ausscheidung einsetzt und diese von sehr verschiedener Geschwindigkeit sein kann. Aus den Blutserum- und Urinwerten kann aber geschlossen werden, dass für beide Substanzen die Resorption eine gute ist.

In der Ausscheidung besteht aber ein deutlicher Unterschied. p-Aminobenzoesäure wird viel rascher ausgeschieden als Sulfathiazol. Auf dieser Erscheinung beruht es offenbar, dass der Serumspiegel bei II bedeutend höhere Werte erreicht als bei I. Die gesamte Ausscheidung ist aber annähernd gleich gross für beide Substanzen (von I: 75 %, von II: 74 % in 24 Stunden).

Die Acetylierung von p-Aminobenzoesäure ist sehr gross; sie erreicht meist noch vor der Ausscheidung der letzten Substanzreste sowohl im Serum als auch im Urin den Wert von 100 %, während bei Sulfathiazol als höchste Durchschnittswerte 25 % im Serum, bzw. 42 % im Urin gefunden werden. Auch die unter Berücksichtigung der effektiv ausgeschiedenen Mengen angestellten Bilanzrechnungen ergeben, dass von I tatsächlich mehr acetyliert worden ist als von II. Das verschiedene Verhalten ist um so bemerkenswerter, als I sich kürzere Zeit im Körper aufhält, also verglichen mit II weniger lang Gelegenheit hätte, gekuppelt zu werden. Da von beiden Verbindungen äquivalente Mengen verabreicht worden sind, und die Ausscheidung für beide etwa gleich gross ausgefallen ist, so dürfen die Werte „mg  $\text{CH}_3\text{CO}$ — verbraucht“ direkt miteinander verglichen werden. Man findet dabei, dass p-Aminobenzoesäure rund dreimal mehr Essigsäure gebunden hat als das Sulfathiazol (160 mg  $\text{CH}_3\text{CO}$ — gegenüber 58 mg). Der Organismus ist zu noch grösserer Acetylierungsleistung bereit, sofern die Eingabe erhöht wird (nach  $1 \times 2,0$  g I wurden in 24 Stunden 229 mg  $\text{CH}_3\text{CO}$ — verbraucht). Allerdings ist diese Zahl nicht auf das Doppelte gestiegen, wie zu erwarten gewesen wäre, sondern sie beträgt weniger. Mit zunehmender Dosis wird also relativ weniger umgesetzt.

Die Verhältnisse beim Meerschweinchen sind prinzipiell nicht verschieden von denjenigen beim Menschen. Bei jenem scheint aber das Acetylierungsvermögen etwas grösser zu sein als bei diesem (siehe Tab. 3).

Zum besseren Verständnis und zur Diskussion der Ergebnisse sind noch einige wesentliche Züge physiologischer Natur über den Acetylierungsvorgang hervorzuheben. Dieser muss sofort mit dem Erscheinen der Verbindungen im Blut eintreten, denn nach  $\frac{1}{2}$  Stunde bei I, bzw. nach 1 Stunde bei II ist im Serum schon gebundenes Amin nachweisbar. Daraus darf man schliessen, dass die Acetyl-Vorstufen auch sofort und immer verfügbar sind. Als solche dürfen wohl ein oder mehrere normale Stoffwechselprodukte angenommen werden.

