

1,5 g Triacetoxy-pregnanon. (Die alkalische Verseifung des letzteren zum freien Trioxyketon dürfte sich noch etwas verbessern lassen und 0,5—0,8 g davon liefern¹.)

Die Analysen wurden grösstenteils im Mikrochemischen Laboratorium des Instituts (Leitung Dr. *M. Furter*), einige auch bei Dr. *Schöller* (Berlin) ausgeführt.

Laboratorium für organische Chemie Eidg. Techn.
Hochschule Zürich.

2. Azofarbstoffe und Immunbiologie.

Schultz-Dale'sche Versuche mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin

von Hans Ed. Fierz-David, Werner Jadassohn und Werner Felix Zürcher.

(12. XII. 36.)

1933 teilten *Landsteiner* und *van der Scheer*²) mit, dass es ihnen gelungen sei, bei mit Azoproteinen vorbehandelten Meerschweinchen durch Injektion von Azofarbstoffen, die die gleiche Azokomponente enthielten, wie das sensibilisierende Antigen, anaphylaktischen Schock auszulösen. Verwendet wurde von den beiden Autoren:

1. zur Vorbehandlung ein Azoprotein, hergestellt aus 4-Amino-suberanilsäure und Globulin aus Pferdeserum; resp. ein Azoprotein, hergestellt aus 4-Amino-succinanilsäure und Globulin aus Pferdeserum.

2. zur Auslösung des anaphylaktischen Schocks Bis-p-suberanilsäure-azo-resorcin resp. Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin.

Diese Versuche bringen insofern etwas vollkommen Neues, als es hier zum ersten Male gelungen ist, den anaphylaktischen Schock mit einer chemisch bekannten Substanz auszulösen.

Der sog. anaphylaktische Versuch.

Anaphylaktische Experimente wurden früher und werden jetzt auch meist noch mit chemisch ganz undefinierbaren Eiweisskörper enthaltenden Gemischen durchgeführt, in erster Linie mit Seren.

Das gewöhnliche Vorgehen beim anaphylaktischen Experiment ist folgendes: Man injiziert einem Meerschweinchen eine kleine Menge artfremden Serums, was von dem Tier anstandslos getragen wird. Einige Zeit später injiziert man das gleiche Serum in einer für nicht vorbehandelte Tiere vollkommen indifferenten Menge intravenös; das vorbehandelte Meerschweinchen erkrankt unter den charakteristischen Symptomen des

¹) Eine weitere Verbesserung der Ausbeute lässt sich erzielen, wenn man den Bis-nor-cholsäure-methylester nicht isoliert, sondern mit Diazomethan bereitet (Säure in Methanol gelöst, direkt roh verwendet). Statt 1,5 g Triacetyl-keton erhält man dann ca. 2,8 g.

²) *Landsteiner* und *van der Scheer*, *J. Exp. Med.* **56**, 399 (1932); **57**, S. 633 (1933).

anaphylaktischen Schocks und stirbt meistens innerhalb weniger Minuten. Wird zur zweiten Injektion ein anderes Serum verwendet als zur Vorbehandlung, so bleibt der anaphylaktische Schock aus.

Solange nur mit Serum und anderen eiweisshaltigen Lösungen, Milch, Bakterienaufschwemmungen, Organpresssäften etc. gearbeitet werden konnte, war für den Chemiker, trotz des ausserordentlich grossen biologischen Interesses der Anaphylaxie, auf diesem Gebiete relativ wenig zu holen. Die Fraktionierung der Eiweisslösungen, z. B. durch Ammoniumsulfat, haben wirklich prinzipielle Fortschritte nicht gebracht, und wenn in neuerer Zeit Anaphylaxieexperimente mit aus Mikroorganismen hergestellten Produkten neue Resultate gezeitigt haben, so ist dieses Gebiet für denjenigen Chemiker, der mit definierten Substanzen arbeiten will, noch nicht reif. Für diesen Chemiker ist nun aber durch die Untersuchungen von *Landsteiner*¹⁾, die sich an den Begriff „Hapten“ knüpfen, ein neues Arbeitsgebiet entstanden.

Die Haptentheorie.

Es ist an dieser Stelle, da diese Arbeit auch für den nicht immunbiologisch arbeitenden Chemiker verständlich sein soll, notwendig, auseinanderzusetzen, was man unter einem Hapten versteht, und da diese Abhandlung sich mit Azofarbstoffen und Azoproteinen beschäftigt, so sollen diese Substanzen als Beispiele verwendet werden, aber nicht die beiden oben angeführten Azofarbstoffe, da sie, wenigstens scheinbar, sich von den übrigen unterscheiden, was ja gerade zu der Mitteilung von *Landsteiner* und *van der Scheer*²⁾ Anlass gegeben hat. Wenn man ein Meerschweinchen mit einem Azoprotein vorbehandelt, so wird das Tier anaphylaktisch, d. h. eine intravenöse Injektion des gleichen Azoproteins führt zum anaphylaktischen Schock. Die Untersuchungen *Landsteiner's* haben nun gezeigt, dass, wenn man einen Schock erzielen will, an dem chemisch bekannten Teil der Azoverbindung nichts wesentliches verändert werden darf, dass es aber gleichgültig ist, ob der Proteinbestandteil mit der zur Vorbehandlung verwendeten Substanz identisch ist oder nicht. *Landsteiner*³⁾ hat ferner gezeigt, dass zur Auslösung des anaphylaktischen Schocks im allgemeinen der Proteinbestandteil notwendig ist. Wenn man an seine Stelle eine chemisch bekannte Substanz setzt, so löst diese Verbindung bei einem mit dem entsprechenden Azoprotein sensibilisierten Tier keine anaphylaktische Reaktion aus. Durch die Injektion eines solchen Azofarbstoffes kann aber die Reaktionsfähigkeit des mit Azoprotein vorbehandelten Tieres auf eine nachfolgende Azoprotein-gabe aufgehoben werden. Man kann sich das so erklären, dass durch den Azofarbstoff diejenigen Substanzen im tierischen Organismus, die für die anaphylaktische Überempfindlichkeit verantwortlich sind (man bezeichnet solche Substanzen als Antikörper), unwirksam werden, weil zwischen dem Azofarbstoff und diesen Antikörpern eine Reaktion stattfindet. Von prinzipieller Wichtigkeit ist jetzt noch, darauf hinzuweisen, dass Substanzen vom Typus der Azofarbstoffe Tiere nicht anaphylaktisieren können, also mit andern Worten nicht imstande sind, im Tiere die Bildung von Antikörpern zu veranlassen. Man ersieht aus diesen Ausführungen, dass es Stoffe gibt, die keine Antikörperbildung im Organismus bewirken können, die aber trotzdem mit Antikörpern in Reaktion treten; solche Substanzen bezeichnet man nach *Landsteiner* als Haptene.

