

# Beitrag zur Kenntnis des Bence-Jonesschen Eiweißkörpers.

Von

**Emil Abderhalden und Otto Rostoski.**

Aus dem I. chemischen Institut der Universität Berlin und der medizinischen Klinik in Würzburg.)

(Der Redaktion zugegangen am 16. August 1905)

Der im Jahre 1847 von Bence-Jones im Urin aufgefundene, durch mehrere charakteristische Eigenschaften sich scharf gegenüber anderen Eiweißarten unterscheidende Eiweißkörper, welcher jetzt ganz allgemein unter dem Namen Bence-Jonessches Eiweiß bekannt ist, ist wiederholt Gegenstand eingehender Untersuchungen gewesen, sei es hinsichtlich seines Vorkommens, seiner Stellung den übrigen Eiweißarten resp. Abbauprodukten (Albumosen) gegenüber, sei es hinsichtlich seiner Herkunft und auch seiner Zusammensetzung, doch ist es bis jetzt nicht gelungen, alle diese Fragen völlig aufzuklären. Wir verweisen besonders auf die Untersuchungen von Alexander Ellinger,<sup>1)</sup> Magnus-Levy<sup>2)</sup> und Reach.<sup>3)</sup>

Der vorliegenden Arbeit lag der Gedanke zugrunde, einmal mit Hilfe der biologischen Methode festzustellen, ob der Bence-Jonessche Eiweißkörper als «körperfremdes» oder als «körpereigenes» Eiweiß aufzufassen ist und ferner, welche Aminosäuren an seinem Aufbau beteiligt sind. Das erstere Experiment bewies klar und deutlich, daß nicht etwa nicht assimiliertes Nahrungseiweiß vorliegt, wie Magnus-Levy<sup>4)</sup> vermutet hatte, sondern Körpereiwweiß. Was die Zusammensetzung

<sup>1)</sup> Alexander Ellinger, Das Vorkommen des Bence-Jonesschen Körpers im Harn bei Tumoren des Knochenmarkes und seine diagnostische Bedeutung. Deutsches Archiv für klinische Medizin, Bd. LXII, S. 255, 1899.

<sup>2)</sup> Adolf Magnus-Levy, Über den Bence-Jonesschen Eiweißkörper. Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 200, 1900. (Enthält weitere Quellen.)

<sup>3)</sup> Felix Reach, Ein Beitrag zur Kenntnis der Bence-Jonesschen Albuminurie. Deutsches Archiv für klinische Medizin, Bd. LXXXII, S. 390, 1905.

Ferner verweisen wir auf E. Parkes Weber, R. Hutchison und J. J. R. Macleod, A Case of multiple myeloma (Myelomatosis) with Bence-Jones Proteid in the urine. Medico Chirurgical Transactions. Vol. LXXXVI, 1903 (Sep.-Abdr.).

<sup>4)</sup> l. c.

des Bence-Jonesschen Eiweißkörpers anbetrifft, so konnten wir mit Hilfe der Estermethode Glycocoll, Alanin, Leucin,  $\alpha$ -Pyrrolidincarbonsäure, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Phenylalanin nachweisen. Ferner wurde der Tyrosingehalt festgestellt, und außerdem die «Diaminosäuren» Lysin, Arginin und Histidin nachgewiesen. Der Bence-Jonessche Eiweißkörper zeigt somit qualitativ genau dieselbe Zusammensetzung, wie die übrigen bis jetzt untersuchten Eiweißarten. Aus den Mengenverhältnissen der einzelnen Aminosäuren möchten wir keinen Schluß auf seine Herkunft ziehen, denn einesteils sind die Zahlen selbstverständlich keine absoluten, anderenteils wird der Vergleich mit der Zusammensetzung der bis jetzt untersuchten Eiweißkörper des tierischen Organismus dadurch etwas unsicher, daß bei der Ausführung der Methodik eine wesentliche Abänderung vorgenommen worden ist. Immerhin verdient hervorgehoben zu werden, daß die gefundenen Zahlenwerte denen des Serunglobulins<sup>1)</sup> und des Serumalbumins<sup>2)</sup> sehr nahe stehen. Besonders der relativ recht hohe Gehalt an Tyrosin scheint uns nach den Erfahrungen über die Verdauung der Eiweißkörper<sup>3)</sup> gegen die Annahme zu sprechen, daß ein irgendwie tieferes Eiweißabbauprodukt vorliegt, es scheint unsere Untersuchung vielmehr dafür zu sprechen, daß das Bence-Jonessche Eiweiß ein wirklicher «Eiweißkörper» ist. Wir müssen allerdings die Frage vollständig offen lassen, ob der Bence-Jonessche Eiweißkörper ein «einheitliches» Produkt oder nicht vielmehr ein Gemisch darstellt.

