

## Zusammenfassung.

Ausgehend von 3,3-Dimethyl-hexen-(1)-on-(5) wurde durch Kondensation mit Äthoxy-acetylen 3,3,5-Trimethyl-heptadien-(1,5)-säure-(7)-äthylester und durch Reduktion desselben mit  $\text{LiAlH}_4$  3,3,5-Trimethyl-heptadien-(1,5)-ol-(7) dargestellt.

Durch Erhitzen liessen sich 3,3,5-Trimethyl-heptadien-(1,5)-säure-(7)-äthylester in Lavandulylsäure-ester und 3,3,5-Trimethyl-heptadien-(1,5)-ol-(7) in Lavandulol umlagern.

Organisch-chemisches Laboratorium  
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

244. Studien über „synthetische“ *Wassermann-Antigene*

von Th. Bersin und R. Gebhard.

(7. VIII. 51.)

Das zur Lues-Diagnose verwendete Antigen (*Wassermann-Antigen* = WA) kann mittels verschiedener Verfahren, wie z. B. Alkoholextraktion aus Organen, wie Herz, syphil. Fötalleber usw., extrahiert werden (*Weil*<sup>1</sup>). Es liegt in diesen Organen augenscheinlich in einem grösseren Molekellkomplex vor und gewinnt seine spezifischen Eigenchaften — nämlich den *Wassermann-Antikörper* zu binden — erst nach der Freilegung aus dem Komplex (*Furth & Kabat*<sup>2</sup>). Andererseits hat Miss *Pangborn*<sup>3</sup> gezeigt, dass zum spezifischen Nachweis der Lues eine geeignete Kombination von Lecithin, Cholesterin und Cardiolipin (wie das von ihr hochgereinigt dargestellte natürliche WA genannt wurde) notwendig ist, und dass keine der drei Substanzen ohne die anderen wirksam ist, wie früher behauptet wurde (*Weil*<sup>1</sup>).

Das in einer Ausbeute von 0,04% aus frischem feuchtem Rinderherz gewonnenen Cardiolipin ist eine N-freie, mit Fettsäuren veresterte Polysaccharidphosphorsäure, die eine Jodzahl von 118 zeigt und optisch aktiv ist ( $[\alpha_D]$  in Alkohol + 7,0<sup>0</sup><sup>4</sup>). Cardiolipin ist ferner hydrierbar, leicht oxydierbar, in Wasser leicht dispergierbar zu einer trüben viscosen Flüssigkeit und gut löslich in Äther, Chloroform, Benzol, mässig in Methanol und absolutem Äthanol, wenig löslich in Aceton. Eigene Versuche ergaben einen Gehalt von 3,37% P.

Es wurde versucht auf synthetischem Wege ein mit Fettsäuren und Phosphorsäure verestertes Polysaccharid darzustellen, welches mit Lecithin und Cholesterin zu einem halthaberen Nebenvalenz-Sol<sup>5</sup>) aufgebaut werden könnte. Dieses Sol sollte dann mit dem *Wassermann-Antikörper* zusammentreten, wobei augenscheinlich ein gegen Elektrolyte ausserordentlich sensibilisiertes Koazervat (*Eagle*<sup>6</sup>) gebildet wird, das Komplement

<sup>1</sup>) *L. Weil*, Bacteriol. Rev. **5**, 293 (1941).

<sup>2</sup>) *J. Furth & E. A. Kabat*, J. exp. Med. **74**, 247 (1941).

<sup>3</sup>) *M. C. Pangborn*, J. Biol. Chem. **143**, 247 (1942); Chem. Abstr. **43**, 1321 (1949); vgl. *M. Faure & M. J. Coulon*, Bl. Soc. chim. biol. **30**, 533 (1948); *B. Warnecke*, Med. Klin. **46**, 742 (1951).

<sup>4</sup>) *M. Doladilhe*, Ann. Inst. Pasteur **59**, 624 (1937).

<sup>5</sup>) Vgl. *Th. Bersin*, Angew. Chem. **62**, 246 (1950).