¹⁾ *Landsteiner*, The Specificity of Serological Reactions, Baltimore, 1936, [C. C. Thomas] (im weiteren als Buch bezeichnet).

²⁾ *Landsteiner* und *van der Scheer*, J. Exp. Med. **56**, 399 (1932); **57**, S. 633 (1933).

³⁾ *Landsteiner*, Buch.

Die Reaktion des Haptens mit seinem Antikörper lässt sich nicht nur in vivo demonstrieren, sondern auch in vitro. Bringt man in vitro antikörperhaltiges Serum, gewonnen durch die Vorbehandlung von Meerschweinchen, z. B. mit einem Azoprotein, mit Azoprotein zusammen, so entsteht eine Präcipitation. Enthält aber dieses Gemisch einen Überschuss von dem in Frage kommenden Hapten (und nur dieses spezielle Hapten ist wirksam), so wird dadurch die Präcipitation verhindert (Überschusshemmung, „Inhibition Test“).

*Landsteiner*¹⁾ hat gezeigt, dass die Reaktion in vitro zwischen 4-Phenyl-arsinsäure-azo-protein und seinem Antikörper nicht nur durch einen Überschuss von einem Atoxylazofarbstoff gehemmt wird, sondern auch durch Atoxyl allein. Da nun aber Atoxyl allein die Reaktionsfähigkeit des auf 4-Phenyl-arsinsäure-azo-protein sensibilisierten Tieres nicht aufzuheben in der Lage ist, unterscheiden *W. Jadassohn* und *Schaaf*²⁾ zwei Gruppen von Haptenen, von denen die eine sich dadurch auszeichnet, dass die Reaktion mit dem Antikörper nur in vitro nachweisbar ist (Paradigma: Atoxyl), während die andere Gruppe auch in vivo wirkt, indem sie die anaphylaktische Reaktionsfähigkeit aufhebt (Paradigma: Atoxylazofarbstoff). Zu diesen zwei Gruppen käme durch die oben angeführten Versuche von *Landsteiner* und *van der Scheer*³⁾ noch eine dritte, die Substanzen enthält, die wie diejenigen der zweiten Gruppe auch in vivo wirksam sind, sich aber von denjenigen der zweiten Gruppe dadurch unterscheiden, dass sie im Gegensatz zu diesen anaphylaktischen Schock auslösen (Paradigma: Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin).

Neben dem Nachweis der anaphylaktischen Überempfindlichkeit durch Auslösen eines anaphylaktischen Schockes gibt es noch eine zweite Methode, den sogenannten *Schultz-Dale'schen Versuch*.

Der Schultz-Dale'sche Versuch.

Der *Schultz-Dale'sche Versuch* beruht auf der Tatsache, dass sich die überlebenden Uterushörner anaphylaktisierter Meerschweinchen kontrahieren, wenn sie in vitro mit der zur Anaphylaktisierung verwendeten Substanz zusammengebracht werden: und zwar ist diese Kontraktion spezifisch, d. h. sie wird nur durch diejenige Substanz hervorgerufen, auf die das Tier anaphylaktisch ist. Ein Kriterium dafür, dass es sich wirklich um eine „anaphylaktische Kontraktion“ handelt, besteht darin, dass auf wiederholte Gabe der anaphylaxie-auslösenden Substanz die anaphylaktische Reaktionsfähigkeit des Uterus auf die verwendete Substanz aufgehoben wird.

Technik des *Schultz-Dale'schen Versuchs*.

Die *Schultz-Dale'schen Versuche* wurden in der genau gleichen Weise wie bei *W. Jadassohn* und *Schaaf*²⁾ und Mitarbeitern (vergleiche speziell: *O. Bucher*, *W. Jadassohn* und *Schaaf*⁴⁾) ausgeführt.

¹⁾ *Landsteiner*, Buch.

²⁾ *Jadassohn W.* und *Schaaf*, Arch. Derm. Syph. **170**, 33 (1934); Schweiz. med. Wochschr. **33**, 737 (1935).

³⁾ *Landsteiner* und *van der Scheer*, J. Exp. Med. **56**, 399 (1932); **57**, S. 633 (1933).

⁴⁾ *Bucher O.*, *W. Jadassohn* und *Schaaf*, Z. Immunitätsforsch. **76**, 241 (1932).

