

don-Derivat isoliert) und die phenolische Ketosäure VII (UV-Spektrum,  $K_3[Fe(CN)_6]$ - $FeCl_3$ -Reaktion<sup>16</sup>). Nach kurzer Einwirkung von  $CH_2N_2$  gab VII den phenolischen Ketoester VIII, der nach längerem Stehen mit  $CH_2N_2$  oder bei der Behandlung mit Dimethylsulfat in den Phenoläther IX überging. Die 11-Ketogruppe von IX zeigte gegenüber Ketonreagenzien normale Reaktionsfähigkeit (krist. Oxim). Sie erlaubte dadurch die Bildung eines Thioketals (amorph) mit Äthandithiol, das nach reduktiver Entschwefelung mit Raney-Ni den Ester X lieferte (IR-Spektrum). Mit  $SOCl_2$ -Pyridin wurde aus X der ungesättigte Ester XI (IR-Spektrum) erhalten. Die selektive Absättigung der isolierten Doppelbindung in XI gelang durch Hydrierung mit Hilfe eines  $PdO$ - $BaSO_4$ -Katalysators nach KUHN und HAAS<sup>17</sup> in Eisessiglösung. Der als Hauptprodukt erhaltene Ester XII war mit 3-Methoxy-17 $\beta$ -carbomethoxy-östra-trien-(1,3,5:10) von DJERASSI und SCHOLZ<sup>18</sup> identisch (Smp., Mischsmp., Spez. Drehung, UV- und IR-Spektrum). Die 17 $\beta$ -ständige Carbomethoxygruppe von X beweist gleichzeitig die 17 $\beta$ -Stellung des ursprünglichen Butenolidrings von Ouabagenin (I)<sup>19</sup>.

Damit ist für Ouabagenin die von MANNICH und SIEWERT<sup>2</sup> seinerzeit ohne weitere Begründung vorgeschlagene Formel I endgültig bewiesen.

Einzelheiten dieser Untersuchungen werden später in den Helvetica chimica Acta publiziert werden.

Herrn Prof. T. REICHSTEIN danken wir für das grosse Interesse, das er unserer Arbeit entgegengebracht hat.

Wir danken dem «Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung» für die gewährte Unterstützung. Ferner dankt der eine von uns (G. V.) der «Hermann-Schlosser-Stiftung», Frankfurt a.M., für ein Stipendium.

CH. TAMM, G. VOLPP und  
G. BAUMGARTNER

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel, den  
2. April 1957.

### Summary

Ouabagenin (I) has been degraded stepwise to the known 3-methoxy-17 $\beta$ -carbomethoxy- $\Delta^{1,3,5:10}$ -estra-triene (XII). Thus the presence of a normal steroid skeleton and the  $\beta$ -configuration of the butenolidering at C-17 is proven. The 14 $\beta$ -configuration of the hydroxyl at C-14 was also proven. As a result of these and earlier findings, structure I can be definitely assigned to ouabagenin.

<sup>16</sup> G. M. BARTON, R. S. EVANS und J. A. F. GARDNER, Nature 170, 249 (1952).

<sup>17</sup> R. KUHN und H. J. HAAS, Angew. Chemie 67, 785 (1955).

<sup>18</sup> C. DJERASSI und C. R. SCHOLZ, J. Amer. chem. Soc. 71, 3962 (1949). – Wir danken Herrn Prof. C. DJERASSI bestens für die Überlassung einer Probe von authentischem 3-Methoxy-17 $\beta$ -carboxy-östra-trien-(1,3,5:10).

<sup>19</sup> Auch die *cis*-Stellung bzw.  $\beta$ -Konfiguration der HO-Gruppe an C-14 haben wir durch die Überführung von Tetra-O-acetyl-ouabagenin in das 1 $\beta$ ,3 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,19-Tetraacetoxy-5,14-dihydroxy-20-keto-14 $\beta$ -pregnan-21-säure-lacton (21  $\rightarrow$  14) bewiesen. (Siehe spätere Mitteilung.)

