

Wasserstoff der aromatischen Substanz sich vereinigt und beide durch je ein Atom des freien Halogenes ersetzt werden. Diese Wirkung ist stark genug, um den Schutz, den eine Nitrogruppe im Mononitrobenzol dem Wasserstoffe gegen Ersatz durch Halogen gewährt, zu überwinden. Sie reicht aber nicht mehr aus, wenn zwei Nitrogruppen oder auch (wie wir nach dem Versuch mit Nitrobenzoësäure annehmen dürfen) eine Nitro- neben einer Carboxylgruppe ihre schützende Hand über den Wasserstoff breiten.

Hier aber kommt, bei gewissen Stoffen wenigstens, die zweite Art der Erleichterung der Substitution zu Stande, indem bei Gegenwart des Ueberträgers die Nitrogruppen leichter durch Halogen ersetzt werden als durch dieses allein. Nach den Versuchen mit Eisenchlorid und Dinitrobenzol zu schliessen, beruht hier die Erleichterung wahrscheinlich darauf, dass der Sauerstoff der Nitrogruppe an das Eisen geht, der Stickstoff ausgetrieben und durch das Halogen des Ueberträgers oder vielleicht auch durch das freie ersetzt wird. Dieser Vorgang ist aber ohne Zweifel verwickelter als der schon bei verhältnismässig niedriger Temperatur vor sich gehende Ersatz des Wasserstoffes neben einer unversehrt bleibenden Nitrogruppe.

Tübingen, den 25. September 1891.

476. O. Loew: Ueber das Verhalten des Azoimids zu lebenden Organismen.

(Eingegangen am 1. Oktober; mitgetheilt von Herrn H. Pinner.)

Die von Th. Curtius im vergangenen Jahre entdeckte und durch dessen mühe- und gefahrvolle Arbeiten genauer bekannt gewordene

Stickstoffwasserstoffsäure, oder das Azoimid $\text{N} \begin{array}{c} \parallel \\ \text{H} \end{array} \text{NH}$ ist nicht nur von

hoher chemischer Bedeutung, sondern erweckt auch das physiologische Interesse. Können die Salze dieser merkwürdigen Säure ähnlich wie Nitrate oder Nitrite als Stickstoffquelle für die Ernährung resp. Eiweissbildung von Pflanzenzellen benutzt werden? Wenn nicht, sind jene Salze indifferent oder Gifte? Wenn sie aber als giftig sich erweisen — wo ist der Grund hierfür zu suchen?

Da ich durch die grosse Güte des Herrn Professor Curtius, dem ich hiermit zugleich meinen herzlichsten Dank ausdrücken möchte, im Besitz von etwas Natriumazoimid gelangte, beschloss ich, die angedeuteten Fragen in Angriff zu nehmen.

1. Versuche an Phanerogamen.

Es wurde eine Nährlösung hergestellt mit je 0.2 per mille Magnesiumsulfat und Monokaliumphosphat, je 0.1 per mille Chlorkalium und Chlorealcium und einer Spur Eisenvitriol. Dieser wurde 0.2 per mille Natriumazoimid zugesetzt, zu einer zweiten Portion aber statt dessen ebensoviel Ammoniumsulfat. In beide Lösungen wurden je 3 Gerstenkeimlinge von 3—3.5 cm Sprosslänge eingesetzt. Schon der folgende Tag liess einen grossen Unterschied erkennen, die Ammoniakpflanzen waren erheblich gewachsen und maassen am dritten Tage bereits 10; 10.3 und 10.7 cm; die Azoimidpflanzen aber zeigten so gut wie kein Wachsthum mehr, ihre Länge betrug 3.1, 3.6, 3.9 cm. Auch in der Wurzellänge ergab sich ein analoger auffallender Unterschied. Am vierten Tage erschienen gelbe Flecken auf den Blättern der Azoimidpflanzen und am fünften Tage nach Beginn des Versuchs waren die Azoimidpflanzen welk geworden und in allen Theilen abgestorben. Die Ammoniakpflanzen aber entwickelten sich in normaler Weise weiter. Selbst 3 Keimlinge, welche ich vergleichsweise in blossem Quellwasser ohne Zusatz von Nährsalzen hatte verweilen lassen, waren noch einige Zeit gesund geblieben und gewachsen. Das Natriumazoimid hatte somit unzweifelhaft eine Giftwirkung ausgeübt. — Auch bei Lupinenkeimlingen konnte bald eine Giftwirkung beobachtet werden, indem das Wurzelwachsthum schon nach einem Tag sistirt war.