Verwendet werden weibliche, virginelle Meerschweinchen von 250 bis 350 g Gewicht. Nach Tötung der Tiere durch Nackenschlag werden die sorgfältig herauspräparierten Uterushörner in die Apparatur eingespannt. Eine Beschreibung der Apparatur erübrigt sich, da sie sich aus der unten wiedergegebenen Skizze ohne weiteres ergibt. Es sei nur noch folgendes erwähnt:

1. Zusammensetzung der Tyrodelösung:

Lösung I: 32 g NaCl
0,8 g KCl
0,8 g CaCl₂
0,4 g MgCl₂
gelöst in 2 l ausgekochtem, destilliertem Wasser von 40° C.

Lösung II: 4 g NaHCO₃
0,2 g NaH₂PO₄
in gleicher Weise gelöst.

Die beiden Lösungen werden unmittelbar vor Gebrauch vermischt und bei 37° gehalten.

2. Bei Beginn und bei Abschluss jedes Versuches wird der Uterus durch Zugabe von 1 cm³ Pituglandol (*Roche*) 1:250 geprüft.

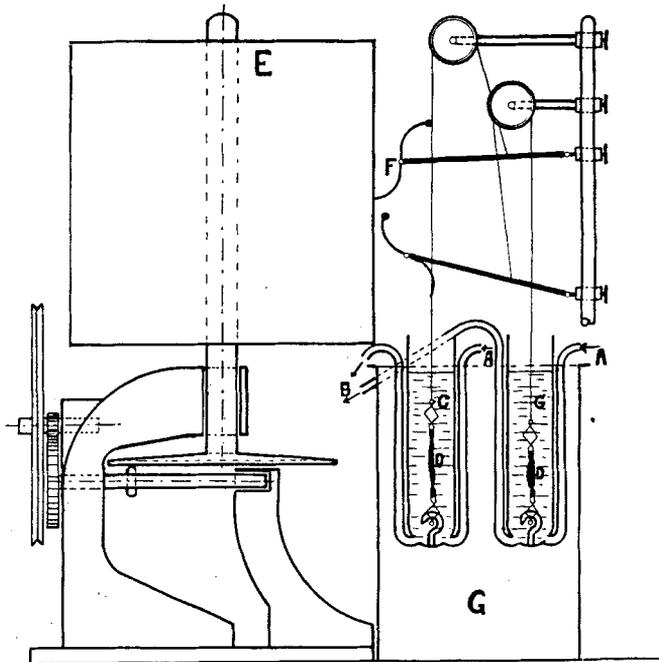


Fig. 1.

Schultz-Dale'sche Apparatur.

A = Sauerstoffzuleitung, B = Entleerung der Rezipienten,
C = Rezipienten mit Tyrodelösung, D = Uterushörner,
E = Registriertrommel, F = Registriernadeln, G = Thermostat.

3. Nachdem Pituglandol oder eine der zu untersuchenden Substanzen der Tyrodelösung zugegeben worden ist und der Effekt während zwei Minuten registriert wurde, wird die Tyrodelösung mit dem Zusatz ablaufen gelassen und durch frische Tyrodelösung ersetzt (Spülen).

4. Tritt eine Kontraktion ein, von der angenommen werden kann, dass sie anaphylaktisch ist, so wird erst gespült, wenn der Uterus wieder erschlafft ist, oder zum mindesten nicht vor Ablauf von 10 Minuten. Es wird nachher noch ein oder mehrere Male die gleiche Substanz in der gleichen Menge zugesetzt. Nur wenn Reaktionsunfähigkeit nach mehrfacher Gabe erzielt werden kann, wird die Reaktion als positiv gewertet, d. h. die vorausgegangene Reaktion als anaphylaktisch angesehen.

Schultz-Dale'sche Versuche mit Azoproteinen.

W. Jadassohn und Schaaf¹⁾ haben bei mit 4-Phenyl-arsinsäure-azo-protein (Pferd) (diazotiertes Atoxyl, gekuppelt an Pferdeserum) vorbehandelten Meerschweinchen *Schultz-Dale'sche* Versuche durchgeführt und dabei folgendes festgestellt:

Mit Hühner- und Meerschweinchen-azo-protein fiel der Versuch positiv aus.

Mit dem Azofarbstoff aus Atoxyl und 1-Naphthol und dem Naphtholfarbstoff-Serum-, resp. Blutgemisch fiel er negativ aus.

Mit dem Naphtholfarbstoff und Naphtholfarbstoff-Serum- resp. Blutgemisch konnte Neutralisation, d. h. Aufhebung der Reaktionsfähigkeit auf 4-Phenyl-arsinsäure-azo-protein erzielt werden.

Soweit diese *Schultz-Dale'schen* Versuche eine Wiederholung von *Landsteiner*²⁾ mit dem klassischen anaphylaktischen Experiment sind, ergeben sie eine vollständige Bestätigung der letzteren.

Auf Grund des vorliegenden Materials schien es naheliegend, die von *Landsteiner* und *van der Scheer*³⁾ durchgeführten Versuche mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin zu wiederholen, aber statt des klassischen Anaphylaxieexperimentes die *Schultz-Dale'sche* Versuchsanordnung zu verwenden. Für diese Versuche waren notwendig die Herstellung von:

1. Diazotierter 4-Amino-succinanilsäure, gekuppelt an Pferdeserum (4-Succinanilsäure-azo-protein (Pferd)).
2. Diazotierter 4-Amino-succinanilsäure, gekuppelt an Hühnerserum (4-Succinanilsäure-azo-protein (Huhn)).
3. Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin.

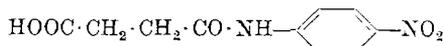
¹⁾ *Jadassohn W. und Schaaf*, Arch. Derm. Syph. **170**, 33 (1934); Schweiz. med. Wochschr. **33**, 737 (1935).

²⁾ *Landsteiner*, Buch.