## Abhängigkeit der Antivirusswirkung bakterieller Polysaccharide von Behandlungstermin, Behandlungsdosis und Infektionsstärke

Wirkungsbereich und Wirkungsqualitäten der in unseren Laboratorien untersuchten gereinigten Polysaccharide bakteriellen Ursprungs (MEIER *et al.*<sup>1,2,7</sup>) unterscheiden sich in mancher Hinsicht von anderweitig beschriebenen Polysaccharidwirkungen. Bei dem von MEIER und NEIPP<sup>2</sup> erstmals beschriebenen günstigen Effekt der Behandlung der experimentellen Pneumokokkensepsis mit Polysacchariden liegen andere Verhältnisse vor als bei den von anderer Seite mitgeteilten Schutzwirkungen gewisser Lipopolysaccharide gegenüber Infektionen mit gram-negativen Bakterien (LANDY<sup>3</sup> ROSS<sup>4</sup>, ROWLEY<sup>5</sup>, KISER<sup>6</sup>). Für die mit einem bakteriellen Polysaccharid erzielbare Schutzwirkung an Mäusen gegen die Infektionen mit Col.-SK.-Encephalomyelitis-Virus (MEIER und KRADOLFER<sup>7</sup>) sind die Wirkungsbedingungen wiederum gänzlich verschieden von denjenigen, welche für die Befunde von HORSFALL *et al.* und GINSBERG *et al.*<sup>8</sup> zum Beispiel mit Klebsiella-Kapsel-Antigen gegenüber anderen Virusinfektionen Geltung hatten. Es erschien deshalb angezeigt, die von uns gefundene neuartige Wirkung gegenüber Virusinfektionen in ihrer besonderen Gesetzmässigkeit näher abzuklären.

Für die beschriebenen Versuche wurde folgende Technik angewendet: Der Stamm des Col.-SK.-Encephalomyelitis-Virus war dem früher verwendeten gleich<sup>7</sup>. Mäuse wurden mit 30 ID<sub>50</sub> virushaltiger Hirnsuspension intraperitoneal infiziert. Unbehandelte Kontrolltiere wiesen zu 100% innert 4–6 Tagen Paralyse einzelner Extremitäten auf und gingen innert weiteren 1–2 Tagen ein. Eine Erholung gelähmter Mäuse haben wir in diesen Versuchen nie beobachten können. Eine Lebensdauer ohne Paralyseerscheinungen von 10 Tagen wurde als Schutzeffekt, eine Verkürzung des Intervalls zwischen Infektion und Paralyse bzw. Tod um mehr als 2 Tage als Aggravationseffekt ausgelegt.

Bei den Versuchen mit Elektromelie, zu denen ein Virus-Stamm «Brovo» (4. intraplantare Mäusepassage eines spontan aufgetretenen Falles) verwendet wurde, gelangte das Virus in 2 Infektionsstärken zur Anwendung. Je 30 ID<sub>50</sub> und 1/10 dieser Dosis wurde Mäusen intraplantär in den linken Hinterfuss injiziert. Der sich entwickelnde lokale Infektionsprozess kann durch Messungen der Pfotendicke mit geringer Streuung der Werte quantitativ verfolgt werden. Zur Auswertung wurden die täglichen Querschnittswerte im Gruppendurchschnitt vom 5. bis 12. Tag post infectionem kumuliert.

Das verwendete, aus *Proteus vulgaris* gewonnene Polysaccharid-Präparat<sup>9</sup>, das wirkungsmässig dem frü-

<sup>1</sup> R. MEIER, P. A. DESAULLES und B. SCHÄR, Arch. exp. Path. Pharm. 224, 104 (1955). – R. MEIER, H. J. BEIN und R. JAQUES, Exper. 12, 235 (1956).

<sup>2</sup> R. MEIER und L. NEIPP, Schweiz. med. Wschr. 86, 249 (1956).

<sup>3</sup> M. LANDY, Fed. Proc. 15, 598 (1956).

<sup>4</sup> O. A. ROSS, N. Y. Acad. Sci. 66, 274 (1956).

<sup>5</sup> D. ROWLEY, N. Y. Acad. Sci. 66, 304 (1956).

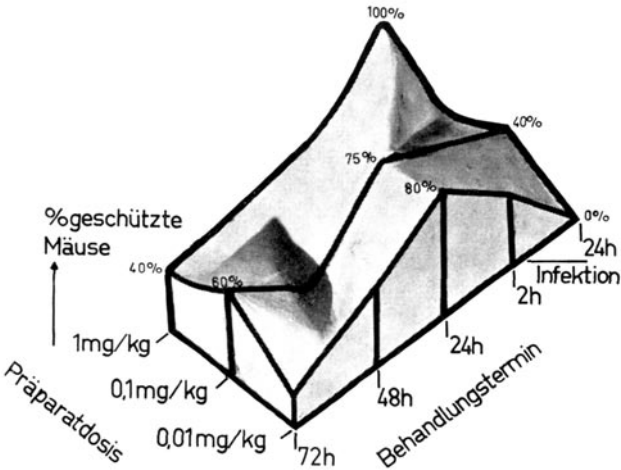
<sup>6</sup> J. S. KISER, H. LINDH und G. C. DE MELLO, N. Y. Acad. Sci. 66, 312 (1956).