**Tabelle 3.**  
Versuche am Meerschweinchen

Eingabe (einmalige Dosen)	Ausscheidung										Acetylierung												
	Zahl der Fälle	1) g/kg	% acetyliert	in % der Eingabe										acetyliert in % total					acetyliert ausgesch. in % total ausgeschieden				
				Stunden										bei den einzelnen Harn-Proben					als Bilanz				
				2	4	6	8	10	2	4	6	8	10	2	4	6	8	10	2	4	6	8	10
p-Aminobenzoesäure	1	0,01	0	33	45	52	62	74	99	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	2	0,1	0	35	41	48	56	58	87	99	99	100	100	100	100	87	89	90	91	92	91	91	93
	2	0,1	50	25	30	36	41	52	86	96	99	100	100	100	100	86	88	90	91	93	91	91	93
	2	0,1	100	4	13	17	22	27	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	1	0,33	0	13	19	22	22	24	84	94	94	94	91	—	91	72	79	81	81	82	81	81	82
Sulfathiazol . . .	1	0,02	0	1	23	30	35	39	34	35	54	43	57	34	35	34	35	39	40	41	39	40	41
	2	0,19	0	4	14	21	23	25	26	31	40	42	47	25	29	25	29	33	34	35	33	34	35
	2	0,19	50	12	17	21	23	24	22	35	52	63	61	22	26	22	26	31	33	35	31	33	35
	2	0,19	100	1	1	2	3	5	100	99	100	99	99	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
				3	3	6	12	24	3	3	6	12	24	3	3	6	12	24	3	6	12	12	24
Anilinhydrochlorid .	1	0,1	0	36	41	41	41	—	17	39	100	100	—	17	20	20	20	—	20	20	20	20	—
	1	0,14	0	9	21	30	46	46	67	75	77	79	79	67	72	72	74	75	72	74	74	74	75

1) Bezogen auf freie Substanz.

Andererseits ist ihr Vorrat aber nicht unbeschränkt gross, denn der Acetylierung sind Grenzen gesetzt, was daraus hervorgeht, dass eine deutliche „Dosisabhängigkeit“ besteht (vgl. Tab. 1 u. 3). Schon früher ist für eine grössere Untersuchungsreihe gezeigt worden, dass kleinere Dosen mehr acetyliert werden als grössere (vgl. *F. Zehender*<sup>1)</sup>).

Zudem ist der Kupplungsvorgang eine Zeitreaktion, da die gemessenen Werte im Verlaufe der Zeit stets zunehmen.

Die vergleichenden Versuche unter Verwendung äquivalenter Dosen zeigen nun aber, dass für die geringer ausfallende Acetylierung von II gegenüber I nicht ein Mangel an nötigen Acetyl-Vorstufen verantwortlich zu machen ist. Auch kommt nicht in Frage, dass die zur Kupplung nötige Zeit (etwa als Folge einer raschen Ausscheidung) zu kurz war, da gerade II länger im Körper verweilt als I. Sondern es wird noch ein wesentlicher Faktor in den besonderen Eigenschaften der betreffenden Substanzen zu suchen sein. Ob dies auf physiologische Gründe (zum Beispiel die Toxizität, Löslichkeit oder dgl.) oder aber auf chemische (Reaktionsgeschwindigkeit bei der Kupplung) zurückzuführen sei, suchte ich durch einige weitere Versuche zu ermitteln.

Aus dem Verhalten des Menschen nach Eingabe von freien Verbindungen geht hervor, dass für zwei Stoffe wesentliche graduelle Unterschiede bestehen. Wären diese nur in einer verschiedenen grossen Reaktionsgeschwindigkeit begründet, so dürfte man erwarten, dass schliesslich für beide Substanzen die vollständige Acetylierung erfolgt, sofern nicht die vorzeitige Ausscheidung diesem Endzustand entgegenwirkt. Für Sulfathiazol konnte dieser aber nie festgestellt werden. Die höchsten Werte an acetylierter Verbindung waren im Serum 25 %, im Urin 42 %. Ist dies nun als Folge einer sehr langsamen Umsetzung zu betrachten oder handelt es sich dabei um eine prinzipiell andere Einstellung des Organismus den beiden Substanzen gegenüber?

Um die Frage zu entscheiden, wurde das Verhalten des Menschen und des Meerschweinchens auch unter folgenden Bedingungen geprüft. Ich verabreichte

1. eine Mischung aus gleichen Teilen freier und acetylierter Verbindung (= 50% acetyliert),
2. die acetylierte Verbindung (= 100% acetyliert)

und untersuchte anschliessend das Blutserum und den Urin auf den Gehalt an freier und gebundener Substanz.