Der zu den vorliegenden Untersuchungen dienende Bence-Jonessche Eiweißkörper stammte von dem folgenden Patienten, dessen Krankengeschichte hier kurz angeführt sei.

D. K. 55 Jahre alt, Tagelöhner, aufgenommen am 29. November 1900; gest. am 16. März 1901. Aus gesunder Familie. Von früheren Krankheiten wird Scharlach angegeben. Außer-

<sup>1)</sup> Emil Abderhalden, Abbau und Aufbau der Eiweißkörper im tierischen Organismus. Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 17, 1905.

<sup>2)</sup> Emil Abderhalden, Hydrolyse des kristallisierten Serumalbumins aus Pferdeblut. Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 495, 1903.

<sup>3)</sup> Vergl. Emil Abderhalden und Béla Reinbold, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 284, 1905.

dem will der Patient im Alter von 17 Jahren eine mit hochgradiger Schwellung des ganzen Körpers einhergehende Krankheit von 16 Wochen Dauer gehabt haben. Dieses Leiden hat sich 4 oder 5 mal wiederholt, zum letztenmal vor zehn Jahren (Nephritis?).

Jetzt klagt der Patient seit 4—5 Monaten über Atemnot, angeblich im Anschluß an das Heben einer schweren Last, worauf er zunächst eine Viertelstunde vollkommen bewußtlos gewesen sein will. Ein solcher Anfall von Bewußtlosigkeit wiederholte sich vor 8 Tagen, dabei starke Schmerzen in der Nierengegend. Ferner schlechter Appetit und vermehrter Durst.

Status: Mittelkräftiger Körperbau, reduzierter Ernährungszustand. Anämisches Aussehen. Rippen und Sternum gegen Druck empfindlich. Auf der 6. und 7. Rippe in der vorderen Axillarlinie eine beim Druck schmerzhaft linsengroße Erhabenheit. Lungenbefund bis auf vereinzelte Ronchi normal. Herz: an der Spitze ein lautes systolisches Geräusch. Zweiter Pulmonalton verstärkt. Grenzen der absoluten Dämpfung normal. Puls mäßig gespannt, regelmäßig. Digestionstraktus, Leber, Milz und Nervensystem ohne besonderen Befund. Urin gibt starke Eiweiß- und Biuretreaktion, letztere mit ausgesprochen roter Farbe. Es fällt ferner auf, daß sich beim Erwärmen schon bei einer Temperatur zwischen 40 und 50° ein Niederschlag bildet, der sich beim weiteren Erhitzen spurlos wieder auflöst, ferner löst sich der in der Kälte entstehende Salpetersäureniederschlag beim Erhitzen wieder auf. Reaktion des Harnes sauer, im Sediment zahlreiche epitheliale, granulierte und hyaline Zylinder.

5. XII. 50—55% Hämoglobin nach Fleischl, 3500000 Erythrocythen, 11700 weiße Blutkörperchen und zwar 66,6% Leukocyten und 34,4% Lymphocyten. Pathologische Formelemente fehlen.

Zustand des Patienten hat sich gebessert, Atemnot geringer, ebenso Druckempfindlichkeit der Rippen.

Im weiteren Verlauf war das Befinden des Patienten sehr wechselnd. Am 20. XII fand man eine Spontanfraktur der linken Clavicula, nachdem vorher Schmerzen und eine Auftreibung der entsprechenden Stelle bemerkbar gewesen waren.

Seit Anfang Januar bildete sich allmählich eine Kyphose der unteren Brustwirbelsäule aus.