<sup>6</sup>) *H. Eagle*, J. exp. Med. **52**, 747 (1930); **53**, 605 (1931); *P. Koets*, J. physic. Chem. **40**, 1191 (1936).

zu binden vermag. Der *Wassermann*-Antikörper, ein Protein aus der Globulinfraktion syphilitischer Sera (*Doladilhe*<sup>1</sup>)), hat eine Sedimentationskonstante, aus der unter Annahme kugelförmiger Gestalt sich ein Molekulargewicht von 1131 000 berechnet (*Deutsch*<sup>2</sup>). Das Flockungsprodukt mit dem Antigen enthält 20% Antikörper (*Weil*<sup>3</sup>)).

In der Natur sind mit Phosphorsäure veresterte Polysaccharide bekannt; auch mit Fettsäuren veresterte Polysaccharide sind schon aufgefunden worden (*Lehrmann*<sup>4</sup>) vgl. aber *Schoch*<sup>5</sup>)). Synthetisch sind derartige Produkte, wie z. B. Cellulosephosphat<sup>6</sup>), Stärketripalmitat und -tristearat ebenfalls dargestellt worden (*Karrer* und Mitarbeiter<sup>7</sup>)), doch ist bisher nichts über die Eigenschaften gleichzeitig phosphorylierter und mit Fettsäuren veresterter Polysaccharide bekannt. Man könnte sie „Liposaphossäuren“ (*Lipoidpolysaccharidphosphorsäuren*) nennen.

Es war bekannt, dass man mit Glykogen einerseits und Serum andererseits eine „prachtvolle Komplementbindung“ erzielen kann (*Citron*<sup>8</sup>)), ohne dass Spezifität auftritt. Wir haben uns mit einem Glykogenpräparat aus Hühnermuskulatur (Sammlungspräparat Nr. 27) ebenfalls davon überzeugen können.

Verestert man jedoch das Glykogen mittels Palmitoylchlorid in Pyridin-Benzol, so wird ein Präparat (Nr. 2081) erhalten, das bei 0,25% P und einer Verseifungszahl von 190 mg KOH für 1 g Substanz spezifisch reagiert.

**Tabelle 1.**

Palmitoylglykogen mit Lecithin und Cholesterin (*Merck*) in wässrig-alkoholischer NaCl-haltiger Lösung als WA.

Präparat	2081	2081 verd. 1:6	Käufl. Antigen
luespos. Serum .	+	-	+
luesneg. Serum . .	-	-	-

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein mit Fettsäuren verestertes Glykogen in der Natur vorkommt und weit verbreitet ist, erscheint gross. Nur musste eine derartige Substanz — oder besser gesagt, Substanzgruppe — bisher der Entdeckung entgehen, da bei der zumeist geübten Darstellung von Glykogen nach *Pflüger* durch Behandeln mit Alkali stets eine Verseifung eintreten muss.

<sup>1)</sup> *M. Doladilhe*, Ann. Inst. Pasteur **59**, 624 (1937).

<sup>2)</sup> *V. Deutsch*, C. r. **208**, 603 (1939).

<sup>3)</sup> *L. Weil*, Bacteriol. Rev. **5**, 293 (1941).

<sup>4)</sup> *L. Lehrmann & E. A. Kabat*, Am. Soc. **59**, 1050 (1937); *L. Lehrmann*, ibid. **61**, 212 (1939).

<sup>5)</sup> *T. J. Schoch*, Am. Soc. **60**, 2824 (1938).

<sup>6)</sup> *C. L. Hoffbauer & J. D. Guthrie*, J. Biol. Chem. **178**, 207 (1949).

<sup>7)</sup> *P. Karrer* und Mitarbeiter., Helv. **6**, 822 (1923). Vgl. auch *J. A. Wolff*, *D. W. Olds* & *G. E. Hilbert*, Am. Soc. **73**, 346 (1951).

<sup>8)</sup> *J. Citron*, Die Methoden der Immunodiagnostik usw., 4. Aufl. (Leipzig 1923), S. 179.