³⁾ *Landsteiner* und *van der Scheer*, J. Exp.-Med. **56**, 399 (1932); **57**, S. 633 (1933).

Herstellung und Eigenschaften der Azofarbstoffe aus 4-Amino-succinanilsäure.

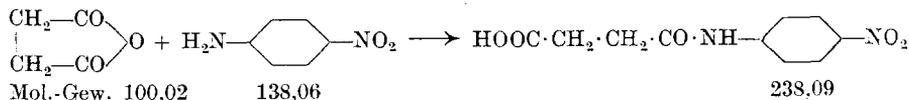
I. Herstellung von 4-Nitro-succinanilsäure (Lit.: *Auwers*¹); *Meyer und Maier*²); *Bishop, Tingle und Blanch*³).



*Landsteiner und van der Scheer*⁴) stellten diese Verbindung durch Kondensation von Bernsteinsäure mit 4-Nitranilin her, indem sie eine fein gemahlene Mischung äquimolekularer Mengen in einem Paraffinbad von 170 bis 175° C. unter Rühren 45 Minuten schmolzen und nachher mit Natronlauge und Wasser in der Hitze lösten. Sie geben eine Ausbeute von 40 bis 50 % an. Diese Ausbeute ist für eine solche Kondensation unbefriedigend, und unsere Versuche, diese Reaktion in der gleichen Weise auszuführen, schlugen meistens fehl. Wir versuchten daher einen andern Weg einzuschlagen. Dazu wählten wir die Kondensation von Bernsteinsäure-anhydrid mit 4-Nitranilin in einem Lösungsmittel. Als solches wählten wir zunächst Chloroform. Auf diese Weise erhielten wir schon ein bedeutend besseres Resultat, nämlich eine Ausbeute von 75 %. Der Nachteil dieser Methode liegt aber darin, dass das 4-Nitranilin in Chloroform auch bei dessen Siedepunkt sehr wenig löslich ist und man daher eine unverhältnismässig grosse Menge Lösungsmittel braucht. Auch schien die Ausbeute immer noch verbesserungsfähig. Darauf wählten wir als Lösungsmittel Chlorbenzol. Dieses hat einen höheren Siedepunkt, und es schien deshalb geeignet, weil dieser den Schmelzpunkt von 4-Nitranilin beinahe erreicht.

Im heissen Chlorbenzol löst sich sowohl 4-Nitranilin als auch Bernsteinsäure-anhydrid sehr gut. Das Kondensationsprodukt dagegen ist auch im heissen Chlorbenzol schwer löslich und fällt aus. Daher kann man die Methode als sicher und wegen der fast theoretischen Ausbeute und der kurzen Reaktionsdauer in dieser Beziehung als sehr befriedigend bezeichnen.

Vorschrift zur Ausführung der Kondensation:



50 g Bernsteinsäureanhydrid und 70 g 4-Nitranilin werden in je 700 g Chlorbenzol kochend gelöst und zusammengewogen. Nach einigen Minuten zeigen sich in der gelben, klaren, heissen Lösung einige zitronengelbe Krystallflocken, und dann breitet sich die Kry-

¹) *Auwers*, A. **292**, 188—191 (1896).

²) *Meyer und Maier*, A. **327**, 55 (1903).

³) *Bishop, Tingle und Blanch*, Am. Soc. **30**, 1587—1599 (1908).

⁴) *Landsteiner und van der Scheer*, J. Exp. Med. **56**, 399 (1932); **57**, S. 633 (1933).

stallisation mit ausserordentlich grosser Geschwindigkeit durch die ganze Lösung aus. Nun lässt man erkalten und saugt ab (den Rest in der Mutterlauge könnte man vernachlässigen, aber bei der Rückgewinnung des Chlorbenzols durch Destillation fällt noch eine kleine Menge des Produktes an). Die rohe 4-Nitro-succinanilsäure wird auf der Nutsche sehr gut abgesaugt und nachher an der Luft ausgebreitet liegengelassen, bis der Geruch nach Chlorbenzol verschwunden ist (über Nacht).

Ausbeute: 119 g = 95% der Theorie. Zitronengelbe Nadeln aus Alkohol oder Wasser. Smp. 196—197° korr.

II. Reduktion der 4-Nitro-succinanilsäure.

*Landsteiner und van der Scheer*¹⁾ führten diese Reduktion folgendermassen aus:

Das Nitro-anilid, in etwa drei Teilen Wasser gelöst unter Zugabe eines leichten Überschusses von Ammoniak und, wenn nötig, Erhitzen wurde zu einer heissen Lösung von Ferrosulfat, $\text{FeSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$, in 2,5 Teilen Wasser gegeben (6,5 Mol für jedes Mol 4-Nitro-succinanilsäure). Eine 28-proz. Ammoniaklösung (10 cm³ für je 12 g $\text{FeSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$) wurde in fünf gleichen Portionen innert 10 Minuten unter gutem Schütteln zugegeben. Nach 15 Minuten Erhitzen auf dem Dampfbad wurde das Ferrihydroxyd abfiltriert und zum klaren Filtrat soviel 10-proz. Salzsäure zugegeben, um eine maximale Fällung der Aminoverbindung zu erreichen. Die Fällung wurde, nachdem sie über Nacht im Eiskasten gestanden hatte, abgesaugt, umgefällt durch Lösen als Chlorhydrat, Filtrieren und Wiederfällen mit verdünnter Natronlauge. Darauf wurde die Fällung wieder über Nacht in den Eisschrank gestellt, abgesaugt und im Vakuum über Calciumchlorid bei 50° getrocknet. Ausbeute 70 bis 80% der Theorie.

