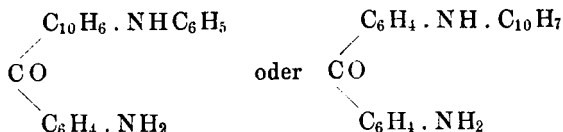
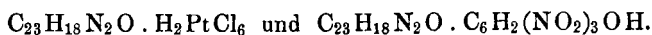


Concentrirte Salzsäure zersetzt oberhalb 200° das Victoriablau B, wobei ausser dunkler, harziger Substanz reichlich Chlormethyl, Dimethylanilin und ein ketonartiger Körper,  $C_{23}H_{18}N_2O$ , wahrscheinlich:



entstehen.

Die wenig lösliche Substanz,  $C_{23}H_{18}N_2O$ , bildet hellgelbe Flocken; schmilzt bei 92°. Besitzt basische Eigenschaften. Dargestellt Platindoppelsalz und Pikrat:



Spaltungsversuche am Keton mit Mineralsäuren und Aetzkalken erfolglos.

Bei der Destillation des Victoriablaus B a) für sich, b) mit Natronkalk, c) mit Zinkstaub, wurde als Hauptproduct Dimethylanilin und daneben Phenyl- $\alpha$ -naphtylamin erhalten.

Universität Zürich. Laboratorium des Hrn. Prof. V. Merz.

### 359. Casimir Wurster: Ueber die Bildung von salpetriger Säure und Salpetersäure im Speichel aus Wasserstoffsuperoxyd und Ammoniak.

(Eingegangen am 11. Juli.)

Vor einigen Jahren <sup>1)</sup> machte ich darauf aufmerksam, dass frisch secernirter, in Eisessig aufgefangener Speichel in der Regel keine vorgebildete salpetrige Säure enthält, da die Griess'schen Reagentien keine Nitrite anzeigen, die Farbstoffbildung jedoch auf Zusatz von essigsauerm Ammoniak eintritt.

Da zu gleicher Zeit das Tetramethylparaphenylendiamin durch Speichel oft so intensiv gefärbt wird, wie durch eine  $\frac{n}{250}$  Jodlösung, während diese Menge salpetrige Säure das Tetrapapier wieder entfärben würde, so schloss ich daraus, dass der Speichel

<sup>1)</sup> Diese Berichte XIX, 3206.

Wasserstoffsuperoxyd enthalte, welches im Stande sei, das Ammoniak zu salpetriger Säure zu oxydiren.

Ich habe seit jener Zeit den Speichel regelmässig auf Wasserstoffsuperoxyd und salpetrige Säure untersucht und habe bestätigt gefunden, dass der Speichel in der Regel keine vorgebildete salpetrige Säure enthält, dass nur in Ausnahmefällen der Speichel, ebenso wie der Schweiss der Schwäche vorgebildete salpetrige Säure enthält. Besonders sind auch dann in frischem Speichel durch die Griess'schen Reagentien Nitrite direct nachzuweisen, wenn die Körpersäfte und der Harn ausnahmsweise viel Nitrate enthalten.

Mein Bestreben war natürlich dahin gerichtet, Beweise dafür zu bringen, dass der oxydirende Körper des Speichels wirklich Wasserstoffsuperoxyd ist. Alle Versuche jedoch, die Chromsäurereaction zu erhalten schlugen fehl, da, wie sich herausgestellt hat, der Speichel immer überschüssiges Ammoniak enthält, und jede Behandlung, welcher der Speichel unterworfen wird, in alkalischer Lösung die Bildung von salpetriger Säure, in saurer Lösung das Entstehen von Salpetersäure zur Folge hat.

Lässt man den Speichel einige Stunden stehen oder kocht denselben, so ist der Speichel schon verändert; ja, einfaches Filtriren des Speichels genügt, um auf Zusatz von Eisessig oder verdünnter Schwefelsäure jetzt mit den Griess'schen Reagentien Nitrite nachzuweisen, während der frische, direct in Eisessig aufgefangene Speichel nur Wasserstoffsuperoxyd anzeigte.