Es kann eingewendet werden, dass die Komplementbindung durch unsere Glykogen-Präparate auf Beimengungen beruht, die auch für die antigene Wirkung unreiner Glykogenproben verantwortlich sind (vgl. *Remy*<sup>1</sup>); von *Uhlenhuth* und Mitarbeitern<sup>2</sup>) wird allerdings die antigene Wirkung des an Kollodium adsorbierten Glykogens bestritten. Daher wurde wie folgt verfahren.

Das Glykogen besteht aus einem polymerhomologen Gemisch von mit Phosphorsäure veresterten<sup>3</sup>), kugelförmigen, verzweigten Polysacchariden mit Maltose und Isomaltose als Bausteine. Die Stärke hat, abgesehen von der Zusammensetzung aus zwei verschiedenen Kohlenhydraten (Amylose und Amylopektin) und (bei der Amylose) vom mangelnden Phosphatgehalt eine ähnliche Konstitution<sup>4</sup>). Nun ist aus der Chemie der synthetischen Hochpolymeren bekannt, dass viele chemische und physikalische Eigenschaften dieser Stoffe mehr durch die Zahl und Art der funktionellen Gruppen bestimmt werden, als durch die Natur der grossen Kernmolekel. Daher bestand die Möglichkeit, dass man durch Phosphorylierung und Veresterung von Stärke und Cellulose Präparate erhält, die ebenfalls spezifisch mit dem Syphilisantikörper reagieren und somit positive Komplementbindung zeigen.

Aus löslicher Stärke nach *Zulkowski* (*Merck*) wurde mittels  $\text{POCl}_3$  in Chloroform in Gegenwart von  $\text{CaCO}_3$  eine synthetische Amylophosphorsäure (Nr. 8845) gewonnen. Dieses Präparat erwies sich jedoch als gänzlich unwirksam.

Aus der gleichen Stärke wurde daraufhin mittels Palmitoylchlorid eine Monopalmitoylamylose (Nr. 2469) synthetisiert. Sie erwies sich als unspezifisch wirksam.

#### Tabelle 2.

Synthet. Monopalmitoylamylose mit Lecithin und Cholesterin (*Merck*) in phenol- und  $\text{NaCl}$ -haltiger wässrig-alkoholischer Lösung als WA.

Präparat	2469	2469 verd. 1:6	Käufl. Antigen
luespos. Serum . .	+	–	+
luesneg. Serum . .	+	–	–

Ein in ähnlicher Weise mittels Ölsäurechlorid aus der gleichen Stärke dargestellte Monooleylamylose (Nr. XI/1) erwies sich als gänzlich unwirksam.

Augenscheinlich bedarf es daher zur spezifischen Wirksamkeit nicht der Gegenwart von Phosphat — oder Fettsäureresten, sondern

<sup>1</sup>) *E. Remy*, Z. Unters. Lebensmittel **76**, 36 (1938).

<sup>2</sup>) *P. Uhlenhuth & E. Remy*, Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. **88**, 529 (1939).

<sup>3</sup>) Vgl. z. B. *M. Panlitschko & J. Matula*, M. **81**, 179 (1950); *H. Staudinger*, Makromol. Ch. **2**, 88 (1948).

<sup>4</sup>) Vgl. *K. H. Meyer & H. Mark*, Makromolekulare Chemie, 2. Aufl. (Leipzig 1950).

beider. Gegen den Versuch in Tabelle 2 konnte eingewendet werden, dass Phenol ein im Serum vorhandenes Antigen demaskiert und somit die Komplementbindung verursacht. Daher wurde in den folgenden Versuchen das als Antiseptikum verwendete Phenol weggelassen, zumal immer frisch hergestellte Lösungen zur Prüfung kamen.

Dass dem Phenol in der Tat eine demaskierende Wirkung kommt, zeigte sich bei einem Versuch mit der gleichen Monooleylamylose, deren Lösung jedoch Carbolsäure enthielt. Diese Lösung reagierte scheinbar spezifisch.

**Tabelle 3.**

Synthet. Monooleylamylose mit Lecithin und Cholesterin (*Merck*) in phenol- und NaCl-haltiger wässrig-alkoholischer Lösung als WA.