<sup>7</sup> R. MEIER und F. KRADOLFER, Exper. 12, 213 (1956).

<sup>8</sup> F. L. HORSFALL und M. MCCARTHY, J. exp. Med. 85, 623 (1947). – H. S. GINSBERG und F. L. HORSFALL, J. exp. Med. 93, 161 (1951).

<sup>9</sup> Das Präparat wurde in den chemischen Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel, von Dr. F. W. KAHNT hergestellt.

her von uns<sup>7</sup> verwendeten Stoffe gleich war, wurde in feinsten wässriger Suspension Mäusen in Dosen von je 1, 0,1 und 0,01 mg/kg einmalig intravenös injiziert. Die Behandlung der Mäuse, die von demselben Stamm und derselben Lieferung und im Gewicht von 14 bis 17 g waren, erfolgte 72, 48, 24 oder 2 h vor, bzw. 24 h nach der Infektion. Zu jedem Zeitpunkt und für jede Dosis und Infektionsstärke gelangten 5–6 Mäuse zur Anwendung.



Schutzwirkung der Behandlung mit bakteriellem Polysaccharid in Abhängigkeit von Behandlungstermin und Behandlungsdosis.

**Befunde.** a) *Effekt gegenüber Col.-SK-Encephalomyelitis-Virus.* Das in der Abbildung dreidimensional dargestellte Ergebnis eines typischen Versuches mit total 90 Mäusen drückt eine durch die Behandlung der Mäuse

mit dem Polysaccharid-Präparat erzielte Schutzwirkung aus. Auffallend ist dabei die starke Abhängigkeit dieses Effektes vom Behandlungstermin und der Behandlungsdosis. An sich ist die Wirkung über einen grossen Dosenbereich von 0,01 bis 1 mg/kg vorhanden, doch besteht für die schwächste Dosis anscheinend die zeitlich engste Begrenzung für eine optimale Wirkung (24 h). Eine Steigerung der Dosis auf 0,1 mg/kg dagegen ergab eine zusätzliche Schutzwirkung bis zu 72 h Vorausbehandlung, und bei weniger als 24 h vor der Infektion erfolgten Polysaccharidgaben trat ein geringerer Wirkungsabfall auf. Ausgesprochen günstige Wirkungsbedingungen wurden bei der Anwendung von 1 mg/kg des Polysaccharids beobachtet, einer Dosis, die relativ sehr hoch ist. Hier ist bei allen gewählten Vorbehandlungsterminen eine Schutzwirkung vorhanden, und in einem Falle (2 h Vorausbehandlung) wurde ein Schutz von 100% erzielt. Die mit dieser hohen Dosis beobachtete zeitliche Verschiebung des Behandlungs-Optimums (von 24 h bis auf 2 h vor der Infektion) konnte auch in anderen Versuchen mit Col.-SK.-Virus und mit Ektromelie beobachtet werden. Der auffallende Abfall der Wirkung bei der 48-h-Vorausbehandlung mit 0,1 mg/kg des Präparates pflegte ebenfalls in anderen Versuchen vorzukommen, besonders deutlich dann, wenn einzelne der Kontrolltiere überlebten. Diese Besonderheit kann bei der quantitativ verfolgbaren, peripheren Ektromelieinfektion noch deutlicher erfasst werden und entspricht, wie im folgenden gezeigt wird, einem Aggravationseffekt der Polysaccharidbehandlung.

b) *Effekt bei der Ektromelie-Infektion.* Die Tabelle gibt das Ergebnis eines typischen Versuches wieder, bei dem wiederum Behandlungstermin, Behandlungsdosis und zusätzlich die Infektionsstärke variiert wurden. Es fällt auf, dass bei den mit 30 ID<sub>50</sub> infizierten

Hemmung (–) und Förderung (+) der Ektromelieinfektion in Mauspfoten in Abhängigkeit der Polysaccharid-Dosis des Behandlungstermins und der Infektionsstärke.