Für die Acetylderivate gilt, dass die Resorption und die Ausscheidung bedeutend langsamer, letztere auch unvollständiger als bei den freien Verbindungen erfolgt (siehe Tab. 1. u. 3). Dies mag mit den Löslichkeiten der Substanzen, die besonders im sauren Milieu des

---

<sup>1)</sup> *F. Zehender, Dermatologica* **85**, 132 (1942).

Magens bedeutend geringer sind (vgl. *E. Krüger-Thiemer*<sup>1)</sup>), zusammenhängen. Die Erscheinung muss bei der Beurteilung der Resultate mitberücksichtigt werden.

Es bestätigte sich nun die Auffassung, dass die p-Aminobenzoesäure, soweit dies immer möglich ist, in die vollständig acetylierte Verbindung umgewandelt wird. Nach Eingabe der Mischung wird nur um so rascher dasjenige Stadium erreicht, bei welchem die Substanz in gebundener Form vorliegt. Die p-Acetyl-aminobenzoesäure aber erscheint als solche in Serum und Urin wieder.

Dagegen liegen die Verhältnisse für Sulfathiazol grundsätzlich anders. Der Überblick ist deshalb etwas erschwert, weil hier die acetylierte Verbindung sehr langsam resorbiert und wieder ausgeschieden wird. Zieht man aber die Bilanz der im ganzen umgesetzten Substanzmengen, so ergibt sich im Fall 1 eindeutig, dass das dargebotene Verhältnis 1:1 im grossen ganzen beibehalten wird. Nach 48 Stunden sind vom im Harn ausgeschiedenen Sulfathiazol 43% in gebundener Form erschienen. Vom eingegebenen Acetyl-sulfathiazol wird aber ein Teil wieder in die freie Verbindung übergeführt. Dies äussert sich als langsam, aber stetig fortschreitende Reaktion. Von der nach 48 Stunden ausgeschiedenen Menge lagen 18% in freier Form vor.

Der Übergang von Acetylderivat in die freie Verbindung im Tierorganismus ist von *G. V. James*<sup>2)</sup> auch für Sulfanilamid und für Sulfanilamido-pyridin festgestellt worden.

Es sei nochmals darauf hingewiesen, dass hier ein prinzipieller Unterschied zwischen p-Aminobenzoesäure und Sulfathiazol besteht, der sich am lebenden Organismus äussert.

#### Vorläufige Untersuchungen über das Verhalten des Meerschweinchens gegenüber Anilin-hydrochlorid und Sulfanilsäure.

In zwei Tierversuchen, die erst als orientierende Vorversuche gelten können, wurde geprüft, wie sich das Meerschweinchen nach Einnahme von Anilin-hydrochlorid und Sulfanilsäure verhält. Bezüglich Ausscheidung steht das Anilin der p-Aminobenzoesäure nahe. Es erscheint sehr rasch im Harn wieder. Von der 12. Stunde an nach der Eingabe ist der Urin frei von diazotierbaren Substanzen. Die gesamte Ausscheidung beträgt aber nur 41% der eingenommenen Menge, sodass man schliessen muss, es werde vom Anilin ein grösserer Teil gespeichert oder abgebaut als von den übrigen untersuchten Verbindungen. — Sulfanilsäure wird ähnlich wie Sulfathiazol relativ langsam ausgeschieden.

<sup>1)</sup> *E. Krüger-Thiemer*, Arch. Derm. Syph. **183**, 90 (1942).

<sup>2)</sup> *G. V. James*, Biochem. J. **34**, 633 (1940).

Die Acetylierung von Anilin ist gering; sie erreicht bei weitem nicht die hohen Werte der p-Aminobenzoessäure. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Hauptmenge der Substanz sehr rasch wieder ausgeschieden wird, nämlich in den ersten drei Stunden 36 % der Eingabe. — Die Kupplung der Sulfanilsäure erreicht Werte, die zwischen denjenigen von Sulfathiazol und p-Aminobenzoessäure liegen. In der letzten Harnfraktion lagen 79 % der Substanz in acetylierter Form vor, während von der gesamten ausgeschiedenen Stoffmenge 75 % gebunden waren. Es fällt hier auf, dass das Verhältnis  $\frac{\text{acetyliert}}{\text{total}}$  in % bei den einzelnen Proben relativ konstant ist, d. h. von 67 % langsam gegen 79 % ansteigt. Offenbar wird auch hier, ähnlich wie bei Sulfathiazol, nie der Wert von 100 % erreicht.

