

carbonsäureäthylester übergeführt. Aus siedendem Wasser erhält man 3—4 cm lange, farblose Prismen, die gegen soda-alkalisches Permanganat beständig sind. Schmp. 71°. Sie verlieren das Krystallwasser schon im Vacuum über Schwefelsäure, wobei sich der Schmelzpunkt auf 91° erhöht.

0.6756 g Sbst. verloren beim Trocknen 0.0750 g.

$C_{12}H_{16}O_6N_2 \cdot 2H_2O$ . Ber.  $H_2O$  11.25. Gef.  $H_2O$  11.10.

0.2817 g Sbst.: 0.5215 g  $CO_2$ , 0.1428 g  $H_2O$ . — 0.3484 g Sbst.: 30.0 ccm N (19°, 760 mm).

$C_{12}H_{16}O_6N_2$ . Ber. C 50.66, H 5.69, N 9.88.

Gef. » 50.49, » 5.69, » 9.96.

### Pyrazol-3.4.5-tricarbonsäure, $C_3HN_2(CO_2H)_3$ .

Der Ester wurde durch Kochen mit verdünnter Schwefelsäure verseift, die ausfallende Säure aus Wasser umkristallisiert und zur Analyse bei 130° getrocknet. Der Zersetzungspunkt lag, wie erwartet, bei 233°.

0.2520 g Sbst.: 0.3315 g  $CO_2$ , 0.0460 g  $H_2O$ .

$C_6H_4O_6N_2$ . Ber. C 35.98, H 2.02.

Gef. » 35.88, » 2.05.

### Pyrazol, $C_3H_4N_2$ .

Aus der Tricarbonsäure durch Erhitzen auf 230—240° erhalten und aus Ligroin umkristallisiert; farblose Prismen, mit dem charakteristischen Geruch nach Pyridin. Schmp. 69°.

0.1455 g Sbst.: 51.4 ccm N (18°, 766 mm).

$C_3H_4N_2$ . Ber. N 41.22. Gef. N 41.36.

---

## 49. † M. Henze: Ueber ein Vorkommen freier Asparaginsäure im thierischen Organismus.

(Eingegangen am 1. Februar.)

Seit der ersten Beobachtung Troschel's<sup>1)</sup> an Doleum galea sind eine ganze Reihe von Meeresschnecken bekannt geworden, welche ein sauer reagirendes Secret seerniren. Namentlich haben Pauceri und de Luca<sup>2)</sup> mehrere Arten als Säure producirend beschrieben, bei denen sie die betreffende Säure allgemein für Schwefelsäure hielten. Bei Doleum galea ist dies auch thatsächlich der Fall. Wir wissen, dass dieses Thier ein aus der sogenannten Mitteldarmdrüse stammendes Secret ausspritzt, welches neben etwas Salzsäure ca. 2.18—4.25 pCt. Schwefelsäure enthält. Schönlein<sup>3)</sup> hat nun in einer

<sup>1)</sup> Ann. d. Chem. 93, 614 u. Journ. für prakt. Chem. 63, 170.

<sup>2)</sup> Compt. R. 65, 577 u. 712.    <sup>3)</sup> Zeitschr. für Biologie 36, 523.

darauf gerichteten Untersuchung erkannt, dass wir es keineswegs stets mit einer Absonderung von Schwefelsäure zu thun haben. So erkannte er z. B. in der von Tritonium nodosum, dem sogen. Tritonshorn, producirten Säure eine krystallinische organische Verbindung. Er selbst vermutete bereits in derselben Asparaginsäure und schloss dies aus dem Aussehen eines Kupfersalzes, welches die betreffende Substanz gab. Die angestellten Untersuchungen die z. Th. in Drechsel's Laboratorium ausgeführt wurden, haben jedoch den Beweis nicht erbringen können.

War nun die chemische Identificirung der secernirten Säure an und für sich interessant, so wäre die Auffindung der Asparaginsäure in solchen immerhin beträchtlichen Mengen im thierischen Organismus von doppeltem Interesse gewesen. Obwohl die Asparaginsäure mehrfach als Spaltungsproduct bei der Einwirkung chemischer Agentien aus Eiweisskörper erhalten worden ist, so hat man sie im thierischen Organismus überhaupt noch nicht aufgefunden. Nur bei der künstlichen Pankreasverdauung wurde sie in verschwindend kleiner Menge nachgewiesen.