Präparat	XI/2	XI/2 verd. 1:6	Käufl. Antigen
luespos. Serum . .	+	+	+
luesneg. Serum . .	-	-	-

Als schliesslich die gleiche *Zulkowski*-Stärke sowohl phosphoryliert als auch palmitoyliert wurde, erwies sich die gebildete Palmitoylamylosephosphorsäure (Nr. XIV/1 bzw. XII/1) als streng spezifisch und erfüllte somit die Anforderungen, die an ein künstliches WA zu stellen sind. Es wurden zwei Präparate hergestellt: das eine, Nr. XIV, wurde in 2 Stufen erst phosphoryliert, dann palmitoyliert (beides in Pyridin); das zweite, Nr. XII, wurde gleichzeitig in einem Gang in Chinolin phosphoryliert und palmitoyliert.

**Tabelle 4.**

Synthet. Palmitoylamylosephosphorsäure mit Lecithin und Cholesterin (*Merck*) in wässrig-alkoholischer NaCl-haltiger Lösung als WA.

Präparat	XIV/1	XIV/1 verd. 1:6	XII/1	XII/1 verd. 1:6	Käufl. Antigen
luespos. Serum . .	+	+	±	+	+
luesneg. Serum . .	+	-	±	-	-

Wie die Tabelle 4 zeigt, sind die Lösungen der Präparate in der bisher stets angewandten Verdünnung unspezifisch wirksam. Verdünnt man jedoch ihre Lösungen (1 ml mit 5 ml 0,85-proz. NaCl-Lösung, also 1:6), so kommt die Spezifität deutlich zum Ausdruck.

Um den nicht ganz unberechtigten Einwand zu entkräften, dass mit dem von uns als Lösungsvermittler angewandten Lecithin ex ovo (aus Eigelb nach *Feulgen* dargestellt) Spuren antigen wirksamer Substanz eingeschleppt worden seien, die die Spezifität nur vorgetäuscht hatten, wurde die Palmitoylamylosephosphorsäure Nr. XIV mit Pflanzenlecithin (Reinlecithin Dr. *Buer*) zusammen in Lösung ge-

bracht. Auch diese Lösung erwies sich als spezifisch wirksam, wenn auch nicht in so hoher Verdünnung.

Tabelle 5.

Synthet. Palmitoylamilosephosphorsäure mit Lecithin (Dr. Buer) und Cholesterin (Merck) in wässrig-alkoholischer NaCl-haltiger Lösung als WA.

Präparat	XIV/3	XIV/3 verd. 1:6	Käufl. Antigen
luespos. Serum . .	+	–	+
luesneg. Serum . .	–	–	–

Um den Einfluss einer unverzweigten  $\beta$ -glucosidischen Kettenmolekel auf die Antigen-Wirkung zu ermitteln, wurde Cellulose einerseits und Monomethylcellulose andererseits mit Fett- (Palmitin- + Oleinsäure) und Phosphorsäure verestert: Substanz XV aus Monomethylcellulose und XVI aus umgefällter Cellulose (Verbandwatte). Die Prüfung auf ihre Brauchbarkeit als WA ergab folgendes Resultat:

Tabelle 6.

Synthet. Fettsäurecellulosephosphorsäure mit Lecithin ex ovo und Cholesterin (Merck) in wässrig-alkoholischer NaCl-Lösung als WA.

Präparat	XV/1	XV/1 verd. 1:6	XVI/1	XVI/1 verd. 1:6
luespos. Serum . .	–	–	+	+
luesneg. Serum . .	–	–	–	–

  

Dasselbe mit Lecithin (Dr. Buer) anstatt Lecithin ex ovo.				
Präparat	XV/3	XV/3 verd. 1:6	XVI/3	XVI/3 verd. 1:6
luespos. Serum . .	–	–	+	+
luesneg. Serum . .	–	–	–	–

Entsprechend den Erwartungen zeigte sich, dass der innere Aufbau des Polysaccharids keine so wesentliche Rolle spielt, denn die spezifisch reagierende Substanz XVI entstammt reiner Cellulose. Wird eine Hydroxylgruppe im Glucoserest durch Methoxyl verschlossen, wie in Substanz XV, so schwindet nicht nur die Spezifität, sondern auch jegliche Antigen-Wirkung; augenscheinlich kommt es nun nicht zu der für die Vernetzung notwendigen Ausbildung von Wasserstoff-Brücken zwischen den Hydroxyl-Gruppen.