#### Die Acetylierung von p-Aminobenzoessäure, Sulfathiazol, Anilin und Sulfanilsäure in vitro. .

Die Frage, ob die Kupplung der geprüften Verbindungen in vivo mit einer ungleich grossen Reaktionsgeschwindigkeit vor sich gehe, sollte auch ausserhalb des Organismus im Reagenzglas geprüft werden. Dazu verwendete ich verdünnte (0,001-m.), wässrige gepufferte Lösungen der Amine, versetzte sie mit einer abgemessenen Menge von Essigsäure-anhydrid und schüttelte die Mischung sofort stark. Die Reaktion tritt momentan, aber nicht quantitativ ein, da ein Teil des Essigsäure-anhydrids durch das Wasser hydrolysiert wird. Bei Einhaltung von gleichen Versuchsbedingungen ist ein Vergleich zulässig, da die Resultate gut reproduzierbar waren. Die jeweiligen umgesetzten Mengen wurden kolorimetrisch bestimmt nach Überführen der freien bzw. freigemachten Amine in einen Azofarbstoff.

Es soll hier nur über die Versuche berichtet werden, die bei  $p_H = 7,5$  durchgeführt worden sind, da sie am ehesten den physiologischen Bedingungen entsprechen. Sie sind in Tab. 4 zusammengestellt.

#### Die Verseifung von p-Acetyl-aminobenzoessäure (III) und von Acetyl-sulfathiazol (IV) in vitro.

Es wurden auch einige Messungen durchgeführt, die anzeigen sollten, ob in vitro im neutralen  $p_H$ -Bereich in wässriger, gepufferter Lösung eine verschieden grosse Verseifungsgeschwindigkeit bestehe. 0,001-m. Lösungen von III und IV in 0,1-m. Phosphatpuffer von  $p_H = 7,0$ ; 7,5 und 8,0 bleiben bei 8-tägigem Stehen bei 37° C unverändert. Werden die Lösungen 30 Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt, so bleiben jene von III unverändert, während die von IV in sehr geringem Masse verseift werden (am stärksten bei  $p_H = 8,0$ ).

Tabelle 4.

Acetylierung in vitro mit Essigsäure-anhydrid bei $p_H = 7,5$ und $15^{\circ}C$ . 0,001-m. Lösungen in 0,1-m. Phosphatpuffer. Nach Zugabe des ( $CH_3CO$ ) $_2O$ sofort geschüttelt. Probeentnahme nach 20 Minuten.				
Zahl der zu- gegebenen Äquivalente ( $CH_3CO$ ) $_2O$	Zahlen bedeuten die acetylierte Menge in %			
	pH, bei dem $-NH_2 \longrightarrow -NH_3^+$			
	4,5	3,7	3,2	
	4,7	4,0	3,4	1,9
	Anilin	p-Amino- benzoesäure	Sulfanilsäure	Sulfathiazol
2	97	34	12	Spuren
5		73		11
	100	75	36	11
	100	72	34	10
		73		12
10	100	95		20
20		100		29
	100	100	88	30

Erhitzt man die Lösungen während einer Stunde im Autoklaven auf  $120^{\circ}C$ , so finden sich folgende Werte (Messung kolorimetrisch):

Tabelle 5.

pH	Verseifungsgrad in %	
	III	IV
7,0	0	Spur
7,5	4	6
8,0	9	15

Die Versuche zeigen, dass die Verseifung der Acetylverbindungen bei neutralen  $p_H$  für IV etwas leichter vor sich geht als für III. Die Unterschiede sind sehr klein. Ob dies als eine chemische Erklärung gewertet werden darf für die in vivo festgestellte Verseifung von IV, sollen spätere Untersuchungen zeigen.