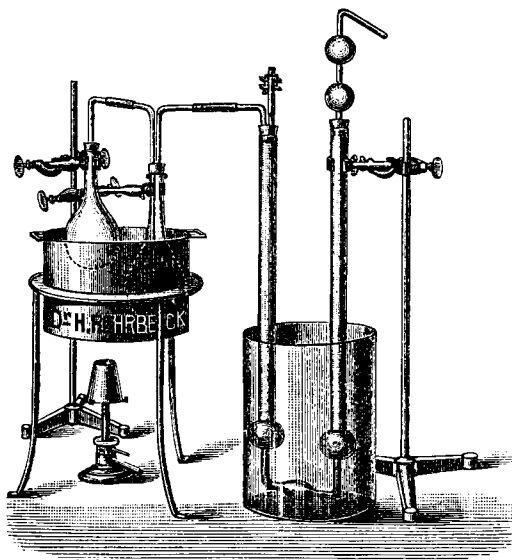
Fängt man hingegen den frischen Speichel in verdünnter Schwefelsäure auf, und zwar benutze ich 3 Tropfen einer 20 procentigen Säure auf 10 ccm Speichel, so verschwindet in der Regel die Reaction auf activen Sauerstoff vollständig, das Tetrapapier bleibt farblos, ebenso wenig ist salpetrige Säure nachzuweisen, hingegen kann mit den Reagentien auf Salpetersäure — besonders mit Diphenylamin — in conc. Schwefelsäure jetzt Salpetersäure nachgewiesen werden. In schwefelsaurer Lösung verschwindet also der active Sauerstoff des Speichels und bildet Salpetersäure, wie ich dies früher für Wasserstoffsuperoxyd und Ammoniak angegeben habe.

Auffallend ist es, wie Salze, besonders Kochsalz, die Bildung der Nitrite im Speichel beschleunigen. Nimmt man frischen Speichel, versetzt die eine Hälfte mit Eisessig, die andere mit etwas festem Kochsalz, so zeigt letztere nach gutem Umschütteln, mit den Griess'schen Reagentien nach einer Minute auf Zusatz derselben Menge Eisessig die Nitritreaction in schönster Weise, während die Speichelprobe ohne Kochsalz nur auf Tetrapapier färbend einwirkt, also kein Nitrit enthält. Das durch Kochsalz erzeugte Nitrit entfärbt jetzt auch das Tetrapapier rasch. Enthält der Speichel vorgebildete Nitrite, so tritt die Nitritreaction rasch (wie oben mitgetheilt) mit Eisessig, etwas

langsamer mit verdünnter Schwefelsäure ein, als bester Beweis, dass der oxydirende Körper im Speichel in der Regel nicht salpetrige Säure ist.

### Ammoniakbestimmung in Speichel und Harn.

Dass diese durch die Farbenreactionen angedeuteten Prozesse wirklich in eben angegebenen Sinne verlaufen, geht mit ziemlicher Gewissheit aus dem Verhalten des Ammoniaks im Speichel hervor. Der Speichel enthielt in den von mir untersuchten Fällen immer Ammoniak. Nach dem für die Ammoniakbestimmung des Harnes angegebenen Verfahren<sup>1)</sup> lässt sich das Ammoniak im Speichel auch bei Gegenwart von Harnstoff leicht quantitativ bestimmen. Das Ammoniak wird durch Destillation im luftverdünnten Raume gewonnen und in  $\frac{n}{50}$  Schwefelsäure aufgefangen.



10 ccm Speichel und 1—2 ccm Barytwasser kommen in die höherstehende Birne, deren Boden das Wasser des 50—60° warmen Wasserbades eben berührt, während die zweite Birne ganz in das Wasserbad eintaucht und als Schaumgefäß dient. In 5—10 Minuten kann mit 5—10 ccm Harn oder Speichel eine Ammoniakbestimmung ausgeführt werden. Für Speichel wird  $\frac{n}{50}$  Säure, für Harn  $\frac{n}{10}$  Säure vorgelegt. Ich titriere in der Regel mit Methylorange als Indicator.