Einige der in den oben angeführten Tabellen als WA geprüften Lösungen (XI, XII, XIV) wurden in Reagenzgläsern, nur mit einem Wattebausch lose verschlossen, im Laboratorium am Fenster — also Licht- und Temperaturschwankungen ausgesetzt — 77 Tage aufbewahrt und erneut auf ihre Wirksamkeit geprüft: sie zeigten die ursprüngliche Wirksamkeit.

Von *Rominger*<sup>1)</sup> ist 1913 gezeigt worden, dass ein Zusatz von winzigen Mengen Ameisensäure, Äpfelsäure, Palmitinsäure oder Stearinäure zu luesnegativem Serum dieses zu einer positiven Komplementbindung mit Meerschweinchenherzextrakt im *Wassermann*-Ver- such befähigt. Es war denkbar, dass unsere Präparate freie Fettsäuren (von der Hydrolyse der Säurechloride her) enthielten, obwohl sie einer Extraktion mit Lipoidlösungsmittelein unterworfen worden waren. Eine solche Pseudoreaktion ist jedoch ausgeschlossen, da dann nur eine unspezifische Komplementbindung eingetreten wäre, während sie bei uns spezifisch war, wie die stets durchgeführten Kontrollen mit den gleichen Sera (vgl. die letzte Spalte der Tabellen) zeigen. Die Bedeutung unserer Befunde liegt auf der Hand. An Stelle von Organextrakten mit unbekannten Inhaltsstoffen und empirisch festzustellender optimaler Wirksamkeit, können Lösungen von Stoffen bekannter Zusammensetzung und ein für allemal ermittelter günstigster Konzentration als *Wassermann*-Antigen verwendet werden. Dadurch könnte die Lues-Diagnose auf eine sicherere Grundlage gestellt werden.

### Experimenteller Teil.

#### Darstellungsvorschriften der als WA benutzten Präparate.

##### Veresterung mit Phosphor- oder mit Fettsäure.

*Präparat Nr. 8845:* 6 g Stärke mit 0,01% P (photometr.) in 150 ml H<sub>2</sub>O gelöst, zum Sieden erhitzt, nach Erkalten klare Lösung mit 24 g CaCO<sub>3</sub> (gefällt) versetzt, unter Eiskühlung und Rühren eine Lösung von 5 ml POCl<sub>3</sub> (frisch dest., Kp<sub>25</sub> 25°) in 10 ml alkohol- freiem Chlf. während 70 Minuten tropfenweise zugefügt, zum Schluss (nach 2 Stunden) Schaumbildung, dann über Nacht stehengelassen. Filtriert, Rückstand mit 150 ml H<sub>2</sub>O angerührt, filtriert, Filtrate vereinigt und im Vakuum bei 35—40° auf 50 ml eingedampft, mit 250 ml Aceton versetzt, klebriger Niederschlag abzentrifugiert.

Lösung 1. Niederschlag in 70 ml H<sub>2</sub>O gelöst, wieder mit 250 ml Aceton gefällt, gel- artiger Niederschlag abzentrifugiert und die Operation noch einmal wiederholt. Flüssigkeit abdekantiert, Niederschlag mit Aceton gewaschen, im Vakuum über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet. Farblose Masse; 2,77 g Ausb. (46%). Löslich in Wasser, opalesziert leicht, reduziert *Feh- ling*'sche Lösung nicht, Cl-frei, 1,63% P. Viskosität bei 17° (100 mg Subst. in 15 ml H<sub>2</sub>O) 1,211 cp.