Die Basizitätskonstanten der untersuchten Verbindungen.

Es läge nahe, die gefundenen Unterschiede in der Acetylierung auf die Basizität der Aminogruppe zurückführen zu wollen. Eine stärkere Base sollte sich erwartungsgemäss leichter mit Essigsäure-

anhydrid verbinden als eine schwächere; bzw. sollte unter den gewählten Bedingungen grössere Ausbeuten an Acetylderivat geben. Als Mass für die Stärke einer Base kennt man aber ihre Dissoziationskonstante, welche deshalb nun noch in Beziehung zur Acetylierung gesetzt sei. Von den untersuchten Verbindungen sind die Dissoziationskonstanten meist bekannt; vom Sulfathiazol ist sie noch bestimmt worden<sup>1)</sup>. Da es sich um verschiedenartige Stoffe handelt, hat man in jedem einzelnen Falle zu überlegen, was der gemessene Wert bedeutet, das heisst, auf welches Ionengleichgewicht er sich bezieht. Auch ist zu berücksichtigen, dass die Versuche in vitro und in vivo bei  $p_H = 7,4-7,5$  stattgefunden haben. Die Ionengleichgewichte und die uns interessierenden Grössen sind in Tab. 6 zusammengestellt und sollen noch kurz näher erläutert werden.

Durch die Basizitätskonstante  $K_b$  wird ausgedrückt, in welchem Masse die betreffende basische Gruppe das Bestreben hat, Protonen zu suchen. Die Acetylierung kann als ein solcher Vorgang angesehen werden. Wie aus Tab. 5 und 6 hervorgeht, besteht für die vier Verbindungen die Gesetzmässigkeit, dass einem grösseren  $K_b$  eine stärkere Acetylierung entspricht.

Es ist ferner  $K_s$ , die Aciditätskonstante des  $-NH_3^+$ -ions (z. B. des Aniliniumions) angegeben.  $K_s$  lässt sich erhalten aus der Gleichung

$$K_s = \frac{K_w}{K_b}$$

wobei  $K_w$  die Dissoziationskonstante des Wassers ( $= 10^{-14}$ ) bedeutet. Der Wert  $K_s$  ist deshalb von Bedeutung, weil er angibt, bei welchem  $p_H$  die Base ( $-NH_2$ ) ins Salz ( $-NH_3^+$ ) umgewandelt wird.

Denn wenn

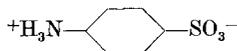
$$\frac{-NH_2}{-NH_3^+} = 1,$$

so wird

$$K_s = (H^+) = \text{die Wasserstoffionenkonzentration bzw. } p_{K_s} = p_H.$$

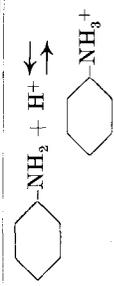
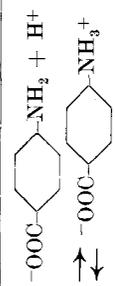
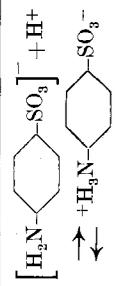
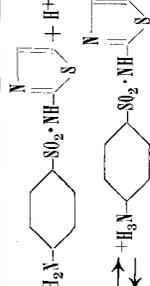
Die oben gefundene Gesetzmässigkeit lässt sich nun noch auf eine zweite Art ausdrücken: Je mehr die Salzbildung einer Base (Auftreten des  $-NH_3^+$ -ions) ins saure Gebiet verschoben ist, um so weniger wird diese acetyliert, vgl. Tab. 5.

Zu den einzelnen Stoffen ist noch folgendes beizufügen. Eine Besonderheit besteht im Falle der Sulfanilsäure, die in wässriger Lösung vollständig als Zwitterion vorliegt:

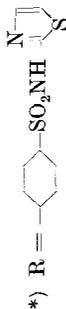


<sup>1)</sup> Die Messung wurde von Herrn Prof. Dr. G. Schwarzenbach, Zürich, ausgeführt, wofür ich auch an dieser Stelle bestens danke.