5. I. Blutuntersuchung: Hämoglobin 50—60% nach Fleischl, rote Blutkörperchen 4020000, weiße 15200, darunter Leukocyten 67%, große Lymphocyten 12%, kleine Lymphocyten 1,5%, eosinophile 1%, große mononucleäre 18,5%.

10. II. Viele Rippen fühlen sich jetzt uneben an, auch auf dem Sternum zwei deutliche linsengroße Protuberanzen. Die 4. linke Rippe fraktioniert. Die Kyphose wird im weiteren Verlauf so stark, daß sich die 12. Rippen innerhalb der Darmbeinschaukeln finden. Die Abmagerung nimmt sehr erheblich zu. Trotz anfangs guter Nahrungsaufnahme ist das Gewicht von anfangs 53 kg bis zum Exitus letalis, der am 16. III. erfolgt, auf 33,2 kg gesunken.

Klinische Diagnose. Sarcomatosis ossium. Nephritis cum Albumosuria (Bence-Jonesscher Eiweißkörper). Fractura claviculae sinistr. et costar. spontanea. Pneumonia incipiens lob. infer. sinistr.

Anatomische Diagnose. Sarcomatosis ossium<sup>1)</sup> columnae vertebralis et thoracis. Infractioes et fractur. spontan. multiplices. Nephritis parenchymatosa chronica. Anaemia universalis. Haemochromatosis hepatis et lienis. Cystitis catarhalis. Atelectasis lob. infer. pulmon. Pleuritis fibrinosa sinistra. Transsudatio haemorrhagica pleurar. et pericardii.

#### Untersuchung des Urins.

Der Tagesharn war stets ziemlich stark sauer (Säuregrad mit Phenolphthalein bestimmt 20,5), seltener schwach sauer oder neutral. Die Menge schwankte zwischen 1000 und 1800 ccm, das spezifische Gewicht entsprechend zwischen 1009 und 1018. Der Eiweißgehalt war ziemlich reichlich. Im speziellen wurden gefunden

am	7. I.	Menge	1400 ccm,	spez. Gew.	1010 g,	Eiweißgehalt	7 ‰
	8. II.	»	1400	»	»	»	8 ‰
	9. II.	»	1150	»	»	»	8 ‰
	10. II.	»	1340	»	»	»	10 ‰
	11. II.	»	1080	»	»	»	12 ‰

<sup>1)</sup> Anatomisch ist der Fall in der Dissertation von C. Bechtold. Über das multiple Myelom. Würzburg 1902, beschrieben.

Globulitenartige Ausscheidungen des Eiweißkörpers im Sediment wurden vermißt.

Verhalten beim Erhitzen. Es ließ sich das immer für den Bence-Jonesschen Eiweißkörper als charakteristisch beschriebene Verhalten — Bildung eines Niederschlages bei niedriger Temperatur, der sich bei höherer Temperatur wieder auflöst — konstatieren. Im einzelnen wechselte die entsprechende Temperatur sehr nach der Reaktion des Urins. So fanden wir, daß bei einem neutral reagierenden Harn bei 55—60° eine leichte, schleierartige Trübung und bei 60° ein dicker flockiger Niederschlag auftrat. Säuerte man denselben Urin bis zur leicht sauren Reaktion an, so erfolgte die Trübung bei 48—49° und die Ausfällung bei 52—53°. Bei noch stärkerem Säuregehalt erfolgte die erste Ausfällung bei 42° und die dicke Flockenbildung wenig später. Bei Siedetemperatur löste sich der Niederschlag wieder auf, um beim Abkühlen von neuem zu erscheinen, und zwar war die Aufhellung beim Sieden an einigen Tagen vollkommen, an anderen blieb eine Trübung bestehen. Ebenso gelang es, bei Temperaturen zwischen 40 und 55° bei saurer Reaktion, bei Temperaturen von 60—65° bei neutraler oder ganz schwach saurer Reaktion an einigen Tagen das Eiweiß vollkommen auszufällen, an anderen Tagen blieb noch Eiweiß im Filtrat nachweisbar.<sup>1)</sup> Die Ausscheidung gelingt besonders gut, wenn man den Harn vorher mit der gleichen Menge destillierten Wassers verdünnt oder mehrere Male auf die entsprechende Temperatur erwärmt.

