

Gruppenreaktion zur Erfassung von *p*-Nitrophenolen, *p*-Aminophenolen und *p*-Phenylendiaminen im Harn

VON M. GELDMACHER-V. MALLINCKRODT UND A. HERRMANN

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität Erlangen-Nürnberg

(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Weinig)

(Eingegangen am 11. September 1968)

Die von v. EICKEN angegebene Reaktion zur Erfassung einer *p*-Nitrophenolausscheidung im Harn (Hydrolyse mit Salzsäure; Extraktion des Nitrophenols zunächst in ein Lösungsmittelgemisch, dann in 2N Ammoniak; Indophenolblaureaktion) kann bei zusätzlicher spektrophotometrischer Untersuchung der Ammoniakphase und des Indophenolblaufarbstoffes als Gruppenreaktion zur Erfassung von *p*-Nitrophenolen, *p*-Aminophenolen und *p*-Phenylendiaminen im Harn dienen, wobei gleichzeitig eine erste weitere Differenzierung möglich ist. Die nachweisbaren Verbindungen werden als Stoffwechselprodukte von Medikamenten, Schädlingsbekämpfungsmitteln und Industrieprodukten im Harn ausgeschieden.

A group reaction for the determination of p-nitrophenols, p-aminophenols and p-phenylendiamines in urine

The reaction reported by v. EICKEN for the determination of urinary *p*-nitrophenol (hydrolysis with hydrochloric acid; extraction of the nitrophenol with a solvent mixture, followed by re-extraction into 2N ammonia; indophenol blue reaction) can be employed as a group reaction for the determination of urinary *p*-nitrophenols, *p*-aminophenols and *p*-phenylendiamines by an additional spectrophotometric study of the ammonia phase and the indophenol blue pigment, which permits a further differentiation of the contributing compounds. The compounds concerned are excreted in the urine as metabolites of drugs, pesticides and industrial products.

Nach Aufnahme von E 605 (O,O-Diäthyl-O-(*p*-nitrophenyl)-thionophosphat) wird häufig *p*-Nitrophenol in konjugierter Form (Glucuronsäure, Schwefelsäure, Essigsäure) im menschlichen Harn ausgeschieden (1—3). v. EICKEN (1) hat ein Verfahren zu dessen Nachweis angegeben. Dieses beruht auf Hydrolyse der Konjugate durch Erhitzen mit Salzsäure, zwei Extraktionsschritten, Reduktion des freigesetzten *p*-Nitrophenol in 2N NH₄OH mit Titantrichlorid und Reaktion des entstandenen *p*-Aminophenol mit *o*-Kresol zu der Leukobase eines Indophenolfarbstoffes, die sich an der Luft zu den beiden tautomeren Formen eines blauen Indophenolfarbstoffes oxydiert.

Methodik

1 ml/ Urin wird nach Verdünnen mit Wasser auf 10 ml mit 2 ml konz. Salzsäure in einem geschlossenen Gefäß eine Std. im Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 25 ml eines Lösungsmittelgemisches (1proz. Lösung von Isoamylalkohol in einer Mischung von 4 Vol. Petroläther und 1 Vol. Äther) zugesetzt, und 10 Min. extrahiert. Nach kurzem Zentrifugieren pipettiert man 20 ml/ der Lösungsmittelschicht ab und schüttelt sie in einem 100 ml-Scheidetrichter mit 4 ml/ 2N NH₄OH 2 Min. lang aus. Nach 15 Min. läßt man die wäßr. Schicht in ein Reagenzglas ab und setzt 0,5 ml/ einer wäßr. gesätt. Lösung von *o*-Kresol und 0,5 ml/ einer frisch bereiteten Titantrichloridlösung (3 ml/ einer 15proz. TiCl₃-Lösung werden mit Wasser zu 50 ml/ verdünnt) zu und schüttelt eine Min. kräftig bis zur Entfärbung der Lösung. Nach Abzentrifugieren des Titanhydroxyds wird die Extinktion der bei Anwesenheit von mindestens 2,5 µg *p*-Nitrophenol blau gefärbten Lösung bei 620 nm in einer 1 cm-Küvette nach genau 30 Min. gemessen. Die quantitative Auswertung erfolgt an Hand einer Eichkurve.