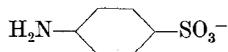
Tabelle 6. Die Basizitätskonstanten.

Substanz	Gleichgewicht	$K_b$ der $-\text{NH}_2$ -base	$K_s$ des $-\text{NH}_3^+$ -ions	$\text{pH}$ bei dem $-\text{NH}_2 \rightarrow -\text{NH}_3^+$	Temp. $^\circ\text{C}$	Autor
Anilin		$\frac{(\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_3^+) \cdot (\text{OH}^-)}{(\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2)} = 10^{-9,5}$ $= 10^{-9,3}$	$\frac{(\text{H}^+) \cdot (\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2)}{(\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_3^+)} = 10^{-4,5}$ $= 10^{-4,7}$	4,5 4,7	ca. 20 <sup>0</sup> 25 <sup>0</sup>	J. N. Pring <sup>2)</sup> J. Eggert <sup>3)</sup>
p-Amino-benzoesäure		$\frac{(\text{p-aminobenzoic acid}^+) \cdot (\text{OH}^-)}{(\text{p-aminobenzoic acid})} = 10^{-10,3,1}$ $= 10^{-10,0,1}$	$\frac{(\text{H}^+) \cdot (\text{p-aminobenzoic acid})}{(\text{p-aminobenzoic acid}^+)} = 10^{-3,7,1}$ $= 10^{-4,0,1}$	3,7 4,0	ca. 20 <sup>0</sup> 20 <sup>0</sup>	J. N. Pring <sup>2)</sup> A. Albert und R. Goldaere <sup>4)</sup>
Sulfamil-säure		$\frac{(\text{Sulfamyl acid}^+) \cdot (\text{OH}^-)}{(\text{Sulfamyl acid})} = 10^{-10,8}$ $= 10^{-10,6}$	$\frac{(\text{H}^+) \cdot (\text{Sulfamyl acid})}{(\text{Sulfamyl acid}^+)} = 10^{-3,2}$ $= 10^{-3,4}$	3,2 3,4	25 <sup>0</sup> 25 <sup>0</sup>	K. Winkelblech <sup>5)</sup> N. Bjerrum <sup>6)</sup>
Sulfa-thiazol		$\frac{(\text{Sulfathiazol}^+) \cdot (\text{OH}^-)}{(\text{Sulfathiazol})} = 10^{-12,1}$	$\frac{(\text{H}^+) \cdot (\text{Sulfathiazol})}{(\text{Sulfathiazol}^+)} = 10^{-1,9}$	1,9	20 <sup>0</sup>	G. Schwarzenbach <sup>7)</sup>

<sup>1)</sup> Durch Umrechnung erhalten. <sup>2)</sup> J. N. Pring, Faraday **19**, 705 (1923). <sup>3)</sup> J. Eggert, Lehrbuch d. physikal. Chemie. <sup>4)</sup> A. Albert und R. Goldaere, Nature (London) **149**, 245 (1942). <sup>5)</sup> K. Winkelblech, Z. physikal. Ch. **36**, 548 (1901). <sup>6)</sup> N. Bjerrum, Z. physikal. Ch. **104**, 152 (1923). <sup>7)</sup> Der Wert wurde erhalten durch elektrometrische Titration in wässriger Lösung bei 20° C. Er stellt die thermodynamische Dissoziationskonstante der  $-\text{NH}_2$  dar. — Sulfathiazol als Säure hat eine Aciditätskonstante von  $K_{ac} = 10^{-7,4}$ .



Beim  $p_H$ -Wert der Versuchslösung liegt das Anion der Sulfanilsäure

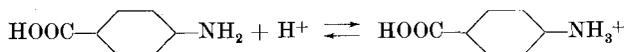


vor, dessen Aminogruppe bei  $p_H = p_{K_s}$  zum Salz verwandelt, d. h. zum



wird. Man beachte, dass wir hier direkt die Aciditätskonstante der Sulfanilsäure benötigen und nicht den reziproken Wert ihrer Basizitätskonstante.