Blätter von *Valisneria spiralis* waren nach 3 Tagen Aufenthalt in obiger Azoimidsalzlösung bräunlich geworden, hatten den Turgor verloren, liessen keine Plasmaströmungen mehr erkennen, die Zellen waren todt. In der Kontrol-Lösung, welche den Stickstoff als Ammoniumsulfat enthielt, blieben die Blätter lebend und alle Zellen zeigten lebhafte Plasmaströmungen. Blätter des Haselnussstrauches bekamen in jener Azoimidsalzlösung nach 3 Tagen braune Flecken von abgestorbenen Zellpartien.

2. Versuche an Algen.

Eine Anzahl Fäden von *Spirogyra*, *Zygnuma*, *Mesocarpus*, *Oscillaria*, ferner Zellen von Desmidaceen (*Closterium*, *Cosmarium*) und verschiedenen Diatomeen (*Navicula*, *Gomphonema*, *Otontidium*) wurden in eine Lösung von 1 per mille Natriumazoimid in Quellwasser gebracht. Nach 18 Stunden liess sich bei 800 facher Vergrösserung noch nicht die geringste schädliche Wirkung erkennen; erst am dritten Tage begann ein langsam fortschreitendes Absterben. Selbst nach 10 Tagen aber konnten bei jenen Fadenalgen noch lebende Zellen beobachtet werden, wenn sie auch eine schwache, eben beginnende Granulation im Cytoplasma erkennen liessen. Die abgestorbenen Zellen der Spirogyren zeigten eine starke Granulation und zwar

von dem Habitus, wie sie bei Einfluss von Ammoniaksalzen bei 1 per mille Verdünnung bei Spirogyren noch zu beobachten ist.

Bei den Diatomeen und Oscillarien waren die Bewegungserscheinungen erst am fünften Tage gänzlich erloschen; um diese Zeit liess sich auch bei den Desmidiaceen das Absterben des Protoplasmas constatiren.

Wurde nun jene Lösung auf das 10fache verdünnt angewendet und mineralische Nährsalze zugesetzt (je 0.1 per mille), so blieben die genannten Algen selbst nach 3 Wochen noch am Leben und gesund. Vaucheriafäden zeigten darin sogar ein deutliches Wachsthum.

Wie weit verschieden davon ist das Verhalten derselben Algen gegen jene beiden Specifica für Aldehyde: Hydroxylamin und Diamid! Sie werden durch diese beiden Stoffe bei der gleichen Verdünnung von 0.1 per mille längstens binnen 48 Stunden selbst bei vollkommen neutraler Lösung getötet¹⁾.

3. Versuche mit Bacterien.

Eine Nährlösung von folgender Zusammensetzung:

1 pCt.	Kaliumnatriumtartrat,
0.1 »	Dikaliumphosphat,
0.05 »	Magnesiumsulfat,
0.05 »	Chlorecalcium,

wurde einmal mit 0.1 pCt. Natriumazoid, eine zweite Portion mit 0.1 pCt. Diammoniumphosphat und eine dritte Portion mit diesen beiden Stickstoffverbindungen zugleich versetzt. Inficirt wurden diese 3 Lösungen mit Bacterien, welche in einer Methylalkohol-Nährlösung beim Stehen an der Luft gewachsen waren. Nach 48 Stunden bereits zeigte die zweite Portion starke Bacterienträbung, das Mikroskop liess eine Unmasse von Stäbchen erkennen, welche nun rasch die Gährung und Verbrennung der Weinsäure in der Nährlösung herbeiführten. Die anderen beiden Portionen blieben selbst nach 6 Wochen langem Stehen trotz mehrmals wiederholter Infection vollkommen klar und entwickelten keine Spur von Bacterien. Selbst als nun diese Lösungen auf das Fünffache verdünnt und frisch inficirt wurden, traten keine lebenden Bacterien auf. Nun wurden sie noch auf das doppelte verdünnt (so dass sie also nur noch 0.1 per mille Natriumazoid enthielten) und noch 0.5 pCt. Glucose zugesetzt, frisch inficirt und in offnem Kolben an der Luft stehen gelassen. Nach 14 Tagen war zwar keine Bacterienträbung eingetreten, aber doch waren einzelne lebende Bacterien vorhanden, ferner enthielt derjenige Kolben, welcher neben dem Natriumazoid noch Ammoniak enthielt ein dünnes Häutchen von Sprosspilzen (wahrscheinlich Saccharomyces ellipsoideus).