Diese Gründe veranlassten die folgende erneute Untersuchung, und ich bin insbesondere Hrn. Cavaliere Dr. Lo. Bianco für die Mühe, die er sich gegeben hat mir das nöthige Material zu verschaffen, zu Dank verpflichtet. Die Thiere sind leider im Golf von Neapel selten. Ich hatte im Ganzen 8 Stück zur Verfügung. Gleichzeitig danke ich Hrn. Baron von Uexküll und Hrn Dr. Cohnheim aufs herzlichste für ihre freundlichen Rathschläge.

Ueber die Gewinnung des Secrets selbst fasse ich mich so kurz wie möglich, indem ich auf die sehr ausführliche Beschreibung Schönlein's verweise. Nur einige orientirende Bemerkungen und nachträgliche Beobachtungen seien mir gestattet.

Das Secret wird von einem Drüsenpaar producirt, von denen ein jedes aus zwei Theilen besteht: einem vorderen alkalisch reagirenden Theil und einem rückwärtsgelegenen, stark sauer reagirenden Theil. Der letztere liefert bei der Reizung das betreffende Secret, während der erstere, wie schon Schönlein erwähnt, selbst bei starker tetanischer Reizung nichts secernirt. Bei fast allen Thieren wurde zunächst versucht, dieselben zum freiwilligen Absondern des Secrets zu veranlassen. Schönlein führte an, dass meist nur wenige Tropfen desselben eben zur Rüsselloffnung herausquellen. Von den acht Thieren zeigten überhaupt nur drei den Rüssel und sonderten in der erwähnten Weise eine kleine Portion saurer Flüssigkeit ab, mit der, wie unten erwähnt, einige Versuche für sich gemacht wurden. Sie betasteten dabei ein untergehaltenes Glasschälchen aufgeregt mit dem Rüssel. Bei einem der Thiere wurde der hervorgesteckte Rüssel mit der Pincette gefasst, indem das Thier gleichzeitig von einem Ge-

hülfen am Zurückziehen in das Gehäuse gehindert wurde. In den Rüssel wurde ein Katheter eingebunden, dieses mit einer Blase aus feinem Gummi verschlossen, und das Thier wieder in das Aquarium gesetzt. Bei dieser Manipulation spritzte das Thier eine saure Flüssigkeit wohl  $\frac{1}{2}$  —  $\frac{3}{4}$  m weit weg. Man könnte daraus vielleicht auf einen zur Vertheidigung dienenden Zweck des Secrets schliessen. Nach einigen Tagen fand sich in dem Katheter nur eine sehr geringe Menge saurerer Flüssigkeit.

Nachdem so die Bemühungen fehlgeschlagen waren, die Thiere zur freiwilligen Absonderung grösserer Mengen des Secrets zu bringen, und da außerdem das zur Verfügung stehende Material kostbar war, wurden die Schnecken durch vorsichtiges Aufbrechen des Gehäuses (vergl. Schönlein) herausgenommen. Wenn es auch bei einiger Vorsicht gelingt, die Thiere ohne vorherige Injection muskellähmender Gifte heraus zu präpariren, erleichtert es doch bei Weitem die Arbeit, wenn man den Tonus beseitigt. Pelletierin-Injectionen erwiesen sich als äusserst wirksam, sodass das zur weiteren Muskelerschlaffung empfohlene Erwärmen des Thieres auf ca. 30° kaum nothwendig erschien. Am Rüssel beginnend, schneidet man das Thier auf und legt somit die Drüsen bloss.

Die beiden sauer reagirenden Drüsenhälften wurden zuerst, wie dies Schönlein gemacht hat, elektrisch gereizt, später aber sofort mit einem Platinspatel behutsam ausgedrückt, da sich das Secret hierbei ebenso rein erhalten liess. Die ablaufende Flüssigkeit beginnt sich fast augenblicklich zu trüben und Krystalle abzuscheiden. Die höchst merkwürdige, gleichzeitig beim Drücken der Drüse auftretende Kohlensäure-Entwickelung<sup>1)</sup> habe ich deutlich beobachten können.