Dosis des Polysaccharids	Infektionsdosis	Zeitpunkt der Applikation des Polysaccharids Stunden vor und nach der Infektion				
		72 h vor	48 h vor	24 h vor	2 h vor	24 h nach
1 mg/kg	10 <sup>–5</sup> (30 ID <sub>50</sub> )	64 + 57%	41 – 20%	44 – 10%	54 + 23%	25 – 73%
0,1 mg/kg		34 – 43%	30 – 43%	67 + 66%	17 – 100%	33 – 46%
0,01 mg/kg		38 – 30%	31 – 57%	25 – 73%	46 – 3%	51 + 13%
1 mg/kg	10 <sup>–6</sup>	17 – 100%	22 – 17%	32 + 150%	26 + 50%	25 + 33%
0,1 mg/kg		17 – 100%	27 + 67%	24 + 17%	28 + 83%	38 + 25%
0,01 mg/kg		23 ± 0%	17 – 100%	24 – 17%	35 + 200%	26 + 50%

Die Zahlen oben links im Feld geben die Querschnittswerte der Pfortendicke an. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Differenz zwischen Normalpfortendicke (17 mm<sup>2</sup>) und Pfortendicke der unbehandelten Infektionskontrollen (47 mm<sup>2</sup> für Infektionsstärke 10<sup>–5</sup> und 23 mm<sup>2</sup> für Infektionsstärke 10<sup>–6</sup>).

Gruppen der Schutzeffekt bei der Ektromelie und der SK.-Virusinfektion unter gleichen Bedingungen auftrat. Auch der Wirkungsabfall findet seine Entsprechung bei der Ektromelie nach Behandlungsdosis (0,1 mg/kg) und Vorbehandlungstermin (48 h). Hier und besonders häufig bei der geringeren Infektionsdosis liegt ein Wirkungsumschlag vor, indem die Schwellung der Pfoten früher als bei den unbehandelten Kontrolltieren auftrat und einen höheren Grad erreichte. Die stärksten Aggravationseffekte traten bei der stärkeren Infektion mit steigender Behandlungsdosis zu immer früheren Behandlungsterminen auf und verhielten sich somit genau umgekehrt wie die Maxima des Schutzeffektes (vgl. entsprechend eingerahmte Werte in der Tabelle).

Wesentliches Merkmal dieser Befunde ist die Periodizität von Schutzwirkung und Aggravationseffekt in Abhängigkeit von der Behandlungsart. Es ist nahelegend anzunehmen, dass die Hemmung und Förderung der beiden artifiziiellen Virusinfektionen in einem bestimmten Zusammenhang stehen mit einem zeitlichen Aufeinandertreffen bestimmter Infektionsstadien und gewissen Phasen einer Resistenzschwankung. Diesen durch die Behandlung mit dem Polysaccharid geschaffenen Wirkungsbedingungen unterliegen zwei in ihrer systematischen Zugehörigkeit weit auseinanderliegende Virusarten wie das neurotrope Virus der Col.-SK.-Encephalomyelitis und das pantrope Ektromelievirus in weitgehend ähnlicher Weise. Ob noch andere Virusinfektionen in dieser Beziehung gleich reagieren, ist durch weitere Versuche zu zeigen. Die hier mitgeteilten Befunde lassen erkennen, dass die in der Maus durch das von uns verwendete Polysaccharid-Präparat ausgelösten Reaktionen zeitlich, quantitativ und qualitativ von ganz bestimmtem Charakter sind und dass es möglich sein dürfte, eventuell unter Verwendung weiterer Virusarten oder bakterieller Infektionen, die Bedingungen der therapeutischen Wirkung solcher Stoffe genauer zu charakterisieren.

F. KRADOLFER, R. WYLER und R. MEIER

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel, den 21. Februar 1957.

#### Summary

The paper analyses the protective or aggravating effect of a purified bacterial polysaccharide in Col.-SK.-Encephalomyelitis and infectious ectromelia in mice, as a function of the method of treatment. Both infections are influenced in a largely similar manner with a typical pattern of variation in the host resistance optimal effects depending on characteristic dose/time relations.