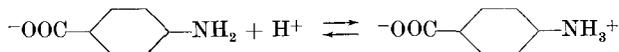
Die Basizitätskonstante der p-Aminobenzoesäure ist von *A. Albert* und *R. Goldacre*<sup>1)</sup> zu  $K_b = 10^{-11,5}$  angegeben worden (nach *J. N. Pring*<sup>2)</sup> beträgt  $K_b = 10^{-11,8}$ ). Bei diesen Messungen handelt es sich aber um das Gleichgewicht



bzw.

$$K_b = \frac{(\text{HOOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_3^+) \cdot (\text{OH}^-)}{(\text{HOOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2)}$$

Da ich bei  $p_H = 7,5$  gearbeitet habe, interessiert mich aber das Gleichgewicht



bzw.

$$K_b = \frac{(^-\text{OOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_3^+) \cdot (\text{OH}^-)}{(^-\text{OOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2)} = ?$$

Dieser Wert kann jedoch nicht direkt gemessen, sondern nur indirekt mit Hilfe eines Analogieschlusses erhalten werden. Die Aminogruppe im Anion



wird stärker basisch sein als diejenige der Aminobenzoesäure selbst wegen der negativen Ladung, die auf der Carboxylgruppe sitzt. Den Einfluss einer solchen Ladung kann man aus dem Verhalten folgender Substanzpaare einigermaßen abschätzen:

<sup>1)</sup> *A. Albert* und *R. Goldacre*, *Nature* (London) **149**, 245 (1942).

<sup>2)</sup> *J. N. Pring*, *Faraday* **19**, 705 (1923).

Tabelle 7.

		Differenz in p <sub>K</sub> - Einheiten
Sulfanilamid <chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)N)cc1</chem> K <sub>b</sub> = 10 <sup>-11,8 1)</sup>	Sulfanilsäure <chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)[O-])cc1</chem> K <sub>b</sub> = 10 <sup>-13,6 2)</sup>	1,2
Terephtalsäure		
1. Stufe <chem>OC(=O)c1ccc(cc1)C(=O)O</chem> in Wasser: K <sub>I</sub> = 10 <sup>-3,5 3)</sup> in 50-proz. CH <sub>3</sub> OH: K <sub>I</sub> = 10 <sup>-4,4 4)</sup>	2. Stufe <chem>[O-]C(=O)c1ccc(cc1)C(=O)O</chem> K <sub>II</sub> = 10 <sup>-4,8 4)</sup> K <sub>II</sub> = 10 <sup>-6,1 4)</sup>	1,3 1,7
p-Di-thiophenol		
1. Stufe <chem>Sc1ccc(cc1)S</chem> in 60-proz. C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH: K <sub>I</sub> = 10 <sup>-7,5 5)</sup>	2. Stufe <chem>[S-]c1ccc(cc1)S</chem> K <sub>II</sub> = 10 <sup>-10,2 5)</sup>	2,7

Es ist beizufügen, dass bei einem solchen Paar die Differenz der beiden p<sub>K</sub> grösser ausfallen muss, sofern in Alkohol anstatt in Wasser gemessen wird, infolge der grösseren Dielektrizitätskonstante des Wassers. Auf Grund obiger Beispiele wird der Einfluss einer negativen Ladung in para-Stellung in wässriger Lösung auf ca. 1,5 p<sub>K</sub>-Einheiten angenommen. Somit wird für die p-Aminobenzoesäure an Stelle des gemessenen

$$K_b \left( \text{von } \text{HOOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2 \right) = 10^{-11,5}$$

das umgerechnete

$$K_b \left( \text{von } ^-\text{OOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2 \right) = \text{ca. } 10^{-10}$$

geschrieben.

Es wurde bis jetzt nur die Dissoziationskonstante als entscheidend für die Acetylierung angesehen und die Reaktionsgeschwindigkeit ausser acht gelassen. Es scheint, dass letztere entweder für alle untersuchten Substanzen konstant sei oder aber sich im gleichen Sinne ändert wie die Dissoziationskonstante. Dies wäre dann eine Bestätigung der Hammett'schen Regel<sup>6)</sup>, welche aussagt, dass bei chemischen Reaktionen, die eine Reihe von Stoffen mit verschiedenen Dissoziationskonstanten K eingehen, sich auch die Reaktionsgeschwindigkeiten im gleichen Sinne wie K ändern.