¹⁾ Vergl. O. Loew, Pflüg. Arch. 35, 519 und diese Berichte XXIII, 3204.

Als 1 g geschabtes Fleisch in einem Kölbechen mit 20 ccm einer 0.1 proc. Lösung von Natriumazomimid übergossen wurde, blieb es unverändert und faulte nicht, trotz Infection mit Fäulnisspilzen. In dem Kontrollkölbchen war nach 24 Stunden stinkende Fäulniss, bewirkt durch eine Unzahl lebhaft sich bewegender Bacterien, eingetreten.

4. Versuche mit Schimmelpilzen.

50 ccm Nährlösung von gleicher Zusammensetzung wie oben bei dem Bacterienversuch erhielten ausser 1 per mille Natriumazomimid noch einen Zusatz von 2 per mille Monokalumphosphat und wurden mit Sporen von Penicillium und Aspergillus infizirt, allein selbst nach Wochen entwickelte sich keine Spur von Schimmelmycel, auch da nicht, wo neben dem Natriumazomimid noch Diammoniumphosphat vorhanden war.

Eine andere Nährlösung, welche statt eines weinsauren Salzes Glucose (5 per mille) enthielt und mit 0.5 per mille Natriumazomimid versetzt war, entwickelte selbst nach vielen Wochen trotz Infection und Stehen an offner Luft keine Spur von Schimmelfäden, während die Controllösung mit Stickstoff in Form von 0.5 per mille Salmiak schon nach 3 Tagen eine dünne Schimmeldecke nebst einer Bacterienträubung entwickelte und nach 8 Tagen einen stattlichen Schimmelrasen enthielt.

5. Versuch mit Sprosspilzen.

Eine erbsengrosse Masse Presshefe wurde mit 10 ccm Wasser durchgeschüttelt und die eine Hälfte mit Zusatz von 5 per mille Natriumazomimid, die andere ohne diesen Zusatz 2 Tage stehen gelassen. Letztere Portion war dann bereits übelriechend geworden und enthielt zahlreiche Bacillen in der überstehenden Flüssigkeit; erstere war geruchlos und ohne Bacillen. Die zu Boden sitzende Hefe wurde nun in einer engen Röhre mit ca. 5 ccm Glucoselösung in Berührung gebracht, worauf nach 25—30 Minuten in beiden Fällen Gährung zu beobachten war, allerdings weniger lebhaft bei der mit Natriumazomimid behandelten Hefe.

Sprosspilze sind also resistenter wie Spalt- und Schimmelpilze — was auch in vielen andern Fällen schon beobachtet wurde. Ob das Gift hier schwieriger eindringt oder im Protoplasma selbst Schutzvorrichtungen vorhanden sind, muss einstweilen noch unentschieden bleiben.

6. Versuche an Infusorien.

Wird ein Tropfen einer 1 proc. Lösung von Natriumazomimid¹⁾ mit Infusorien unter dem Mikroskope in Berührung gebracht, so ge-

¹⁾ Das Natriumazomimid hat eine schwach alkalische Reaction.

wahrt man plötzliches Aufhören sämmtlicher Lebensregungen. Eine 0.1 proc. Lösung in Quellwasser bringt erst nach 2—2½ Stunden die Bewegungen zum Stillstand; bei den Vorticellen treten zuerst partielle Lähmungen auf, wobei der Stiel und die Wimpern erstarren; bei Styloynchia werden die Laufbewegungen vorübergehend sehr heftig, ehe sie ganz aufhören; andere Infusorien ballen sich bald zu regungslosen Kugeln und Euglenen krümmen sich einige Zeit hin und her, ehe das Leben entflieht. Befinden sich zufällig Cyclopsarten (zu den Crustaceen gehörend) unter den Infusorien, so kann man ein sehr rasches Erlahmen ihrer so lebhaften Bewegungen beobachten, bis unter wiederholtem Oeffnen und Schliessen ihrer Schwanzgabel das Leben gänzlich erlischt¹⁾.