Das auf diese Weise von 5 Thieren erhaltene Secret wurde in heissem Wasser gelöst, aufgekocht, und die abgeschiedenen Flöckchen, z. Tb. jedenfalls coagulirtes Eiweiss, z. Th. keine Partikel der Drüse, wurden durch sorgfältiges, wiederholtes Filtriren entfernt. Nach etlichen Vorversuchen wurde die heisse Flüssigkeit mit Kupferacetat versetzt. Sie nimmt eine tiefblaue Farbe an, und nach einigem Stehen beginnt die Abscheidung von hellblauen, undeutlichen, krystallinischen Flocken. Nachdem keine Vermehrung derselben mehr eintrat, wurde abgesaugt und das nur schwach grünlich gefärbte Filtrat zur weiteren Untersuchung bei Seite gestellt.

Das Kupfersalz ist äussert schwer löslich in Wasser und lässt sich unter Zusatz von etwas Essigsäure gut umkrystallisiren.

---

<sup>1)</sup> Es sei bemerkt, dass man diese Kohlensäure-Entwickelung früher einer durch die vermeintliche Schwefelsäure hervorgerufenen Zersetzung von kohlensaurem Calcium zuschrieb. Die krystallisirende organische Substanz hielt man für kohlensaures Calcium.

Schon nach einmaliger Krystallisation erhielt ich auf diese Weise sehr schöne blaue Nadelchen, die grosse Aehnlichkeit mit einem Vergleichspräparate von asparaginsaurem Kupfer zeigten. Das Salz wurde in einer grossen Quantität Wasser suspendirt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Auch ich machte dabei die unangenehme Beobachtung, die Drechsel in Schönlein's Arbeit angiebt, dass sich das Kupfersulfid colloidal abscheidet. Setzt man aber etwas Bleioxyd zu und erwämt während des Einleitens auf dem Wasserbad, so setzt sich das ausgefällte Kupfersulfid zu Boden, und die überstehende Flüssigkeit lässt sich klar abfiltriren.

Das Filtrat beginnt nach dem Einengen zu krystallisiren. Die erhaltene Krystallmasse wird einige Male aus dem kochenden Wasser umkrystallisiert. So erhält man schliesslich kleine rechteckige Täfelchen. Unter dem Mikroskop schienen sie völlig einheitlich, waren doppelt brechend, unlöslich in Alkohol und verbrannten ohne Rückstand auf dem Platinblech. Im Schmelzpunktröhrchen zersetzen sie sich langsam etwa zwischen 240—300°. Stimmten schon diese Eigenschaften alle auf die Asparaginsäure, so bewies dies engültig die Analyse.

0.1812 g Sbst.: 0.2394 g CO<sub>2</sub>, 0.0890 g H<sub>2</sub>O. — 0.1788 g Sbst.: 17 ccm N (17°, 74 mm).

C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>4</sub>N. Ber. C 36.1, H 5.2, N 10.5.

Gef. » 36.0, » 5.4, » 10.9.

Zur weiteren Bestätigung wurde auch das Kupfersalz analysirt. Dasselbe wurde zu diesem Zwecke aus der gereinigten Säure durch Kochen mit frisch gefälltem Kupferhydroxyd dargestellt, damit man sicher sei, nicht etwa saures Salz mit zu bekommen. Da die Angaben über die Temperatur, bei denen man asparaginsaures Kupfer völlig wasserfrei erhält, sehr von einander abweichen<sup>1)</sup>, so habe ich das Salz bis zur Gewichtsconstanz im Exsiccator gelassen. Die erhaltene Zahl stimmt so sehr gut auf das wasserhaltige Salz mit dem allgemein angenommenen Gehalt von 4½ Mol. Krystallwasser.

0.3365 g Sbst.: 0.1096 g CuO = 0.0875 g Cu.

C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>4</sub>NCu + 4½aq. Ber. Cu 22.9. Gef. Cu 23.0.

Eine qualitative Prüfung zeigte ferner, dass die Säure, die zu dem Zwecke in ganz verdünnter Salzsäure gelöst war, optisch aktiv und zwar linksdrehend war.

War somit die Anwesenheit der Asparaginsäure zweifellos festgestellt, so wandte ich mich nunmehr zur Untersuchung der von der ersten Fällung des Kupfersalzes gebliebenen Mutterlauge. Durch Schwefelwasserstoff wurde zunächst die geringe Menge von Kupfer

<sup>1)</sup> Cf. Gaethgens: Zeitschr. für physiolog. Chem. 1, 302, 308. Die daselbst angeführte Originalliteratur stand mir in Neapel leider nicht zu Gebote.

gefällt, worauf sich beim starken Einengen auf dem Wasserbad noch einige Krystalle von Asparaginsäure abschieden. Als auch bei weiterem Eindampfen keine Abscheidung mehr zu beobachten war, wurde die dickliche Flüssigkeit mit 96-prozentigem Alkohol in grossem Ueberschuss versetzt, worauf eine geringe Trübung, die sich als Schmiere zu Boden setzte, eintrat. Sie gab die Biuret-Reaction. Das Filtrat wurde, ohne dass irgend eine Ausscheidung zu beobachten gewesen wäre, bis auf ein kleines Volumen eingeeengt und damit die folgenden Reactionen vorgenommen.