Verhalten gegen Säuren. Durch Verdünnen des Harns und Zusatz von Essigsäure ließ sich an einigen Tagen eine mäßige Trübung erhalten. Salpetersäure bewirkte in der Kälte einen dichten Niederschlag, der sich im Überschuß nicht löste, jedoch beim Erhitzen an einigen Tagen ganz, an andern teilweise in Lösung ging, unter Auftreten der Xanthoproteinreaktion.

<sup>1)</sup> Dieses Verhalten läßt nicht ohne weiteres den Schluß zu, daß ein Gemisch von Eiweißkörpern vorlag. Die wechselnde Zusammensetzung des Harnes kann sehr wohl ein solches Verhalten hervorrufen. Alle entscheidenden Reaktionen mit dem Bence-Jonesschen Eiweiß müssen deshalb an isolierten Produkte ausgeführt werden.

Ebenso entstand durch Salzsäure und Schwefelsäure in der Kälte ein Niederschlag, der sich beim Erhitzen stets vollkommen löste: der Schwefelsäureniederschlag kehrte beim Erkalten überhaupt nicht wieder, der Salzsäureniederschlag sehr langsam und unvollkommen. Der Trichloressigsäureniederschlag löste sich beim Erhitzen nur zum geringsten Teil, das meiste war koaguliert: genau so verhielt sich die Pikrinsäurefällung.

Mit Essigsäure und Ferrocyankalium entstand ein Niederschlag, der sich beim Erhitzen, wenn genug Essigsäure zugesetzt war, wieder löste und beim Erkalten von neuem auftrat.

Durch Zusatz eines gleichen Volumens konzentrierter Kochsalzlösung und Ansäuern mit Essigsäure trat vollkommene Ausfällung ein, der Niederschlag löste sich beim Erhitzen nicht. Erst bei reichlichem Essigsäurezusatz verschwand der Niederschlag in der Hitze.

Alkohol. Durch Alkohol erfolgte Ausfällung. Wurde der Alkoholniederschlag sofort abzentrifugiert, so gelang seine Auflösung wieder. Bei längerem Verweilen unter Alkohol wurde er jedoch vollkommen unlöslich.

Durch Kochsalz oder Magnesiumsulfat entstand bei Sättigung im nativen Harn nur eine geringe Trübung, im neutralisierten Harn blieb auch diese aus. Durch Ammonsulfat wurde der Eiweißkörper im nativen und im neutralisierten Harn vollkommen ausgefällt. Die Grenzen lagen im neutralisierten Harn zwischen 42 und 58% Sättigung. An einigen Tagen war daneben noch ein später bis 72% Sättigung ausfallender Eiweißkörper zu konstatieren.

Die Biuretreaktion zeigte rotviolette Färbung.

Beim Dialysieren passierte der Eiweißkörper die Membran nicht. Im salzfreien Wasser blieb er in Lösung.

Spritzt man Kaninchen 50—100 ccm eines 10% Eiweiß enthaltenden Harnes oder eine entsprechende Menge des ausgefallten und wieder aufgelösten Eiweißkörpers ein, so findet man in dem Kaninchenurin weder Eiweiß noch Albumosen bzw. Peptone. Dieses Resultat spricht dafür, daß es sich bei dem Bence-Jones um ein wenig abgebautes Eiweiß handelt: denn es werden bekanntlich injizierte Albumosen und Peptone

von Kaninchen mit dem Harn ausgeschieden, während von nativem Eiweiß nur Eiklar im Harn wieder erscheint, Serum-eiweiß aber in ziemlich großer Menge injiziert werden kann, ohne daß es die Nieren passiert. Die Tiere bekommen jedoch regelmäßig Temperatursteigerungen; so stieg bei einem Kaninchen die Temperatur 6 Stunden nach der Injektion von 50 ccm Harn auf 39,9 an, während man an den vorhergehenden 3 Tagen bei 3 stündigen Messungen nur 38,0 bis 38,4 konstatieren konnte. Nach mehreren Injektionen bilden die Tiere Präcipitine, welche außer auf den Bence-Jonesschen Eiweißkörper auch auf menschliches Serum und die daraus dargestellten Eiweißfraktionen (Euglobulin, Pseudoglobulin, Albumin) reagieren, während eine Reaktion mit tierischem Serum bzw. dessen Eiweißkörpern ausbleibt bzw. entsprechend schwächer erfolgt als mit menschlichem Eiweiß. Da man dieses Resultat auch mit einem Harn erhält, der nur den Bence-Jonesschen Eiweißkörper und kein Serumeiweiß daneben enthält, so spricht das Verhalten gegen die Auffassung von Magnus-Levy, daß der Bence-Jonessche Eiweißkörper direkt aus dem Nahrungseiweiß entsteht. Letzteres muß vielmehr schon vom menschlichen Körper assimiliert gewesen sein, bevor der Bence-Jones daraus hervorgeht, wie der eine von uns schon hervor-gehoben hat.<sup>1)</sup>