Verdünnnt man die Lösung aber auf das 10fache, so kann man selbst nach 12 Tagen noch lebende Vorticellen und Amoeben beobachten.

7. Versuche an niederen Wasserthieren.

In einer 0.5 per mille Lösung des Natriumazoiroids in Quellwasser sterben nach 30—40 Minuten Nematoden, Planarien, Ostracoden, Copepoden, Asseln, kleine Insektenlarven, junge Schnecken (Planorbis, Limnaea). Nach 2½—3 Stunden sterben kleine Wasserkäfer, noch später die Egel.

In einer 0.1 per mille Lösung sterben nach 20—24 Stunden die Crustaceen, wobei dem Tode Lähmungserscheinungen vorausgehen²⁾, Wasserkäfer und Schnecken sterben nach 4 Tagen, Egel und Insektenlarven aber lebten noch nach 6 Tagen.

8. Versuche an Säugethieren.

Hr. Professor Dr. Emmerich vom hiesigen hygienischen Institut war so gütig, einige Versuche an Mäusen anzustellen und berichtete mir Folgendes:

»Ihre Vermuthung betreffs der Wirkung von Natriumazoiid hat sich vollkommen bestätigt. Die subcutane Injection von 1 ccm der 1 proc. Lösung bewirkte bei einer grossen Maus schon nach 10 Sekunden blitzartig auftretende Krämpfe, Emprosthotonus und sofortigen Tod. Aber auch schon 0.1 ccm subcutan einer Maus injicirt, verursachten nach 3 Minuten Zwerchfellkrampf, dann nach 4 Minuten Paralyse der Extremitäten. Nach 2 weiteren Minuten clonische Krämpfe sämmtlicher Muskeln, Emprosthotonus und Tod. Bei so-

¹⁾ Es macht einen überraschenden Eindruck, wenn zwischen diesen Leichen beigemengte Diatomeen sich lebhaft fortbewegen.

²⁾ Man kann z. B. bei einem äusserlich regungslos gewordenen Ostracoden noch deutlich Darmbewegungen nach 12 Stunden Aufenthalt in jener Lösung beobachten.

fortiger Eröffnung der Brusthöhle contrahirten sich die Herzvorhöfe noch einige Male, dann stand das Herz still. Das Blut war sehr dunkel.«

Ein Versuch an einem Kaninchen, welchen Hr. Docent Dr. Pfeiffer vom Hygienischen Institut in München und ich gemeinschaftlich verfolgten, ergab: 8 Minuten nach subcutaner Injection von 0.03 g Natriumazoinid: Muskelzittern, 10 Minuten später vermehrte Speichelsecretion, Lähmungen der vorderen Extremitäten, Verlangsamung des Herzschlags. Nach weiteren 16 Minuten Krämpfe, Lähmungserscheinungen an den hinteren Extremitäten, Unfähigkeit sich nach dem Umfallen wieder aufzurichten. Bald darauf starke Dispnoe, welche von einzelnen Krämpfen unterbrochen bis zum Tod anhielt, welcher 1 Stunde 44 Minuten nach der Injection eintrat¹⁾.

Fragen wir nach dem Grunde der intensiven Giftwirkung des Azoimids, so ist wohl die plausibelste Ansicht folgende: Das Azoimid und dessen Verbindungen sind, wie Curtius berichtet, sehr leicht und unter heftiger Explosion zersetzblich. Wenn nun die Lebensfähigkeit der Zellen ebenfalls die Zersetzung anregt durch die Uebertragung heftiger Atomschwingungen, so kann der plötzliche Zerfall der Azoimidverbindungen zurückwirken auf das Protoplasma und die Umlagerung des activen Proteinstoffes herbeiführen²⁾. Sind vollends die Zellen Ganglienzellen, so können solche Vorgänge als Reize wirken und, in den Nerven fortgeleitet, in Muskeln als Krämpfe erscheinen. Der in Folge rasch wiederholter Reize eingeleitete Absterbeprocess kann wie das Feuer in einer Zündschnur in den Nerven sich fortpflanzen und das ganze System zur Umlagerung bringen, worauf in Folge der Unthätigkeit von Herz und Lunge secundär der Tod des Muskel- und Drüsensystems erfolgt (Todtentstarre).