Zur Beurteilung der Spezifität dieses Nachweisverfahrens mußte geklärt werden, ob der Nachweis von

p-Nitrophenol im Harn beweisend ist für eine E 605-Aufnahme, oder ob auch nach Aufnahme anderer Verbindungen *p*-Nitrophenol im Harn ausgeschieden wird. Außerdem war zu prüfen, ob auch andere Verbindungen außer *p*-Nitrophenol unter den Bedingungen der Reaktion eine positive Indophenolblaureaktion ergeben. Dabei zeigte es sich, daß die Reaktion nach v. EICKEN keineswegs spezifisch ist, dafür aber als Suchtest auf die Ausscheidung vieler *p*-Nitrophenole, *p*-Aminophenole und *p*-Phenylendiamine geeignet erscheint, der sogar eine erste Differenzierung erlaubt, wenn man zwei spektrophotometrische Messungen hinzunimmt. Hierbei können außer dem E 605-Metaboliten folgende Verbindungen erfaßt werden:

1. *p*-Nitrophenol im Harn aus anderen Verbindungen als E 605

Eine *p*-Nitrophenolausscheidung im Harn ist außer nach E 605-Aufnahme auch nach Aufnahme der folgenden Verbindungen bekannt bzw. zu erwarten:

E 600 (O,O-Diäthyl-O-(*p*-nitrophenyl)-phosphat, Paraxon, Mintacol)

Methyl-Parathion (O,O-Dimethyl-O-(*p*-nitrophenyl)-thionophosphat)

EPN (O-Äthyl-O-(*p*-nitrophenyl)-thionophosphat) (4)
Nitrobenzol (5)

2. Andere Verbindungen außer *p*-Nitrophenol mit positiver Indophenolblaureaktion

Als Indophenole bezeichnet man Aminoderivate des Phenylchinonmonimins. Die nahe verwandten Indamine sind die entsprechenden Derivate des Phenylchinondiimins. Leukobasen der Indophenole bilden sich u. a. bei Reaktion eines Phenols mit einem aromatischen *p*-Diaminderivat, das mindestens eine pri-

märe Aminogruppe enthält, oder auch eines *p*-Aminophenols mit einem aromatischen Amin. Die Leukobasen der Indamine entstehen analog z. B. bei Reaktion eines aromatischen *p*-Diamins, das mindestens eine freie NH-Gruppe enthält, mit einem aromatischen Monamin (6). Die blauen Farbstoffe entstehen aus den Leukobasen durch Oxydation, wobei meist Luftsauerstoff ausreicht (7).

Entscheidend für die Bildung des blauen Farbstoffes ist die *p*-Substitution: *o*-Aminophenol liefert z. B. ein grünes, *m*-Phenylendiamin ein gelbes Reaktionsprodukt (8). PILZ (9) erhielt unter den von v. EICKEN angegebenen sehr ähnlichen Bedingungen kein Indophenolblau mit *o*- und *m*-Nitrophenol. Hydrochinon und verwandte Verbindungen reagieren gleichfalls nicht (8).

Nach LORENTZ (7) bildet sich kein blauer Indophenolfarbstoff mit aromatischen Aminen ohne OH-Substitution in *p*-Stellung (Anilin: gelbrot; 1-Naphthylamin, 2-Naphthylamin: farblos; Benzidin: rötlich). Entsprechende Ergebnisse hatte PILZ (9) mit 4-Chlorphenol und 2,4,5-Trichlorphenol.

Phenylhydrazin, Dinitrophenylhydrazin und Semicarbazid bilden Azofarbstoffe (7).