### Observations on the Alleged Occurrence of Vitamin A in Baker's Yeast

The claim by ERNSTER, ZETTERSTRÖM, and LINDBERG<sup>1</sup> that vitamin A occurs in respiring baker's yeast has recently been refuted<sup>2</sup>. We had also repeated the experiment of ERNSTER *et al.* and had been unable to demonstrate the presence of vitamin A. The results obtained were similar to those of HEATON, LOWE, and MORTON<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> L. ERNSTER, R. ZETTERSTRÖM, and O. LINDBERG, *Exp. Cell. Res.* 1, 494 (1950).

<sup>2</sup> F. W. HEATON, J. S. LOWE, and R. A. MORTON, *J. chem. Soc.* 1956, 4094.

The aqueous extract of the yeast showed a maximum absorption at a wavelength of 260 m $\mu$  but no maximum in the 320–330 m $\mu$  region was found. The lipid extract (in ether) showed maxima at 231, 258, 270, and 282 m $\mu$  with inflexions at 295 and 325 m $\mu$ . Thus the predominant chromogenic material in the lipid extract appears to be ergosterol as already suggested<sup>2</sup>. Negative results for vitamin A were obtained when the SbCl<sub>3</sub> colour reaction was used. We found however, that on testing the lipid extract with SbCl<sub>3</sub> a red colour ( $\lambda_{\max}$  565 m $\mu$ ) was obtained immediately on mixing; the colour then changed slowly to give a stable greenish-blue with a maximum at 700 m $\mu$ . This blue colour could not be due to carotenoids as there was no absorption in the visible range in the original solution. It seems likely that this result could explain the observations of ERNSTER *et al.*<sup>1</sup> who based their detection and estimation of vitamin A on a blue colour which, it now seems, was not due to vitamin A.

E. R. REDFEARN

Department of Biochemistry, The Queen's University, Belfast (N. Ireland), January 11, 1957.

#### Résumé

Traité au SbCl<sub>3</sub>, l'extrait de lipide de levure de boulangerie prend en aérobiose une couleur bleue. Ce résultat n'est pas dû à l'action de la vitamine A ou des caroténoïdes.

### Das Verhältnis von Chlorophyll a/b bei vollgedüngten und stickstoffmangelnden Pflanzen

Es hat sich gezeigt, dass ein Mangel an dem einen oder anderen Grundstoff sich nicht nur in deutlich sichtbaren Mangelsymptomen zeigt, sondern dass auch die chemische Zusammensetzung der vollgedüngten Pflanzen im Vergleich zu Mangelpflanzen eine andere ist (RICHARDS<sup>1</sup>, STEWARD und THOMPSON<sup>2</sup>). Da sich nun Stickstoffmangel unter anderem in geringerer Chlorophyllbildung pro Blattflächeneinheit und einer mehr gelblichen Farbe zeigt, und da Chlorophyll b mehr gelblich ist als Chlorophyll a, lag die Annahme nahe, dass das Verhältnis Chlorophyll a:b bei Mangelpflanzen von dem bei vollgedüngten Pflanzen abweichen würde. Um diese Frage zu lösen, wurden Gerstenblätter von vollgedüngten und von stickstoffmangelnden Pflanzen untersucht.

**Methodisches.** Die zu den Versuchen benutzten Gerstenpflanzen stammten vom Versuchshof für Pflanzenkultur Virumgaard, Lyngby, 12 km nördlich von Kopenhagen gelegen. Das Versuchsareal, auf dem die stickstoffmangelnden Pflanzen wuchsen, ist seit 1943 nur mit Kunstdünger und zwar mit 200 kg Superphosphat mit 7,9% P und 240 kg KCl mit 41,5% K jährlich pro ha gedüngt worden. Das Areal der vollgedüngten Pflanzen hat jährlich 5000 kg Stalldung, 3000 kg Jauche, 100 kg Superphosphat, 150 kg KCl und 230 kg Kalksalpeter pro ha bekommen. Die benutzte Gerstensorte war *Hordeum distichum nutans forma Ymer*. Sie wurde am 21. April 1956 ausgesät und Blätter davon im Juni für die Versuche – immer das dritte Blatt von oben – ausgenommen. 0,8 g Frischgewicht Blattfläche wurde abgewogen,

<sup>1</sup> F. RICHARDS, 8<sup>e</sup> Congr. Bot. Paris, Sect. 11, 101 (1954).

<sup>2</sup> F. STEWARD und J. THOMPSON, in: H. NEURATH und K. BAILEY, *The Proteins*, vol. 2, part A (New York 1954), p. 513.