<sup>1)</sup> Wurster, Centralblatt für Physiologie I, 485.

Harnstoff wird unter diesen Umständen in der kurzen Zeit der Destillation nicht zersetzt; die Zersetzung beginnt jedoch, sobald das Wasserbad über  $80^{\circ}$  steigt und Aetzalkalien vorhanden sind. Eigenthümlicherweise fand ich bei der Ammoniakbestimmung des Speichels einer grösseren Anzahl von Männern annähernd immer dieselbe Menge Ammoniak, während der Gehalt an activem Sauerstoff sehr veränderlich ist.<sup>1)</sup>

Das Destillat von 10 ccm Speichel neutralisirte in der Regel 4 ccm  $\frac{n}{50}$  Säure entsprechend

0.00136 Ammoniak oder  
0.136 g für den Liter Speichel.

Nur bei einem Studenten erhielt ich regelmässig höhere Zahlen; für 10 ccm Speichel etwa  $5.6\frac{n}{50}$  ccm, also 0.1904 g Ammoniak im Liter. Speichel, der mit Tetrapapier wenig activen Sauerstoff anzeigt, giebt die normale Ammoniakmenge von 4 ccm  $\frac{n}{50}$  Säure für 10 ccm Speichel, enthält der Speichel viel Wasserstoffsuperoxyd, so wird nur dann alles Ammoniak gewonnen, wenn der Speichel klar ist und wenig Salze enthält. Bei trübem Speichel, sowie bei Schwächezuständen und Sommerhitze beginnt bald nach dem Secerniren die Bildung der salpetrigen Säure, im Destillationsrückstande sind nun Nitrite vorhanden, während entsprechend weniger Ammoniak überdestillirt. Fängt man den Speichel in Kochsalz oder verdünnter Schwefelsäure auf, so verringert sich das Ammoniak entsprechend der Menge des vorher vorhandenen Wasserstoffsuperoxyds.

Im Laufe des vergangenen Winters gelang es mir in der Regel, bei der Destillation von 10 ccm stark oxydirenden Speichels 4 ccm  $\frac{n}{50}$  Säure zu neutralisiren, während 10 ccm derselben Portion Speichel, die mit Kochsalz oder verdünnter Schwefelsäure versetzt war, bei der Destillation mit Barytwasser weniger Ammoniak lieferten, entsprechend der vorher durch das Tetrapapier und die Tetrascalen nachgewiesenen Menge Wasserstoffsuperoxyds.

Im Destillationsrückstande waren dann bei dem mit Kochsalz destillirten Speichel Nitrite nachzuweisen, während die mit Schwefelsäure versetzten Speichel intensive Reaction auf Salpetersäure gaben. In den heissen Sommermonaten erhielt ich jedoch bei meinem eigenen Speichel immer weniger Ammoniak, die Nitritbildung konnte bei der Destillation nicht verhindert werden. Auch nach Zusatz von Eisenoxydulhydrat oder Pyrogallussäure zur Bindung des activen Sauer-

<sup>1)</sup> Dr. Hermann Rohrbeck hat derartige Apparate zur Ammoniakbestimmung zusammengestellt.

stoffs wurde zwar etwas mehr aber auch nicht alles Ammoniak gewonnen. Eigenthümlicher Weise verschwindet hierbei sowohl mit Kochsalz als mit Säure immer dieselbe Menge Ammoniak, in der Regel 1 ccm  $\frac{n}{50}$  Säure entsprechend, häufig aber auch 2 ccm, ja 3 ccm, so dass nur noch 1 ccm  $\frac{n}{50}$  Säure neutralisirt wird. Dies kaum zu erwartende Ergebniss muss wohl so erklärt werden, dass die Oxydation des Ammoniaks sowohl in saurer Lösung als in alkalischer durch den activen Sauerstoff nur bis zu dem Stickoxyd geht, dieser aber durch den passiven Sauerstoff weiter oxydirt wird, und zwar in alkalischer Lösung hauptsächlich zu salpetriger Säure, in saurer Lösung bis zur Salpetersäure.