Diese Reduktion wurde gleicherweise mit denselben Resultaten mehrmals durchgeführt. Die Methode ist aber sehr heikel, da die 4-Amino-succinanilsäure einerseits durch Ammoniak leicht verseift wird und andererseits sich beim Kochen gern umwandelt in p-Phenyl-bis-succinamidsäure (*Meyer und Maier*)²⁾:



Ausserdem machten wir die Erfahrung, dass sich die 4-Amino-succinanilsäure beim längeren Stehen in der Mutterlauge auch im Eisschrank sehr stark verfärbte. Dies ist um so unangenehmer, als sich die Säure infolge ihrer Empfindlichkeit nicht leicht und nur unter grossen Verlusten reinigen lässt.

Wir suchten daher nach einer Reduktionsmethode, welche gestattet, das Reduktionsgemisch möglichst kurze Zeit zu erhitzen und welche auch starke Alkalinität vermeidet. Versuche zur Ausführung der Reduktion nach *Béchamp* mit Eisen und Essigsäure, mit Natriumhyposulfit und mit Zinn schlugen fehl oder gaben nur schlechte Resultate, dagegen wurde gefunden, dass es sich lohnte, der Reduktion mit Zinkstaub die Aufmerksamkeit zuzuwenden.

¹⁾ *Landsteiner und van der Scheer*, J. Exp. Med. **56**, 399 (1932); **57**, S. 633 (1933).

²⁾ *Meyer und Maier*, A. **327**, 55 (1903).

vollkommen farblose Krystallplättchen erhalten. Smp. aus Wasser umkrystallisiert 183° korr.

$C_{16}H_{12}O_3N_2$ Ber. C 57,66 H 5,80%
 Gef. „ 57,83 „ 5,70%

III. Herstellung des Azofarbstoffs aus 4-Amino-succin- anilsäure und Pferde-, resp. Hühnerserum.

832 mg (4 Millimol) 4-Amino-succin-anilsäure wurden in 100 cm³ Wasser und 5 cm³ 2-n. Salzsäure gelöst und auf 0 bis 5° abgekühlt. Darauf wurde das Amin durch langsames Zutropfen von 4 cm³ n. Natriumnitrit diazotiert unter Prüfung des Reaktionsverlaufes mit Kongo- und Kaliumjodidstärkepapier. Unterdessen wurden 80 cm³ Pferde-, resp. Hühnerserum mit 30 cm³ 2-n. Soda gemischt und ebenfalls auf 0 bis 5° abgekühlt. Nun wurde unter gutem Rühren die Diazoniumlösung in feinem Strahle in die Proteinlösung einlaufen gelassen und eine halbe Stunde bei 0—5° weitergerührt. Darauf wurde die Temperatur auf Zimmertemperatur steigen gelassen. Der Kupplungsverlauf wurde durch Tupfproben mit alkalischer R-Salzlösung auf Filtrierpapier beobachtet. Die Kupplung war nach zwei Stunden beendet. In einer Kontrollösung von der gleichen Alkalinität, aber ohne Serum, war die Diazoreaktion nach dieser Zeit noch ohne merkliche Schwächung vorhanden. Die Kupplung war auch daran zu erkennen, dass sich das Gemisch in den ersten zwanzig Minuten tief rot färbte, doch war die Kupplungsgeschwindigkeit im Vergleich zu derjenigen bei der Kupplung von technisch gebräuchlichen Kupplungskomponenten wie R-Salz, Naphthole, Naphthylamine etc. sehr klein.

Das Kupplungsgemisch wurde nun noch über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen. Am nächsten Morgen wurde unter gutem Rühren durch langsames Zutropfen von 2-n. Salzsäure das Azoprotein ausgefällt. Es war eine braune, flockige, kaum filtrierbare Fällung. Diese wurde zentrifugiert und mit schwach saurer Kochsalzlösung gewaschen; nachher mit 2-n. Soda in Lösung gebracht und wieder mit 2-n. Salzsäure gefällt. Darauf wurde wieder dreimal wie vorher gewaschen und mit 2-n. Soda in physiologischer Kochsalzlösung schwach alkalisch gelöst und filtriert. In der erhaltenen Lösung wurde der Azoproteingehalt durch Fällung eines aliquoten Teils bestimmt und die übrige Lösung auf Grund dieser Bestimmung auf 1% Azoprotein gestellt. Zur Konservierung wurde den zur Sensibilisierung bestimmten Azoproteinlösungen 0,5% Phenol beigelegt, nicht aber den zur Auslösung bestimmten, doch scheinen die Azoproteine gegen Bakterieninfektion sehr resistent zu sein, denn wir konnten sie teilweise ein Jahr lang im Kühlschrank aufbewahren, ohne dass sie im geringsten gelitten hätten.

Resultate.

1. Bei 13 der 28 vorbehandelten Meerschweinchen gelang es, mit 4-Succinanilsäure-azo-protein (Huhn) einen positiven *Schultz-Dale*'schen Versuch auszulösen, d. h. etwas weniger als die Hälfte der Tiere erwiesen sich auf Azoprotein als sensibilisiert. Entsprechend den Angaben von *Landsteiner* liess sich die Azoprotein-Überempfindlichkeit nachweisen, trotzdem der Eiweissbestandteil der zur Vorbehandlung und der zur Auslösung verwendeten Verbindungen nicht identisch war. Dass dieser Nachweis auch im *Schultz-Dale*'schen Versuch gelingt, ist eine Bestätigung der Angaben von *W. Jadassohn* und *Schaaf*¹⁾.

2. Mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin liess sich eine Reaktion im *Schultz-Dale*'schen Versuche bei 7 geprüften Tieren nicht auslösen, trotzdem diese 7 Tiere nachgewiesenermassen auf 4-Succinanilsäure-azo-protein anaphylaktisiert waren. Hier liegt eine, wie es scheint, sehr wichtige Differenz zwischen den klassischen Anaphylaxieversuchen von *Landsteiner* und *van der Scheer*²⁾ und unseren *Schultz-Dale*'schen Versuchen vor. Wir kommen auf diesen Punkt gleich wieder zurück.

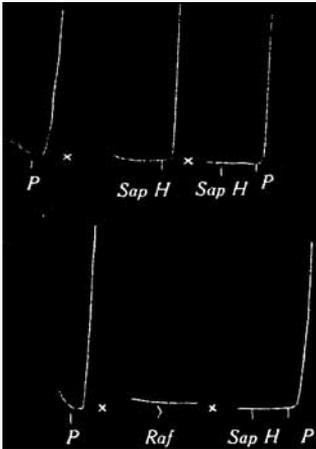


Fig. 2.

Meerschweinchen 1805; vorbehandelt mit 4-Succinanilsäure-azo-protein (Pferd). Versuch am 45. Tag nach Beginn der Vorbehandlung.

P = 1 cm³ Pituglandol 1:250.

x = Spülen.

Sap H = 0,5 cm³ 4-Succinanilsäure-azo-protein (Huhn) 1-proz.

Raf = 0,5 cm³ Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin (hergestellt nach *Landsteiner* u. *van der Scheer*) 1-proz.

Anmerkung: Eine ansteigende Kurve zeigt eine Kontraktion an.

3. In drei Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin die spezifische Reaktionsfähigkeit des Uterus auf eine nachfolgende Azoproteingabe aufhob, dass sich also in diesen Versuchen Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin analog verhielt wie der „Naphtholfarbstoff“ in den Versuchen von *W. Jadassohn* und *Schaaf*¹⁾. In vier Versuchen aber „neutralisierte“ Bis-p-

¹⁾ *Jadassohn W.* und *Schaaf*, Arch. Derm. Syph. **170**, 33 (1934); Schweiz. med. Wochschr. **33**, 737 (1935).

²⁾ *Landsteiner* und *van der Scheer*, J. Exp. Med. **56**, 399 (1932); **57**, S. 633 (1933).

succinanilsäure-azo-resorcin nicht. Analoge Differenzen fand *W. G. Stoll*¹⁾ in seinen Versuchen mit Atoxyl-azofarbstoffen. Deswegen sollen diese Resultate hier nur registriert werden. Sie werden später diskutiert werden.

4. Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin wurde mit Meerschweinchen-serum gemischt, 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen und bei fünf auf 4-Succinanilsäure-azo-protein (Huhn) anaphylaktischen Tieren geprüft. In einem Falle löste das Gemisch eine positive Reaktion aus und das geprüfte Uterushorn erwies sich nachher auf 4-Succinanilsäureazo-protein (Huhn) neutralisiert. Bei vier Tieren erwies sich das Gemisch als unwirksam. Auf diesen Versuch kommen wir später nochmals zurück.

Das Hauptresultat dieser Versuche ist die Feststellung, dass bei den auf das entsprechende Azoprotein überempfindlichen Tieren mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin keine Reaktion ausgelöst werden konnte. Dies widerspricht, wie schon erwähnt, den Versuchen von *Landsteiner* und *van der Scheer*²⁾, bei denen der anaphylaktische Schock als Test angewendet wurde.

Nachdem *H. E. Fierz*, *W. Jadassohn* und *W. G. Stoll*³⁾ nachgewiesen haben, dass 2-carboxyl-4-sulfon-diazoaminobenzol-4'-arsinsaures Natrium sich im Organismus umkuppelt und dass im Organismus ein Azoprotein (4-Phenylarsinsäure-azo-protein (Meerschweinchen)) entsteht, haben wir uns die Frage vorlegen müssen, ob die Differenz zwischen den Versuchen von *Landsteiner* und *van der Scheer*²⁾ und unsern eigenen Versuchen nicht darauf beruhen könnte, dass in den Versuchen *Landsteiner's* das Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin, das intravenös injiziert wurde, sich auf dem Wege zum Schockorgan umkuppelte und dass das, was den Schock auslöste, nicht mehr Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin war, sondern 4-Succinanilsäure-azo-protein (Meerschweinchen). Es wäre dann ohne weiteres klar, dass in unsern Versuchen, in denen das Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin direkt an das Schockorgan herangebracht wurde, also keine Gelegenheit hatte sich umzukuppeln, eine Reaktion auftreten konnte. Um diese Hypothese zu stützen, wurden Umkupplungsversuche mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin angestellt.

Umkupplungsversuche mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin.

Über die ersten solchen Versuche wurde oben bereits referiert, denn bei der Mischung von Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin mit Meerschweinchenserum und bei der Prüfung im *Schultz-Dale's*chen

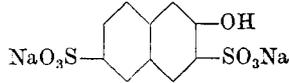
¹⁾ *Stoll*, Diss. E. T. H. (in Bearbeitung).

²⁾ *Landsteiner* und *van der Scheer*, Exp. Med. **56**, 399 (1932); **57**, S. 633 (1933).

³⁾ *Fierz H. E.*, *W. Jadassohn* und *W. G. Stoll*, J. Exp. Med. (im Druck).

Versuch handelte es sich bereits um solche Versuche. Diese Versuche erlauben aber noch keinen Schluss. Ein Versuch kann so gedeutet werden, dass eine solche Umkupplung stattfand. Vier analog angestellte Versuche sind aber negativ ausgefallen.

Es wurden nun zuerst eine Anzahl Umkupplungsversuche in vitro angestellt, aber nicht mit Proteinen, sondern mit R-Salz.