### Hydrolyse.

Das zur Hydrolyse verwendete Eiweiß wurde aus dem durch Chloroform konservierten Harn durch Ammonsulfat ausgefällt, die Ausfällung zwecks Reinigung noch zweimal wiederholt, der letzte Niederschlag sorgfältig abgepreßt, wieder in Wasser aufgenommen und nun dialysiert. Hierauf wurde die Lösung bei 35—40° auf ein kleineres Volumen eingedampft, mit Alkohol ausgefällt der Niederschlag mit Alkohol und Äther ausgewaschen und zur Hydrolyse verwendet.

75 g Eiweiß (Wassergehalt 10%, Aschegehalt 0,95%)

<sup>1)</sup> Rostoski, Verhdl. der Physikalisch-Medizin. Gesellschaft zu Würzburg, 1902. Luigi Sacconaghi, Zeitschrift für klinische Medizin, Bd. LI.

wurden mit 500 ccm 25%iger Schwefelsäure 14 Stunden am Rückflußkühler gekocht, die Lösung hierauf mit Wasser bis zu einem Gehalt von 5% an Schwefelsäure verdünnt und nun mit Phosphorwolframsäure gefällt. Das Filtrat der relativ reichlichen Fällung wurde mit Baryt von der überschüssigen Phosphorwolframsäure befreit, dann der überschüssige Baryt quantitativ mit Schwefelsäure entfernt, und nun die Lösung bis zur beginnenden Kristallisation eingeeengt. Vom Ausgeschiedenen wurde abfiltriert und solange weiter eingeeengt, bis die Hauptmasse des Tyrosins abgeschieden war, und die Mutterlauge nur noch eine geringe Reaktion mit Millons Reagens gab. Das so erhaltene Rohtyrosin (1,3 g) wurde aus heißem Wasser unter Anwendung von Tierkohle umkristallisiert. Die Menge des reinen Tyrosins betrug 1,1 g.

0.1559 g Substanz gaben 0.3405 g CO<sub>2</sub> und 0.0840 g H<sub>2</sub>O

Berechnet für C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>:

59.66% C u. 6.07% H.

Gefunden:

59.57% C u. 5.98% H.

Die Mutterlauge des Tyrosins wurde stark eingeeengt, mit Tierkohle möglichst entfärbt, dann gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. Nach mehrtägigem Stehen schieden sich Kristalle von Glutaminsäurechlorhydrat in reichlicher Menge ab. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser unter Einleiten von gasförmiger Salzsäure wurden, auf reine Glutaminsäure berechnet, 4.0 g erhalten. Aus dem Glutaminsäurechlorhydrat wurde durch Kochen mit gelbem Bleioxyd freie Glutaminsäure dargestellt.

0.2031 g Substanz gaben 0.3040 g CO<sub>2</sub> und 0.1118 g H<sub>2</sub>O

Berechnet für C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub>:

40.81% C u. 6.12% H.

Gefunden:

40.82% C u. 6.12% H.

Die Mutterlauge vom Glutaminsäurechlorhydrat wurde im Vacuum völlig zur Trockene verdampft, und nun der Rückstand, wie bekannt, mit Alkohol übergossen und trockenes Salzsäuregas bis zur Sättigung eingeleitet. Die Veresterung wurde noch zweimal wiederholt.