Auffallend ist es ebenfalls, wenn die oben gegebene Erklärung richtig ist, dass bei der Titration des frischen Speichels dieselbe Zahl für die Alkalinität des Speichels erhalten wird, ob derselbe nun direct titrirt oder vorher in Kochsalz oder verdünnter Schwefelsäure aufgefangen wird. Man sollte erwarten, dass, da Ammoniak verschwindet und durch Oxydation aus dem Ammoniak Säuren entstehen, der Titre des in Kochsalz aufgefangenen Speichels ein anderer wie der des frischen Speichels sein würde. Dies ist aber nicht der Fall. 10 ccm frischen Speichels neutralisiren in der Regel 6 ccm  $\frac{n}{50}$  Säure, dasselbe thut der in Kochsalz aufgefangene Speichel. Dies kann nur dadurch erklärt werden, dass bei der Ausführung der Titration gleichzeitig schon die Oxydation des Ammoniaks, wie beim Kochen oder längerem Stehen, stattfindet. In der That wurde aus vorher titrirtem Speichel bei der Destillation weniger Ammoniak erhalten als aus frischem Speichel. Speichel ohne activen Sauerstoff zeigt auch grössere Alkalinität wie sauerstoffreicher an; 10 ccm neutralisiren 7—13  $\frac{n}{50}$  Säure.

Ebenso zeigt Speichel, der bei Sommertemperatur 24 Stunden gestanden hat und bei welchem durch Mikroorganismen die zuerst gebildeten Nitrite wieder reducirt sind, eine Alkalinität von 7—9  $\frac{n}{50}$  Säure und entsprechend grösseren Ammoniakgehalt an. Die Nitrate verschwinden bei Sommertemperatur aus dem Speichel, aber erst im Verlauf von 2—3 Tagen.

Das Verhalten des Speichels bei der Titration verlangt noch ein eingehenderes Studium. Die eben mitgetheilten Untersuchungen beziehen sich nur auf Speichel, der ohne jede Reizung der Schleimhaut, lediglich durch Kaubewegungen oder Saugbewegungen bei körperlicher Ruhe gewonnen wurde.

Speichel, der durch directe Reizung der Mundschleimhaut gewonnen wird, verändert seine Zusammensetzung wesentlich. Studirt habe ich den Einfluss von festem Kochsalz und 10procentiger Essigsäure auf die Speichelsécrétion, und zwar bei Maximalreizen, die auf die Mundschleimhaut schmerzzerzeugend wirken.

Während der durch Kaubewegung secernirte Speichel dünnflüssig und arm an organischen Bestandtheilen und oft durch seinen Gehalt an activem Sauerstoff ausgezeichnet ist, so verschwindet in dem durch Kochsalzreizung der Mundschleimhaut erzeugten Speichel sowohl der active Sauerstoff, als der grösste Theil des Ammoniaks; der Speichel enthält jetzt viel Schleim, ist zähflüssig und verzuckert Stärkekleister doppelt bis dreimal so rasch, wie der dünnflüssige, sauerstoffreiche Speichel. In dem Maasse, wie der Schmerz auf der Schleimhaut nachlässt, erscheint zuerst salpetrige Säure, dann je dünnflüssiger, d. h. ärmer an Schleim, der Speichel wird, um so mehr tritt die salpetrige Säure zurück, und es tritt hingegen wieder Ammoniak und activer Sauerstoff auf. Je nach der Intensität der Reizung hat nach 3—15 Minuten der Speichel die vor der Reizung gehabte Zusammensetzung wieder angenommen.