1a. Lösung 1 wurde auf 50 ml bei 35—40° im Vakuum eingedampft und mit 250 ml Aceton versetzt, ähnlicher Niederschlag wie oben, der entsprechend weiterverarbeitet wurde. Nach dem Trocknen im Vakuum über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> leicht gelbliche Substanz. Ausb. 1,1 g (18%). In Wasser leicht löslich, opalesziert leicht; reduziert *Fehling*'sche Lösung nicht, Cl-frei, 2,28% P (Präparat 8845). Viskosität bei 17° (100 mg Subst. in 15 ml H<sub>2</sub>O) 1,140 cp (H<sub>2</sub>O zum Vergleich 1,081 cp)<sup>2)</sup>.

*Präparat Nr. 2469:* 1,6 g Stärke (Zulkowski), 5,2 g Chinolin, 3,0 g Palmitoylchlorid, 1 Stunde auf dem Wasserbad, 3mal mit CH<sub>3</sub>OH ausgekocht (Filtrat enthielt Chinolin und Palmitinsäure), dann 2mal mit Chlf. ausgekocht. Rückstand 1,3 g. Löslich in Wasser. Verseifungszahl 64,2.

*Präparat Nr. XI.* Oleylchlorid: In 20 g Ölsäure in mehreren Anteilen PCl<sub>5</sub> ein- getragen bis HCl-Entw. aufhörte und PCl<sub>5</sub> im Überschuss vorhanden war, Flüssigkeit abgegossen, im Vakuum von POCl<sub>3</sub> befreit und fraktioniert.

<sup>1)</sup> *E. Rominger*, M. med. Wschr. 1913, 859.

<sup>2)</sup> *J. Kerb*, Bioch. Z. 100, 8 (1920).

**Acylierung:** 1,6 g Stärke (*Zulk.*), 5,2 g Chinolin und 2,8 g Oleylchlorid auf dem Wasserbad 4 Stunden am Rückfluss gekocht, mit  $\text{CH}_3\text{OH}$  und Chlf. je 3mal ausgekocht, Rückstand wog 1,6 g. Löslich in Wasser, Cl-frei, reduziert *Fehling'sche* Lösung schwach. Verseifungszahl 61.

**Präparat Nr. XII.** Zu 8,1 g Stärke (*Zulk.*) in 40 g Chinolin bei  $-12^\circ$  unter Luftabschluss und Rühren 7,7 g  $\text{POCl}_3$  zugetropft (2 Stunden), dann 15 g Palmitoylchlorid zugetropft, noch 4 Stunden unter Feuchtigkeitsabschluss auf dem Wasserbad gekocht. Reaktionsprodukt mehrmals mit  $\text{CH}_3\text{OH}$  und Chlf. ausgekocht bis Chlf. farblos war. Rückstand im Vakuum über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet. Ausbeute 7,5 g, kakaobraun, unlöslich in Wasser, Chlf. und Alkohol; a: Keine Jodfärbung. Frei von N und anorg. P. Geht in verdünnter Na-tronlauge kolloidal in Lösung. 7,27% P, Säurezahl 112,4, Verseifungszahl 318.

#### Veresterung mit Phosphor- und Fettsäure.

Zu 8,1 g *Zulkowsky*-Stärke (*Merck*) in 40 g Chinolin wurden bei  $-12^\circ$  unter Luftabschluss und starkem Rühren 7,7 g  $\text{POCl}_3$  langsam zugetropft; nach etwa 2 Stunden wurden 15 g Palmitoylchlorid zugetropft und 4 Stunden am Rückflusskühler unter Feuchtigkeitsabschluss auf dem Wasserbad erhitzt. Das Reaktionsprodukt wurde 3mal mit Methanol und 6mal mit Chlf. ausgekocht, bis das Chlf. farblos blieb. Der Rückstand wurde im Vakuum über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet: Substanz XII 7,5 g entspr. 92,6% der Ausgangsstärke, kakaobraun, unlöslich in Wasser, Alkohol, Aceton, Chlf., reduziert *Fehling'sche* Lösung, gibt keine Jodfarbe, N-frei, geht beim Schütteln mit verdünnter NaOH kolloidal in Lösung. 7,27% P, Verseifungszahl 318, Säurezahl 112, Esterzahl 206.