Die Gewinnung der freien Ester erfolgte hier in einer von der bisher üblichen Methode abweichenden Art, und zwar in

Anlehnung an die von Emil Fischer und Umetaro Suzuki<sup>1)</sup> angewandte Methode der Darstellung der freien Diaminosäure-ester. Die salzsaure, alkoholische Lösung der Hydrochlorate der Ester wurde bei vermindertem Druck und einer 40° nicht übersteigenden Temperatur möglichst stark eingedampft, um die freie Salzsäure möglichst vollständig zu entfernen. Der Rückstand, der die Hydrochlorate der Ester enthielt, wurde nun in wenig Äthylalkohol völlig aufgelöst, die Lösung in einen Meßkolben von 250 ccm gebracht und bis zur Marke genau mit Äthylalkohol aufgefüllt. Nun wurde in einem aliquoten Teil (5 ccm) der Salzsäuregehalt bestimmt, und dann durch Zusatz der berechneten Menge einer alkoholischen Lösung von Natrium die Ester in Freiheit gesetzt. Vor dem Zusatz des Natriumäthylats war die Lösung mit Äther überschichtet und in Eis gestellt worden. Durch weiteren Zusatz von Äther wurde die Hauptmenge des gebildeten Kochsalzes gefällt, vom Ausgeschiedenen abfiltriert, und nun die ätherisch-alkoholische Lösung durch Schütteln mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet. Der Äther wurde dann abdestilliert, und der verbleibende Rückstand, wie üblich, der fraktionierten Destillation unterworfen. Die erste Fraktion bis 60° und 15 mm Druck enthielt hauptsächlich Alkohol. Sie wurde mit konzentrierter Salzsäure versetzt, auf dem Wasserbad zur Trockene verdampft, und der Rückstand mit absolutem Alkohol übergossen und trockenes Salzsäuregas eingeleitet bis zur Sättigung. Nach einigem Stehen in einer Kältemischung und Impfen eines Kriställchens von Glycocollesterchlorhydrat erfolgte bald reichliche kristallinische Abscheidung. Die Ausbeute, auf Glycocoll berechnet, betrug 0,7 g. Die Mutterlauge vom Glycocollesterchlorhydrat wurde mit gelbem Bleioxyd von der Salzsäure befreit. Es wurden 1,5 g einer süß schmeckenden, bei 295° (korr.) schmelzenden Verbindung isoliert. Es lag Alanin vor:

<sup>1)</sup> Emil Fischer und Umetaro Suzuki, Polypeptide der Diaminosäuren. Sitzungsberichte der Akademie zu Berlin, 1904, 52.

Vgl. auch Emil Fischer und Emil Abderhalden, Das Verhalten einiger Polypeptide gegen Pankreassaft. Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 52, 1905.

0.1957 g Substanz gaben 0,2889 g  $\text{CO}_2$  und 0.1363 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet für  $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$ :

Gefunden:

40.45% C u. 7.87% H.

40.26% C u. 7.79% H.

Die zweite Fraktion <sup>1)</sup> (von 60—105° des Ölbadcs, 0,4 mm Druck) wurde, wie üblich, durch Kochen mit der fünffachen Menge Wasser verseift und dann zur Trockene eingengt, mit absolutem Alkohol ausgekocht, und dann durch fraktionierte Kristallisation des Ungelösten aus Wasser die einzelnen Aminosäuren abgetrennt. Erhalten wurden 7,1 g Leucin und 1,5 g Alanin. Aus den Mutterlaugen des Alanins konnten noch 0,4 g Glycocoll als Esterchlorhydrat abgeschieden werden.

Das isolierte Leucin zersetzte sich gegen 297° (korr.).

0.1584 g Substanz gaben 0,3194 g  $\text{CO}_2$  und 0.1395 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet für  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$ :

Gefunden:

54.96% C u. 9.92% H.

54.98% C u. 9.85% H.

Das isolierte Glycocollesterchlorhydrat gab folgende Zahlen:

0.1979 g Substanz gaben 0,2486 g  $\text{CO}_2$  und 0.1295 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet für  $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}$ :

Gefunden:

34.43% C u. 7.18% H.

34.28% C u. 7.27% H.