Beim Azoimid haben wir sicher einen anderen Grund der Giftwirkung als beim Hydroxylamin und beim Diamid³⁾. Bei letzteren beiden kennen wir eine selbst bei grosser Verdünnung eintretende

¹⁾ Es mag hier noch erwähnt werden, dass ich beim absichtlichen Einathmen von zerstäubter 1 proc. Natriumazoinidlösung bald Ohrensausen und Kopfschmerz verspürte, was etwa 25 Minuten anhielt. Th. Curtius erwähnte bereits (diese Berichte XXIII, 3026), dass das freie Azoimid beim Einathmen Schwindel, Kopfschmerz und Entzündung der Nasenschleimhaut herbeiführt und die wässrige Lösung ätzend auf die Epidermis wirkt.

²⁾ Im Allgemeinen werden daher diejenigen Zellen und Organismen am schnellsten durch die Einwirkung von Azoimid zu Grunde gehen, welche dieses am raschesten zersetzen.

³⁾ Sollte die von Curtius in Aussicht gestellte Verbindung $\text{NH}_2-\text{NH}-\text{NH}_2$ wirklich isolirt werden, so wird man finden, dass dieser Körper eine äusserst intensive Giftwirkung besitzt.

specifische chemische Wirkung: Den Eingriff in Aldehydgruppen. Das Azoimid aber dürfte eine Wirkung auf Aldehyde — wenn überhaupt — nur in concentrirterer Lösung äussern können.

Auffallend ist die langsame Wirkung des Natriumazoimids auf Algen. Hier sehen wir, dass bei einer 1 per mille-Lösung erst nach mehreren Tagen Granulationen entstehen, was bestimmt auf eine langsame Zersetzung deutet, denn würde das Natriumazoimid als solches Granulationen erzeugen können, so müssten diese in allen Spirogyrenzellen längstens nach mehreren Stunden sichtbar werden. Wahrscheinlich entsteht Ammoniak, denn dieses bringt sowohl im freien Zustand als auch als Carbonat selbst bei 0.1 per mille die gleichen Granulationserscheinungen hervor¹⁾. Neutral reagirende Ammoniaksalze wirken zwar ebenso bei einer Concentration von 1 per mille, nicht mehr aber bei 0.1 per mille. Bei dieser Verdünnung ist nur ein ernährender Einfluss derselben zu beobachten.

Das Azoimid könnte nun scheinbar am leichtesten Ammoniak durch Spaltung mit Wasser liefern, wobei gleichzeitig Stickstoffoxydul entstehen müsste:



Da nun die chemische Thätigkeit des Protoplasmas an katalytische Wirkungen erinnert, so versuchte ich, ob Platinmohr eine derartige Spaltung herbeiführen könnte und erwärme die geringe Menge der einprozentigen Lösung von Natriumazomid, welche mir noch übrig geblieben war, mit etwa 10 g kräftig wirkendem Platinmohr²⁾. Sofort begann eine heftige Entwicklung eines indifferenten Gases, und die stark alkalisch gewordene Flüssigkeit lieferte mit dem Nessler'schen Reagens eine äusserst starke Ammoniakreaction. Noch energischer war die Zersetzung beim Zusatz verdünnter Schwefelsäure. — Das Azoimid kann daher durch katalytische Zersetzung in der That Ammoniak liefern, und dadurch gewinnt meine Ansicht über die Wirkung desselben auf Algen an Wahrscheinlichkeit. Wie schon erwähnt, fasse ich die weit raschere Wirkung auf andere Organismen pflanzlichen wie thierischen Ursprungs unter einem anderen Gesichtspunkt auf.

¹⁾ Ueber die Granulationen siehe weiteres: Loew und Bokorny, Botanisches Centralblatt 1889, No. 45).

²⁾ Derselbe war nach meiner Vorschrift hergestellt (diese Berichte XXIII, 289).