Der auf der Höhe der Reizung gewonnene Speichel zeigte nun ausser Schleim noch einen Gehalt an Nitraten und an Harnstoff an. Aus 200 ccm Kochsalzspeichel konnte durch Destillation im Vacuum und Extrahiren mit Alkohol 0.090 gr Harnstoff gewonnen werden, der direct beim Verdunsten des Alkohols krystallisirte. Aus je 200 ccm Kochsalzspeichel erhielt ich nach der Schultze'schen Methode der Salpeterbestimmung 5.1 und 3.1 mg Stickoxyd, in einem Falle aus 115 ccm Speichel 5.1 mg Stickoxyd, in einem anderen Speichel, der Nitrite enthielt, sogar aus 115 ccm 28.40 mgr Stickoxyd. Ueber den gleichzeitigen Gehalt des Harns an Nitraten werde ich später berichten. Das Ammoniak verschwindet nahezu vollständig, 10 ccm Speichel neutralisirten nur noch 1 ccm  $\frac{n}{50}$  Säure. Einzelne Beobachtungen sprechen dafür, dass nicht reines Ammoniak, sondern eine Ammoniakbase übrig bleibt, doch war die bis jetzt gewonnene Menge der Base zu gering, um diese Frage weiter zu verfolgen.

Dass mit dem Auftreten des Schleims im Speichel sowohl der active Sauerstoff als auch das Ammoniak verschwinden, hingegen wieder auftreten, sobald der Schleim zurücktritt, halte ich für um so bemerkenswerther, als ich früher angegeben habe<sup>1)</sup>, dass der durch Oxydation des Hühnereiweisses, durch Wasserstoffsuperoxyd, 1 pCt. Milchsäure, 1 pCt. Kochsalz entstehende Caseinähnliche Körper, bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd und Ammoniak in einen schleim-

<sup>1)</sup> Diese Berichte XX, 1032.

artigen Körper, der hornartig eintrocknet, übergeht, das Mucin demnach durch die Einwirkung von salpetriger Säure in statu nascendi auf Eiweiss entstehen könnte, wie auch der geringe Gehalt des Mucins an Stickstoff für einen Verlust des Eiweisses an Stickstoff bei der Mucinbildung spricht, der wohl durch die Einwirkung der salpetrigen Säure entstehen kann.

Harnstoffhaltiger Speichel, der zugleich salpetrige Säure enthält, färbt das rothe Griess'sche Reagens öfter blauviolett, nicht roth.

Leucin und Tyrosin konnten in dem Kochsalzspeichel nicht nachgewiesen werden, wenigstens traten die empfindlichen Reactionen mit Chinon nicht ein.<sup>1)</sup>

Merkwürdig war es mir, dass der charakteristische Metallgeschmack des Wasserstoffsuperoxyds an dem stark oxydirenden Speichel nicht bemerkt wird. Es genügt aber, die Schleimhaut empfindlicher zu machen, damit der Metallgeschmack deutlich auftritt. Ich bekam den charakteristischen Geschmack in deutlicher und nachhaltiger Weise, als ich die obersten Schleimhautschichten durch wiederholte Behandlung mit absolutem Alkohol oder trockenem Tannin coagulirte und entfernte. Es trat dann der Metallgeschmack in ekel-erregender Stärke auf und dauerte in einem Falle mehr als zwei Tage. Eine gleichzeitige Vermehrung des activen Sauerstoffs wurde hierbei nicht beobachtet.

Dass der im Speichel vorhandene oxydirende Körper nicht salpetrige Säure, sondern Wasserstoffsuperoxyd ist, geht auch aus dem Verhalten gegen kochsalzhaltigen Jodkaliumstärkekleister hervor.