Umkupplungsversuche in vitro.

Diese waren zunächst rein qualitativ und wurden in der Weise ausgeführt, dass das Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin in soda-alkalischer R-Salzlösung gelöst, und einige Zeit auf 35—40° erwärmt wurde.

Zum Erkennen der Umkupplung wurde der Umstand zunutze gezogen, dass der Farbstoff aus 4-Amino-succinanilsäure und R-Salz auch im sauren Medium löslich ist, während Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin beim Ansäuern der Lösung ausfällt. Diese qualitativen Untersuchungen zeigten nun, dass bei Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin tatsächlich eine Umkupplung stattfindet, und zwar deutlich schon nach 20 Minuten.

Quantitative Untersuchung.

Diese wurde in der Weise ausgeführt, dass

- 500 mg R-salz
- + 3 cm³ Wasser
- + 7 cm³ 2-n. Sodalösung
- + 100 mg Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin

10 Tage lang auf 37° erwärmt wurden. Nach dieser Zeit wurde die Lösung filtriert und das Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin daraus gefällt und durch mehrfaches Umfällen gereinigt. Dann wurde es bei 50° im Vakuum über Calciumchlorid getrocknet und analysiert, um die Veränderung des Stickstoffwertes zu untersuchen.

| | | |
|---|--------------|---------------|
| C ₂₆ H ₂₄ O ₈ N ₆ | Ber. N 15,34 | Gef. N 13,04% |
| Vor der Umkupplung | | Gef. N 15,00% |

Umkupplungsversuche in vivo (*Schultz-Dale'sche* Versuche an mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin vorbehandelten Meerschweinchen).

Nach den Versuchen von *H. E. Fierz*, *W. Jadassohn* und *W. G. Stoll*¹⁾ mit dem 2-carboxyl-4-sulfon-diazoaminobenzol-4'-arsinsäuren Natrium lag es ausserordentlich nahe, das Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin auf Umkupplung in vivo in folgender Weise zu untersuchen: Wenn Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin in vivo zu dem entsprechenden Azoprotein umkuppelt, so war nach den oben erwähnten Unter-

¹⁾ *Fierz H. E., W. Jadassohn und W. G. Stoll, J. Exp. Med. (im Druck).*

suchungen zu erwarten, dass mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin vorbehandelte Meerschweinchen sich nachher als auf 4-Succinanilsäure-azo-protein überempfindlich erweisen würden (Sensibilisierung durch das im Körper entstandene 4-Succinanilsäure-azo-protein (Meerschweinchen)). Es wurde daher 8 Meerschweinchen Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin intraperitoneal injiziert (am 1. Tag 3 cm³, am 7. Tag 3 cm³, am 14. Tag 3 cm³ und am 21. Tag 6 cm³ 1-proz. Lösung).

Resultat.

Das Hauptresultat dieser Versuchsserie ist folgendes: Von den vorbehandelten Tieren erwiesen sich alle acht als auf 4-Succinanilsäure-azo-protein (Huhn) anaphylaktisiert, nicht aber auf Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin. Bei einem Tier war das Resultat fraglich. Die oben wiedergegebene Voraussetzung trifft also tatsächlich zu, d. h. es ist erwiesen, dass sich Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin in vivo in 4-Succinanilsäure-azo-protein (Meerschweinchen) umwandelt. Damit scheint auch erklärt, wieso es *Landsteiner* und *van der Scheer*¹⁾ gelungen ist, mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin ohne Eiweiss-Schiene den anaphylaktischen Schock auszulösen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass das, was in den *Landsteiner*'schen Versuchen den Schock auslöste, gar nicht das Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin, sondern das auf dem Wege zum Schockorgan entstandene 4-Succinanilsäure-azo-protein (Meerschweinchen) war.

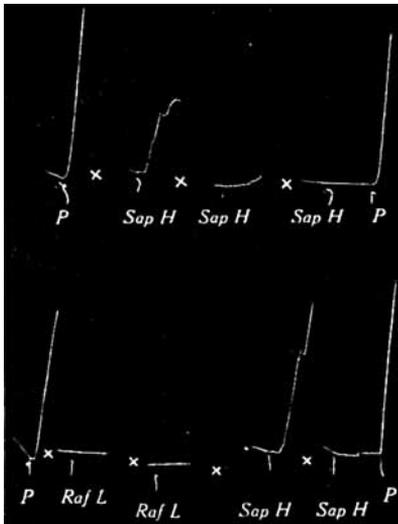


Fig. 3.

Meerschweinchen 677; vorbehandelt mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin (nach *Landsteiner* und *van der Scheer* hergestellt). Versuch am 47. Tag nach Beginn der Vorbehandlung.

P = 1 cm³ Pituglandol 1:250.

x = Spülen.

Sap H = 1 cm³ 4-Succinanilsäure-azo-protein (Huhn) 1-proz.

Raf L = 1 cm³ Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin (hergestellt nach *Landsteiner* u. *van der Scheer*) 1-proz. Lösung.

Anmerkung: Eine ansteigende Kurve zeigt eine Kontraktion an.

¹⁾ *Landsteiner* und *van der Scheer*, J. Exp. Med. 56, 399 (1932); 57, S. 633 (1933).

Wenn es *Landsteiner* und *van der Scheer*¹⁾ mit zwei chemisch bekannten Substanzen im Gegensatz zu allen früheren Versuchen gelang, den anaphylaktischen Schock auszulösen, so beruht dieses hochinteressante Phänomen nicht etwa darauf, dass hier eine Eiweiss-Schiene zur Auslösung des anaphylaktischen Schocks überflüssig ist, sondern darauf, dass diese Eiweiss-Schiene im Organismus an die chemisch bekannte Substanz angehängt wird²⁾.