Für eine ganze Reihe anderer Verbindungen ist jedoch eine positive Indophenolblaureaktion unter den Bedingungen der v. EICKENSCHEN Reaktion zu erwarten:

a) *p*-Aminophenole, *p*-Phenylendiamine

Aromatische Amine werden nach WILLIAMS (5) *in vivo* weder desaminiert noch durch Aminoxydasen angegriffen. Die Veränderungen im Stoffwechsel bestehen einmal in einer Hydroxylierung des aromatischen Rings, dabei mindestens zum Teil in *p*-Stellung zur Aminogruppe. Aminophenole werden meist an der Aminogruppe acetyliert und an der Hydroxylgruppe konjugiert ausgeschieden. Bei der Hydrolyse nach v. EICKEN können daraus freie Aminophenole entstehen.

Derivate aromatischer Amine besitzen als Farbstoffe und Medikamente Bedeutung, und können auch als Metaboliten aromatischer Nitroverbindungen auftreten (5).

Auf die Störungsmöglichkeit des *p*-Nitrophenolnachweises durch Aminophenole, z. B. nach Aufnahme von Phenacetin oder Acetanilid oder als Anilinmetabolit, haben schon KAISER und HAAG (10) hingewiesen. Zu deren Erkennung empfehlen ELLIOT, WALKER, PENICK und DURHAM (11), darauf zu achten, ob schon bei Zugabe von *o*-Kresol allein vor dem Zusatz von Titantrichlorid eine Blaufärbung eintritt. Diese kann nicht von *p*-Nitrophenol herrühren, und deutet auf die Anwesenheit von Aminophenolen hin.

Gedacht werden muß dann auch an die Anwesenheit von *p*-Phenylendiamin, das als Diacetylderivat u. a. als Metabolit von *p*-Dimethylaminoazobenzol im Urin ausgeschieden werden kann (5).

Zur Unterscheidung von *p*-Nitrophenol kann nach unseren Erfahrungen neben der sofortigen Blaufärbung mit *o*-Kresol vor der Reduktion mit $TiCl_3$ auch die Beobachtung der Farbe der ammoniakalischen Lösung dienen. Bei alleiniger Anwesenheit von Aminophenolen oder *p*-Phenylendiaminen ist diese farblos, während *p*-Nitrophenol mit etwa gleicher Nachweisgrenze wie über die Indophenolblaureaktion an einer Gelbfärbung zu erkennen ist.

b) Mononitrophenole

Mononitrophenole können beim Warmblüter nach Aufnahme unverändert bzw. in *O*-konjugierter Form ausgeschieden werden, oder durch Hydroxylierung aromatischer Nitroverbindungen *in vivo* entstehen. Beide Verbindungsklassen haben große praktische Bedeutung als Pestizide, Farb- und Sprengstoffe, zum Teil auch als Medikamente.

Alle Nitrophenolate sind gelb gefärbt, von vielen *p*-Nitroderivaten ist eine positive Indophenolblaureaktion unter den Bedingungen nach v. EICKEN zu erwarten. Wir konnten dies bei Einsatz von etwa 10 μg der folgenden Verbindungen in 1 ml sehr verdünnter NH_4OH , an Stelle von 1 ml Urin bestätigen:

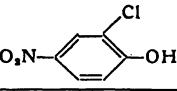
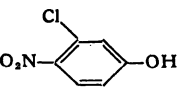
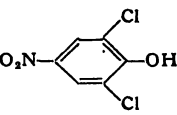
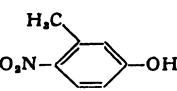
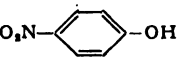
- 2-Chlor-4-nitrophenol
- 3-Chlor-4-nitrophenol
- 2,6-Dichlor-4-nitrophenol
- 3-Methyl-4-nitrophenol