Die Biuretreaction trat sehr intensiv ein. Die Färbung war dabei rein roth. Die Flüssigkeit zeigte weiter die Xanthoprotein-reaction und lieferte die Millon'sche Probe. Phosphorwolframsäure und Quecksilberchlorid gaben Fällungen, Salpetersäure oder Ferrocyankalium auch bei Essigsäurezusatz dagegen nicht.

Die Löslichkeit in Alkohol, sowie die angeführten Reactionen deuteten allesamt auf die Anwesenheit eines peptonartigen Körpers. Um die Gegenwart eines solchen sicher zu stellen, behandelte ich nunmehr das Secret von zwei frischen Drüsen wie folgt.

Die klarfiltrirte Flüssigkeit wurde mit Soda<sup>1)</sup> neutralisiert und eben mit Essigsäure angesäuert. Beim Aufkochen schied sich eine verhältnissmässig recht geringe Menge coagulirten Eiweisses ab. Nach erfolgter Sättigung des Filtrats mit Ammoniumsulfat in Substanz gab die abfiltrirte Flüssigkeit, mit viel Natronlauge und etwas Kupfersulfat versetzt, die rein rothe, für Peptone charakteristische Biuret-reaction.

Schönlein ist der Meinung, dass die frisch aus der Drüse abgesonderte Flüssigkeit die organische Säure nicht bereits als solche enthalte, sondern dass das Secret erst nachträglich einen Zerfall erleide; mit anderen Worten dürfe auch in der Drüse kein Vorrath an Asparaginsäure aufgespeichert sein. Er folgert dies, wie mir scheint, hauptsächlich daraus, dass er anführt, die Krystallisation der organischen Säure erfolge erst nach ca. 30 Minuten (S. 543). Soweit ich beobachten konnte, trat dieselbe fast augenblicklich ein. Auch die folgenden Versuche gegen Schönlein's Ansicht sprechen.

Eine dem lebenden Thiere entnommene sauere Drüse wurde sofort in siedendes Wasser geworfen, damit eventuelle Enzymwirkung (vergl. unten) ausgeschlossen werde. Nach einiger Zeit wurde die Drüse

---

<sup>1)</sup> Bei genauer Neutralisation trat dabei eine flockige Trübung ein, die beim Ansäuern verschwand. Ammoniak wirkte ebenso. Da ein derartiges Verhalten unter den Eiweisskörpern für Histone charakteristisch ist, so wurde der Niederschlag gesammelt, lieferte aber keine Biuretreaction. Die Vermuthung, dass die Fällung von einem anorganischen Salze des Seewassers herrührte, liegt sehr nahe.

im Wasser ausgepresst und die Lösung untersucht. Sie gab sowohl mit Kupferacetat asparaginsaures Kupfer, als auch nach der Sättigung mit Ammoniumsulfat die Peptonreaction. Eine andere frische Drüse wurde in absoluten Alkohol gegeben und, nachdem sie einige Zeit darin gelegen hatte, unter dem Mikroskop betrachtet. Da Asparaginsäure unlöslich in Alkohol ist, so durfte man erwarten, dass dadurch die Säure innerhalb der Drüse ausgefällt werde. Unter dem Mikroskop zeigten sich denn auch massenhaft krystallinische Körnchen, die auf Zusatz von etwas Sodalösung unter Gasentwickelung verschwanden. Sehr ausschlaggebend scheint mir auch folgende Beobachtung. In einer allerdings kleinen Menge vom Thiere selbst entleerten Secrets liess sich Asparaginsäure deutlich nachweisen, dagegen gab dasselbe keine Spur einer Biuretreaction. Fände nun die Spaltung, sagen wir, in Asparaginsäure und Pepton unter eventuell gleichzeitig verlaufender Kohlensäureentwicklung erst ausserhalb der Drüse statt, wie Schönlein meint, so müsste sich doch auch im selbstthätig abgesonderten Secret Pepton finden lassen.