**Präparat Nr. XIII.** Zu 4 g *Zulkowsky*-Stärke (*Merck*) in 12 g Pyridin wurden unter Kühlung und starkem Rühren 11,4 g  $\text{POCl}_3$  langsam zugetropft (1 Stunde). Dann wurden 30 ml Wasser zugegeben, abzentrifugiert und das gallertartige, dunkle Reaktionsprodukt 6mal mit Wasser und 2mal mit Aceton gewaschen (durch Aufschlämmen, Zentrifugieren und Dekantieren) bis es hellgelblich war und im Vakuum über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet. Substanz XIII: 4 g (100%) der Ausgangsstärke. Unlöslich in Wasser, Äther und Aceton, keine Jodfarbe, Cl-frei, reduziert *Fehling'sche* Lösung nicht. Quillt in NaOH unter Hellbraunfärbung, N-frei. 12,18% P. Reaktionslösung und die ersten Waschwässer enthielten geringe Mengen Stärke, die aber nicht isoliert wurde.

**Präparat Nr. XIV.** 4 g Substanz XIII (s.o.), 10 g Palmitoylchlorid, 2 g Ölsäurechlorid wurden in 25 g Pyridin eine halbe Stunde auf dem Wasserbad am Rückflusskühler erhitzt. Nach Stehen über Nacht wurde die erstarrte, dunkelbraune Masse mit Methanol 4mal und mit Äther 3mal ausgekocht, bis der Äther farblos blieb und das Produkt hellbräunlichgelb war. Nach Trocknen im Vakuum über  $\text{P}_2\text{O}_5$ : Substanz XIV 3,8 g entspr. 95% der Ausgangssubstanz. Unlöslich in Wasser, Äther, Methanol, Aceton, quillt aber in Wasser auf und wird mit Jodlösung braun, allmählich tritt Entfärbung ein; reduziert *Fehling'sche* Lösung sehr schwach. 11,5% P, Säurezahl 282; Esterzahl 88, Verseifungszahl 336.

**Präparat Nr. XV.** 7 g Palmitinsäure (techn.), 1,5 g Oleinsäure (*Kahlbaum*), 7 g  $\text{PCl}_5$  und 50 ml  $\text{CCl}_4$  wurden 2 Stunden auf dem Wasserbad gekocht. Am nächsten Tag wurden 2 ml Pyridin und 4 g Adulsion ST (*Kalle & Co, AG.*, Wiesbaden-Biebrich) (Methylcellulose-Monoester) zugefügt und 8 Tage stehengelassen. Dann wurde je 3mal mit  $\text{CCl}_4$  und Methanol ausgekocht, abzentrifugiert und der Rückstand im Vakuum über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet: Substanz XV 1,5 g entspr. 37,5% des Ausgangsstoffes, unlöslich in Wasser, Aceton, Alkohol,  $\text{CCl}_4$ , Farbe hellgelblich, entfärbt Jodlösung, wobei die Substanz selbst rostbraun wird. 3,14% P, Säurezahl 121, Esterzahl 160,5, Verseifungszahl 282.

**Präparat Nr. XVI.** Pulverförmiges Kupferoxyd wurde unter Zugabe von Ammoniumchlorid bei niedriger Temperatur in konz. Ammoniak gelöst und der Mischung 50-proz. NaOH so lange zugesetzt, bis sich ein hellblauer Niederschlag abzuscheiden begann. In der durch Zentrifugieren abgetrennten, klaren, tiefblauen Flüssigkeit wurde in kleine Stücke zerrissene, gewöhnliche Verbandwatte eingetragen und so lange geschüttelt, bis klare Lösung eintrat. Dann wurde mit Wasser auf das Dreifache verdünnt und die