2-Chlor-4-nitrophenol ist als Fungizid unter dem Namen „Nitrofungi“ im Handel (12). Es wird außerdem als Stoffwechselprodukt von *m*-Chlornitrobenzol (5) und Dicaphton (Isochlorthion; *O,O*-Dimethyl-*O*-(2-chlor-4-nitrophenyl)-thionophosphat) (4) ausgeschieden. 3-Chlor-4-nitrophenol ist als Stoffwechselprodukt von Chlorthion (*O,O*-Dimethyl-*O*-(3-chlor-4-nitrophenyl)-thionophosphat) und *o*-Chlornitrobenzol im Harn zu erwarten (5), 3-Methyl-4-nitrophenol nach Aufnahme von Folithion (*O,O*-Dimethyl-*O*-(3-methyl-4-nitrophenyl)-thionophosphat im Harn nachgewiesen worden (5a).

2,6-Dichlor-4-nitrophenol wurde bei Kaninchen nach Gabe von 2,6-Dichlornitrobenzol im Harn gefunden (5).

Um eine Unterscheidung untereinander und gegen *p*-Nitrophenol zu erreichen, nahmen wir die Absorptionskurven im sichtbaren Bereich von 700–350 nm sowohl für die gelb gefärbte Ammoniakphase als auch für die Lösung des Indophenolblaufarbstoffes auf. Hierbei ergaben sich die folgenden Maxima (Tab. 1).

Tab. 1
Absorptionsmaxima verschiedener 4-Nitrophenolate bzw. deren Indophenolblaufarbstoffe

Nitrophenole	λ max Phenolat (nm)	λ max Indophenolblaufarbstoff (nm)
 2-Chlor-4-nitrophenol	395	600
 3-Chlor-4-nitrophenol	390	600
 2,6-Dichlor-4-nitrophenol	400	583
 3-Methyl-4-nitrophenol	394	636
 4-Nitrophenol (<i>p</i> -Nitrophenol)	400	610

In beiden Versuchsreihen ist ein Einfluß der Substituenten festzustellen. Für die Indophenolfarbstoffe wurde dies schon von SVOBODA, DARAZIL und KÖRBL (13) sehr sorgfältig untersucht. Die aufgeführten Unterschiede in den Maxima der Phenolate (mit Ausnahme der beiden isomeren Chlornitrophenole) dürften zusammen mit den Maxima der jeweiligen Indophenolfarbstoffe ausreichen, um die *p*-Nitrophenole gegeneinander abzugrenzen und einen ersten Anhaltspunkt für die Identifizierung zu geben.

3. *p*-Nitrophenole mit fehlender Indophenolblaureaktion

Während *p*-Aminophenole und *p*-Phenylendiamine an der farblosen Ammoniakphase bei positiver Indophenolblaureaktion zu erkennen sind, zeigte ein Teil der untersuchten *p*-Nitrophenole das umgekehrte Verhalten: die Ammoniakphase war zwar gelb gefärbt, die Indophenolblaureaktion fiel jedoch negativ aus.

Dies hatte schon PILZ (9) unter sehr ähnlichen Bedingungen mit $TiCl_3$ als Reduktionsmittel für 2,4-Dinitrophenol, 2,4,6-Trinitrophenol und 6-Chlor-2,4-dinitrophenol festgestellt. Man muß annehmen, daß hier die Reduktionsbedingungen des Ansatzes nicht ausreichen, um die Nitrogruppe in *p*-Stellung zu der phenolischen Hydroxylgruppe zur Aminogruppe zu reduzieren.

Auch in dieser Gruppe kann die Lage der Absorptionsmaxima der Phenolate Anhaltspunkte für die Identifizierung geben. So stellte schon GASPARIC (14) fest, daß alle 2,4-Dinitrophenolate zwei Absorptionsmaxima im sichtbaren Bereich bei 375–380 und 400–420 nm aufwiesen, und sich damit von den Mononitrophenolaten mit einem einzigen Absorptionsmaximum bei etwa 408 nm unterscheiden.