<sup>1)</sup> A. Albert und R. Goldacre, Nature (London) **149**, 245 (1942).

<sup>2)</sup> N. Bjerrum, Z. physikal. Ch. **104**, 152 (1923).

<sup>3)</sup> R. Wegscheider, M. **23**, 287 (1902).

<sup>4)</sup> R. Kuhn und A. Wassermann, Helv. **11**, 44 (1928).

<sup>5)</sup> G. Schwarzenbach, Helv. **15**, 1468 (1932).

<sup>6)</sup> L. P. Hammett, Am. Soc. **59**, 96 (1937).

Wenn gefragt wird, ob nun auch beim lebenden Organismus die Beziehung bestehe zwischen der Basizität einer Aminogruppe und dem Grad ihrer Acetylierung, so findet man, dass diese Gesetzmässigkeit für die drei Verbindungen p-Aminobenzoesäure, Sulfanilsäure und Sulfathiazol gültig ist (siehe Tab. 1—3). Dagegen macht das Anilinhydrochlorid eine Ausnahme, indem es weniger acetyliert wird, als man nach den in vitro-Versuchen und aus der Dissoziationskonstante erwarten könnte. Es bleibt zu prüfen, ob dies nur eine Folge der raschen Ausscheidung ist, oder ob andere Eigenschaften der Verbindung dafür verantwortlich zu machen sind. Ich weise noch darauf hin, dass das Anilin als die giftigste der vier Substanzen gilt. Offenbar ist die Toxizität allein nicht massgebend für den Grad der erfolgenden Kupplung.

Ein besonderes Verhalten zeigen Sulfathiazol und Sulfanilsäure, deren Acetylierung nicht über einen gewissen Grad hinausgeht und nie den Wert von 100 % erreicht. Man darf wohl annehmen, dass die Acetylierungen im Organismus unter der Mitwirkung von Fermenten ablaufen. Das Verhalten der beiden Verbindungen könnte darauf hinweisen, dass sich wie bei vielen fermentativen Prozessen ein Gleichgewicht zwischen Ausgangsstoff und Reaktionsprodukt einstellt. Das gleiche Ferment würde auch die Spaltung des Reaktionsproduktes bewirken. Der Acetylierungsgrad der Amine würde dann nicht allein von ihrem Reaktionsvermögen, sondern auch von der Lage dieses Gleichgewichts abhängen.

#### Zusammenfassung.

Von einer Reihe primärer aromatischer Amine wurde der Acetylierungsgrad einerseits beim Menschen und beim Meerschweinchen, andererseits in vitro unter Verwendung von Essigsäure-anhydrid bestimmt. Für drei von den vier untersuchten Verbindungen, für p-Aminobenzoesäure, Sulfathiazol und Sulfanilsäure gilt folgende Gesetzmässigkeit: Einer Substanz mit grösserer Basizitätskonstante entspricht eine stärkere Acetylierung in vivo und in vitro. Anilin macht im Tierversuch eine Ausnahme, indem es relativ wenig acetyliert wird.

Die geprüften Stoffe unterscheiden sich im Tierversuch nicht nur hinsichtlich der Menge an erhaltenem Acetylderivat, sondern auch hinsichtlich des erreichten Endpunktes. Für p-Aminobenzoesäure ist letzterer dadurch charakterisiert, dass schliesslich die Verbindung vollständig in gekuppelter Form ausgeschieden wird. Für Sulfathiazol und Sulfanilsäure wird dagegen der Grenzwert von 100 % nicht erreicht.

Der *Gesellschaft für Chemische Industrie* in Basel danke ich für die Überlassung des Sulfathiazols.

Zürich, Dermatologische Universitätsklinik,  
Direktor Prof. Dr. G. Miescher.