Der in absolutem Alkohol lösliche Teil dieser Fraktion wurde im Vacuum zur Trockene verdampft, der Rückstand nochmals in absolutem Alkohol aufgenommen, vom Ungelösten abfiltriert und wiederum zur Trockene verdampft. Nun wurde der Rückstand in Wasser gelöst, mit überschüssigem Kupferoxyd gekocht, vom ungelöst gebliebenen Kupferoxyd abfiltriert, und die tiefblaue Lösung zur Trockene verdampft. Aus dem Rückstand wurde durch Auskochen mit absolutem Alkohol das aktive vom racemischen Prolin getrennt. Letzteres wurde aus Wasser umkristallisiert.

0.2558 g lufttrockenes Salz verloren bei 115° 0.0286 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet für  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{N}_2\text{Cu} + 2\text{H}_2\text{O}$ :

Gefunden:

10.99%  $\text{H}_2\text{O}$ .

11.18%  $\text{H}_2\text{O}$ .

0.1401 g lufttrockenes Prolinkupfer gaben 0.0342 g  $\text{CuO} = 0.0273$  g Cu

Berechnet für  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{N}_2\text{Cu} + 2\text{H}_2\text{O}$ :

Gefunden:

19.36% Cu.

19.48% Cu.

Ausbeute an Prolin: 1.3 g.

<sup>1)</sup> Bei der Verarbeitung größerer Mengen von Eiweiß dürfte es sich empfehlen, nach dem Abdestillieren des Äthers und Alkohols den Rückstand nochmals mit Äther gründlich auszuschütteln, dann den Äther abzudestillieren und nun mit der fraktionierten Destillation der Ester weiterzufahren.

Die dritte Fraktion (105—200° des Ölbad, 0,4 mm Druck) wurde in der oft geschilderten Weise verarbeitet. Gewonnen wurden 1,0 g Phenylalanin und 3 g Asparaginsäure. Glutaminsäure ließ sich keine mehr nachweisen.

0,1322 g Substanz gaben 0,3173 g CO<sub>2</sub> und 0,0789 g H<sub>2</sub>O

Berechnet für C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> :	Gefunden:
65,45% C u. 6,66% H.	65,46% C u. 6,63% H.

0,1645 g Substanz gaben 0,0806 g H<sub>2</sub>O und 0,2184 g CO<sub>2</sub>

Berechnet für C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub> :	Gefunden:
36,09% C u. 5,26% H.	36,21% C u. 5,44% H.

Auf 100 g trockenes, aschefreies Eiweiß berechnen sich somit:

Glycocoll	1,7 g
Alanin	4,5 »
Leucin	10,6 »
Prolin	1,9 »
Phenylalanin	1,5 »
Glutaminsäure	6,0 »
Asparaginsäure	4,5 »
Tyrosin	1,7 »

Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde mit Baryt zerlegt, der überschüssige Baryt aus dem Filtrat des phosphorwolframsauren Baryums mit Schwefelsäure quantitativ gefällt und hierauf in der bekannten Weise auf die einzelnen «Diaminosäuren» untersucht. Qualitativ konnten Lysin (als Pikrat), Arginin (als Nitrat) und Histidin (als Dichlorid) nachgewiesen werden.

Anmerkung: Alle in dieser Arbeit angeführten Analysen, sowie die meisten derjenigen der jüngst publizierten Abhandlungen sind im hiesigen Institute von Präparator Wetzell mit Hilfe des von Herrn Professor Fritz Pregl<sup>1)</sup> konstruierten automatischen Verbrennungsofens mit einer Geschwindigkeit von 100 verbrannt worden. Die Resultate waren in allen Fällen durchaus gute und zuverlässige. Wir können den Verbrennungsofen, der neben dem Umstande, daß stets zwei Analysen zugleich ausgeführt werden können, in seiner ganzen Einrichtung (beispielsweise der Möglichkeit, bei Salzen in ein und derselben Substanzmenge neben C und H noch ganz exakt die Asche zu bestimmen), noch zahlreiche weitere Vorteile bietet, warm empfehlen.

Emil Abderhalden.

<sup>1)</sup> Fritz Pregl, Eine Methode zur Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff in organischen Verbindungen. Berichte der Deutschen chem. Gesellsch., Jg. XXXVIII, S. 1435, 1905.