Versetzt man den stark oxydirenden Speichel, der nicht auf Griess'sches Reagens wirkt, mit Jodkaliumstärkekleister in Eisessig, so entsteht beim Umschütteln nur eine gelbe oder gelbbraune Lösung wie mit Wasserstoffsuperoxyd. Schichtet man jedoch den Speichel auf die Eisessig-Jodlösung, so entsteht an der Berührungsstelle zuerst der gelbbraune Ring; darüber färbt sich der Speichel nach und nach röthlich, dann langsam blau. Eisessig scheint der einzige Körper zu sein, der die Oxydation des Ammoniaks des Speichels durch das Wasserstoffsuperoxyd auf einige Zeit verhindert. Rasch geht diese Oxydation vor sich bei Gegenwart von verdünnter Salzsäure oder Schwefelsäure, welche bekanntlich mit Speichel die blaue Jodstärke bilden, die dann auch immer auf salpetrige Säure gedeutet worden ist. Ist wirklich schon salpetrige Säure im Speichel vorhanden, so tritt auch die Bläuung der Jodstärke mit Eisessig ein.

Obwohl der Nachweis des Wasserstoffsuperoxyds durch die Chromsäurereaction bisher nicht gelungen ist, so bin ich immer noch der

<sup>1)</sup> C. Wurster, Centralblatt für Physiologie II, 590.

Ansicht, dass der oxydirende Körper des Speichels Wasserstoffsuperoxyd sei.

Von vielen Seiten wird die Existenz des Wasserstoffsuperoxyds in thierischen Säften für unmöglich gehalten, obwohl Thenard schon nachgewiesen, dass das Wasserstoffsuperoxyd gewissen Geweben gegenüber sich widerstandsfähig zeigt. Auch unter Alexander Schmidt's Leitung wurde durch Bergengruen<sup>1)</sup> gezeigt, dass die Zersetzung des Wasserstoffsuperoxyds durch lebende Zellen oft langsam vor sich geht. In einer umfangreichen Abhandlung hat vor Kurzem Pfeffer<sup>2)</sup> mitgetheilt, dass es ihm nicht gelungen sei, in den von ihm während des Lebens beobachteten Zellen activen Sauerstoff nachzuweisen. Allerdings hat Pfeffer keine der Pflanzen benutzt, in denen durch das Tetrapapier ein stark oxydirender Saft nachgewiesen wird. Dagegen ist Pfeffer der für den vorliegenden Fall wichtige positive Nachweis gelungen, dass das Wasserstoffsuperoxyd unverändert durch die Zellwand diffundirt und im Zellsaft Oxydationen vollbringt, ohne die Protoplasmabewegung aufzuheben, und zwar sowohl eine Farbstoffbildung im Zellsaft bedingen als auch im anderen Fall auf im Zellsaft aufgespeicherten Farbstoff durch Oxydation entfärbend einwirken kann.

Ist das Wasserstoffsuperoxyd verdünnt, so wird dasselbe auch durch die fermentartige Wirkung der Hyperoxyde nur noch langsam zersetzt.

Wasserstoffsuperoxyd, welches 20 mal über Braunstein filtrirt wurde, enthielt noch ebensoviel activen Sauerstoff, wie sich in günstigen Fällen im Speichel, dem Schweiss und gewissen Pflanzensäften mit Hilfe des Tetramethylparaphenylendiaminpapiers nachweisen lässt. Auch Wasserstoffsuperoxyd, das mit Platinmoor und Silberoxyd stundenlang gestanden hatte, zeigte mit Tetrapapier noch eine Oxydationskraft von  $\frac{n}{250}$  Jod an.

Ueber die Art und Weise, wie das Wasserstoffsuperoxyd in den thierischen Säften sich bildet, bin ich noch zu keiner bestimmten Ansicht gelangt.

Berlin, den 9. Juli 1889.

Gad's vivisectorische Abtheilung des Physiologischen Instituts.

---

<sup>1)</sup> Centralblatt für Physiologie II, 689.

<sup>2)</sup> W. Pfeffer, Beiträge zur Kenntniss der Oxydationsvorgänge in lebenden Zellen. Abb. d. math.-phys. Klasse d. Königl. Sächs. Ges. d. Wiss. 1889, Bd. XV, No. 5.