Allem Anschein nach treten also Asparaginsäure und, was ebenfalls sehr auffällig ist, Pepton in der Drüse nebeneinander auf. Beides sind Spaltungsproducte des Eiweisses. Was liegt also näher als die Vermuthung, dass man es mit dem Zerfall eines Eiweisskörpers zu thun habe, der etwa unter der Wirkung eines Enzyms in der Drüse selbst vor sich geht. So weit die angeführten Versuche hierin entscheidend sein können, hat sich die Gegenwart eines Enzyms bisher nicht nachweisen lassen. Es wurden unter Zusatz von etwas Seewasser fein mit Quarzsand verrieben:

- a) eine frische sauere Drüse,
- b) eine mit der saueren Drüse in directer Verbindung stehende alkalische Drüse, die, wie gesagt, zwar kein Secret liefert, aber doch wohl der Träger des Enzyms sein konnte,
- c) eine sauere und eine alkalische Drüse zusammen.

Nach einem Stehen werden die einzelnen Flüssigkeiten centrifugirt, filtrirt und zu jeder Portion eine Flocke Fibrin gegeben. Bei einer zweiten Versuchsreihe bekam jedes Gläschen außerdem noch von einem Seestern<sup>1)</sup> ein paar Saugfüsschen und ein Stück der Rückendecke, damit eventuell daran eine Verdauungswirkung constatirt werden könnte. In keinem Falle konnte eine solche nachgewiesen werden. Die Proben blieben mehrere Tage unter Chloroformzusatz stehen.

Da sich zufällig noch eine kleine Quantität des vom lebenden Thiere freiwillig abgesonderten Secrets erhalten liess, so wurde auch

<sup>1)</sup> Es war beobachtet worden, dass ein im Aquarium gehaltenes Thier auf einen Seestern gekrochen war, der ihm offenbar als Nahrung diente. Er war bereits ganz weich geworden und begann zu zerfallen.

damit ein Verdauungsversuch gemacht. Derselbe fiel ebenso negativ aus. Man hat es also auch scheinbar nicht mit einem Zymogen zu thun; welches mit dem Secret secernirt, etwa erst ausserhalb der Drüse seine enzymatische Wirkung entfaltete.

Eines darf man wohl noch aus den letzten Beobachtungen schliessen: dass nämlich weder die Drüse noch deren Secret zur Verdauung dienen. Wir haben es offenbar nicht mit einer Verdauungsdrüse zu thun. Es ist hier nicht der Ort, über ihren eigentlichen Zweck zu entscheiden; dies bedarf der Arbeit eines Fachmannes. Nur eine Bemerkung möchte ich noch machen. Es ist auffällig, wie viel leichter Asparaginsäure im Meerwasser löslich ist. Ich fand nachträglich eine Notiz von Schiff (B. 17, 2930) der angiebt, dass Asparaginsäure in bedeutend grösseren Mengen von Chlornatrium oder Chlorkalium enthaltendem Wasser gelöst wird.. Vielleicht dient die secernirte Asparaginsäure, die unter Meerwasser leichter in Lösung bleibt, wenigstens zum Theil auch mit zur Zersetzung der Kalkschalen anderer Seethiere, wozu gewisse Schnecken wie man sicher weiss, z. B. Schwefelsäure, benutzen.

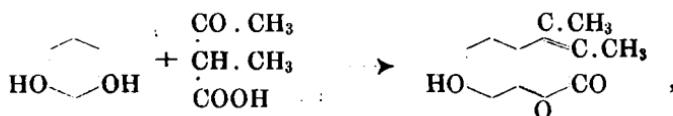
Zoologische Station, Neapel, Januar 1901, und I. Chemisches Universitätslaboratorium, Leipzig.

**50. H. v. Pechmann und Erwin Hanke: Ueber Cumarine aus Phenolen und negativ substituirten Acetessigestern.  
(Studien über Cumarine. V. Mittheilung.)**

[Aus dem chemischen Laboratorium der Universität Tübingen.]

(Eingegangen am 30. Januar.)

Während substituierte Acetessigester, an deren  $\alpha$ -Kohlenstoffatom ein positiver Substituent haftet, z. B. Methylacetessigester, mit Resorcin und anderen Phenolen glatt zu  $\alpha\beta$ -substituierten Oxycumarinen condensirt werden können, z. B.



zeigen negativ substituirte Acetessigester theils ein ähnliches, theils ein abweichendes Verhalten.