Wir untersuchten die folgenden Verbindungen unter den Bedingungen der v. EICKEN-Reaktion (Konzentration 5 $\mu g/ml$):

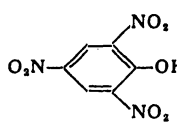
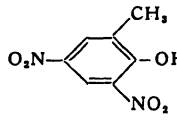
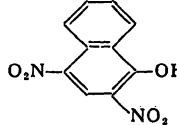
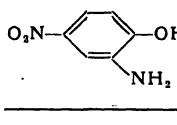
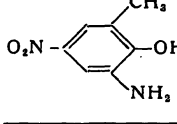
- 2,4,6-Trinitrophenol (Pikrinsäure)
- 2,4-Dinitro-*o*-kresol
- 2,4-Dinitro-1-naphthol (Martiusgelb)
- 2-Amino-4-nitrophenol
- 4-Nitro-6-amino-*o*-kresol

Trinitrophenol (Pikrinsäure) ist ein wichtiger Sprengstoff. Über seinen Stoffwechsel beim Warmblüter ist wenig bekannt, doch soll es teils unverändert, teils als 2-Amino-4,6-dinitrophenol im Urin ausgeschieden werden (5). Dinitro-*o*-kresol fand früher zum Bekämpfen der Fettsucht Verwendung, heute dient es der Schädlingsbekämpfung. Es wird wahrscheinlich auch beim Menschen zum Teil unverändert im Harn ausgeschieden, zum Teil u. a. als 6-Acetamido-4-nitro-*o*-kresol (15), das bei der sauren Hydrolyse die Acetylgruppe verlieren würde. 2-Amino-4-nitrophenol ist ein Metabolit des 2,4-Dinitrophenols (Mittel gegen Fettsucht und Syphilis) und *m*-Dinitrobenzols. Der Farbstoff Martiusgelb soll mindestens teilweise unverändert im Urin ausgeschieden werden (5).

Wir hatten die folgenden Ergebnisse (Tab. 2).

In diese Gruppe gehören auch andere, nicht in *p*-Stellung OH-substituierte aromatische Nitroverbindungen.

Tab. 2
Absorptionsmaxima von 4-Nitrophenolaten, die keine Indophenolblaufarbstoffe bilden

Nitrophenole	λ max Phenolat (nm)	Indophenolblaureaktion
 2,4,6-Trinitrophenol (Pikrinsäure)	Schulter (395) 353	fehlt
 2,4-Dinitro- <i>o</i> -kresol	Schulter (410) 370	fehlt
 2,4-Dinitro-1-naphthol (Martiusgelb)	438 392	fehlt
 2-Amino-4-nitrophenol	446	fehlt
 4-Nitro-6-amino- <i>o</i> -kresol	460	fehlt

Aus den Überlegungen und Untersuchungen ergibt sich:

Der Nachweis von *p*-Nitrophenol im Harn ist nicht beweisend für eine E 605-Aufnahme, da z. B. auch nach Aufnahme von E 600, Methylparathion, EPN (vgl. oben) oder Nitrobenzol *p*-Nitrophenol im Harn ausgeschieden werden kann.

Das Vorgehen nach v. EICKEN zum Nachweis von *p*-Nitrophenol im Harn ist nicht spezifisch. Eine positive Indophenolblaureaktion wird unter den Bedingungen der Reaktion auch von anderen *p*-Nitrophenolen wie z. B. 2-Chlor-4-nitrophenol, 3-Chlor-4-nitrophenol, 2,6-Dichlor-4-nitrophenol oder 3-Methyl-4-nitrophenol gegeben, die nach Aufnahme bestimmter Präparate, darunter einige Schädlingsbekämpfungsmittel, gleichfalls im Urin ausgeschieden werden können.

Eine positive Reaktion liefern auch *p*-Aminophenole und *p*-Phenylendiamine. Eine Abgrenzung gegen letztere ist möglich

1. durch die positive Reaktion der zuletzt genannten Verbindungen mit *o*-Kresol schon ohne Zugabe des Reduktionsmittels

2. durch Beachtung der Farbe der Ammoniakphase, die in Gegenwart von Nitrophenolen gelb gefärbt, bei alleiniger Anwesenheit von Aminophenolen oder *p*-Phenylendiaminen dagegen farblos ist.