Cellulose mit 2-n. HCl ausgefällt, bis zur neutralen Reaktion gewaschen und im Vakuum über  $P_2O_5$  getrocknet: schwach grünliche, ausserordentlich feste Masse, die fast unzerbrechlich war und sich nur mit grosser Anstrengung in kleine Splitter zerschlagen liess, die dann weiterverarbeitet wurden: 7 g Palmitinsäure und 1,5 g Oleinsäure (*Kahlbaum*), 10 g  $PCl_5$  + 50 ml  $CCl_4$  + 2 g der nach oben dargestellten Cellulosesplitter + 10 ml Pyridin wurden 8 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Das Reaktionsprodukt 4mal mit  $CCl_4$  ausgekocht und im Vakuum über  $P_2O_5$  getrocknet: Substanz XVI 2,5 g, unlöslich in Wasser, Alkohol, Aceton,  $CCl_4$ , schmutzig gelb gefärbt, etwas klebrig.

1. 50 mg Substanz mit 50 mg Lecithin ex ovo (aus Eigelb nach *Feulgen* dargestellt) im Schälchen erst trocken, dann mit einem Tropfen 4-proz. NaCl-Lösung verreiben, 5facher Menge 96-proz. Alkohol zugeben und mit 5facher Menge physiologischer Kochsalz-Lösung bis zur trüben Lösung verreiben.

1 ml gesättigte alkohol. Cholesterin-Lösung zugeben und mit 20 ml 96-proz. Alkohol und 10 ml physiolog. NaCl-Lösung auffüllen. Das Ganze eine halbe Stunde auf 50° erwärmen, über Nacht langsam abkühlen lassen und am nächsten Tag von Flocken abdekantieren.

2. 20 mg Substanz in 250 ml Carbol-Kochsalz-Lösung (90 ml 0,9-proz. NaCl-Lösung + 10 ml 5-proz. Phenol-Lösung) lösen. 20 ml davon mit 10 ml einer alkoholischen Lösung von Cholesterin und Lecithin (in 40 ml 96-proz. Alkohol 80 mg Cholesterin (*Merck*) entspr. 0,2% und 80 mg Lecithin ex ovo entspr. 0,2% lösen) versetzen. 0,5 ml dieser Lösung bei 46° aus der Bürette tropfenweise mit 5 ml 1,5-proz. NaCl-Lösung versetzen.

3. 20 mg Substanz mit 20 mg „Dr. *Buers* Reinlecithin“ und 5 mg Cholesterin (*Merck*) im Schälchen erst trocken, dann mit einigen Tropfen physiologischer Kochsalz-Lösung verreiben, 5 ml 96-proz. Alkohol und 5 ml physiologischer Kochsalz-Lösung zusetzen und gut verreiben. 20 ml Alkohol und 10 ml physiologischer Kochsalz-Lösung zugeben und unter Umrühren auf 50° erwärmen. Nach langsamer Abkühlung im Wasserbad am nächsten Tag vom abgeschiedenen Bodensatz dekantieren.

Herrn Prof. Dr. *H. Schmidt*, Behringwerke, Marburg-Lahn, sei für sein freundliches Interesse, die wertvollen Diskussionen und sachliche Unterstützung unser herzlichster Dank ausgesprochen. Herrn Prof. Dr. *Ruete*, Univ.-Hautklinik, Marburg-Lahn, sind wir für die in seiner Klinik durch Fr. *S. Grahner* durchgeführten serologischen Reaktionen zu Dank verpflichtet. Der experimentelle Teil der Arbeit lag bereits 1945 abgeschlossen vor.

### Zusammenfassung.

Es wird die Darstellung von mit Fettsäure und Phosphorsäure veresterten Polysacchariden beschrieben. Diese als Liposaphossäuren bezeichneten „synthetischen“ *Wassermann*-Antigene konnten mit Hilfe von Lecithin und Cholesterin in Kochsalz-Lösung zu Nebenvalenz-Solen aufgebaut werden, die — ähnlich wie Cardiolipin — spezifisch mit dem *Wassermann*-Antikörper reagieren, Komplement binden und sich zur Lues-Diagnose verwenden lassen.

Forschungslaboratorium der *Hausmann AG.*, St. Gallen.