Eine erste Unterscheidung der einzelnen *p*-Nitrophenole mit positiver Indophenolblaureaktion erscheint möglich durch Feststellung der Absorptionsmaxima der Am-

moniumphenolate sowie der entsprechenden Indophenolblaufarbstoffe. Eine weitere Gruppe von *p*-Nitrophenolen bewirkt zwar eine Gelbfärbung der Ammoniakphase, ergibt jedoch unter den Bedingungen der Reaktion keine positive Indophenolblaureaktion, so daß hier eine Verwechslung mit *p*-Nitrophenol nicht erfolgt.

Die Nachweisgrenze für die genannten Verbindungen liegt bei Einsatz von 1 ml Urin etwa bei 2,5–10 µg/ml. Sehr viel geringere Konzentrationen sind wahrscheinlich zu erfassen, wenn man das sehr ähnlich arbeitende Verfahren von ELLIOT und Mitarbeitern (11) anwendet,

die von 50–100 ml Harn ausgehen. Hier müßte allerdings im Einzelfall z. T. die Überführung der Verbindungen in das als Lösungsmittel verwendete Acetonitril gesichert werden.

Damit ist die Reaktion nach v. EICKEN in abgewandelter Form eine gute und empfindliche Gruppenreaktion auf *p*-Nitrophenole, *p*-Aminophenole und *p*-Phenylendiamine im Harn. In vielen Fällen wird sie auch als Schnellreaktion durchführbar sein (16).

Die Arbeit wurde mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, wofür wir auch an dieser Stelle unseren besten Dank aussprechen.

Literatur

1. v. EICKEN, S., *Angew. Chem., Ausg. A.* 66, 551 (1954). —
2. MOUNTAIN, J. T., H. ZLOTOW und D. G. HARVEY, *Indian Health Monthly* 11, 88 (1950). —
3. ERDMANN, W. D. und L. LENDLE, *Erg. inn. Med.* 10, 104 (1958). —
4. SCHRADER, G., *Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäureester*. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1963). —
5. WILLIAMS, R. T., *Detoxication Mechanisms*, Chapman & Hall, London (1959). —
- 5a. MELICHAR, B. und J. FRANZ, *Pracovní lék. Praha* 18, 112 (1966). —
6. KARRER, P., *Lehrbuch der Organischen Chemie*, Thieme Stuttgart (1963). —
7. LORENTZ, K., *diese Z.* 5, 291 (1967). —
8. BOLLETER, W. T., C. J. BUSHMAN und P. W. TIDWELL, *Analyt. Chem.* 33, 592 (1961). —
9. PILZ, W., *Mikrochim. Acta (Wien)* 383 (1958). —
10. KAISER, H. und TH. HAAG, *Arch. Pharmazie* 289/61, 542 (1956). —
11. ELLIOT, J. W., K. G. WALKER, A. E. PENICK und F. DURHAM, *J. agric. Fd. Chem.* 8, 111 (1960). —
12. NEGWER, M., *Organisch-Chemische Arzneimittel und ihre Synonyma*. Akademie-Verlag, Berlin (1967). —
13. SVOBODA, W., L. DORAZIL und J. KÖRBL, *Colln. Czech. chem. Commun. Engl. Edn.* 25, 1037 (1960). —
14. GASPARIC, J., *J. Chromat.* 15, 83 (1964). —
15. SMITH, J. N., R. H. SMITHIES und R. T. WILLIAMS, *Biochem. J.* 54, 225 (1953). —
16. GELDMACHER-V. MALLINCKRODT, M. und K. DEINZER, *diese Z.* 4, 81 (1966).

Priv.-Doz. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt
852 Erlangen
Universitätsstr. 22