Dadurch ist auch erklärt, dass im *Schultz-Dale*'schen Versuch, in dem das Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin direkt ans Schockorgan gelangt und keine Gelegenheit hat, sich auf dem Wege dahin umzukuppeln, mit dieser Substanz eine Reaktion nicht erzielt werden kann; und zwar weder, wie schon erwähnt, bei den mit 4-Succinanilsäure-azo-protein sensibilisierten Tieren, noch bei den 6 geprüften Tieren der letzten Versuchsreihe.

Versuche mit einem anders hergestellten Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin.

Es ist bei der sonst grossen Stabilität der Mono- und Disazofarbstoffe eine auffällige Feststellung, dass sich ein solches Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin in vitro und in vivo umkuppeln kann. Zur Auslösung des anaphylaktischen Schocks muss diese Umkuppelung zudem, wenn auch nur zu einem kleinen Teil, innerhalb ganz kurzer Zeit erfolgen. Wir zogen nun die Möglichkeit in Betracht, dass man vielleicht das Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin auf andere Art so herstellen könnte, dass es in seinem Verhalten vom *Landsteiner*'schen abweichen würde.

Es ist nämlich bekannt, dass man bei der Herstellung von Disazofarbstoffen von dieser Art in der Technik auf gewisse Schwierigkeiten stossen kann. Wir verweisen auf das Beispiel des Dianilbrauns 3 G N, wo man die Kupplung von Diazosulfanilsäure mit m-Phenylendiamin zu Sulfochrysoidin G unter sorgfältiger Einhaltung von bestimmten Bedingungen ausführen muss, um einen richtigen Moncazofarbstoff zu erhalten, der für die Herstellung von Polyazofarbstoffen brauchbar ist (*Fierz*)^{3) 4)}.

1) *Landsteiner* und *van der Scheer*, J. Exp. Med. **56**, 399 (1932); **57**, S. 633 (1933).

2) In diesem Zusammenhang scheint es wichtig, auf die erst nach Abschluss dieser Arbeit erschienene Publikation von *Landsteiner* und *Jacobs*⁵⁾ hinzuweisen, in der gezeigt werden konnte, dass eine Vorbehandlung von Meerschweinchen mit Cl- und NO₂-substituierten Benzolen zur Bildung von Vollantigenen mit dem körpereigenen Eiweiss führt.

Es sei hier auch auf eine ältere Arbeit von *Klopstock* und *Selter*⁶⁾ hingewiesen, die durch Injektion des Diazoniumkörpers von Atoxyl Anaphylaxie erzeugt haben. In diesen Versuchen handelt es sich im Gegensatz zu unsern Versuchen nicht um Umkuppelung.

3) *Fierz H. E.*, Grundlegende Operat. d. Farbenchemie, Berlin, *Springer*, 1924.

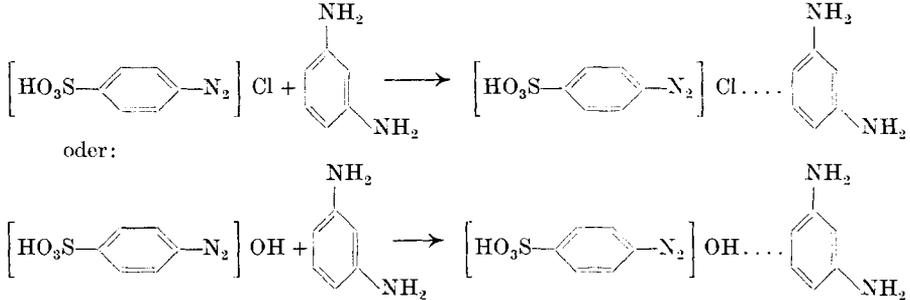
4) *Fierz H. E.*, Künstl. org. Farbst. (III. Band aus *Herzog*: Technologie der Textilfasern). Berlin, *Springer* 1926.

5) *Landsteiner* und *Jacobs*, J. Exp. Med. **61**, 643 (1936).

6) *Klopstock* und *Selter*, Klin. Wochschr. **6**, 35, 1662 (1927).

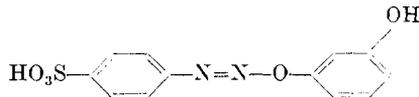
Bei der Vereinigung einer Diazoverbindung mit einem Amin, Phenol oder deren Derivaten entsteht nämlich zuerst eine Additionsverbindung:

Beispiel:



Man kann bestimmt annehmen, dass diese Additionsverbindung entsteht, doch ist man über ihre Art noch im unklaren. Diese Additionsverbindung gibt keinen brauchbaren Disazofarbstoff. Bei längerer Dauer geht die Additionsverbindung über in eine andere Verbindung, die *Fierz*¹⁾ als die Diazoamidverbindung betrachtet. Auch dieser Körper gibt noch keinen brauchbaren Disazofarbstoff. Erst nach sehr langer Kupplungsdauer erscheint der richtige Azokörper, welcher zu einem richtigen Disazofarbstoff weiterverarbeitet werden kann. Alle diese Stadien wurden von *Fierz*¹⁾ beschrieben und durch Mikrophotographien der verschiedenen intermediär erscheinenden Krystallformen belegt. Diese können nicht immer beobachtet werden, da sich unter bestimmten Verhältnissen aus der ersten Additionsverbindung direkt der Azokörper bildet, was jedoch auch im besten Falle mindestens 6 Stunden dauert.

Bei der Kupplung mit Resorcin liegen die Verhältnisse im allgemeinen ähnlich wie beim m-Phenylendiamin, nur dass statt der intermediären Diazoamidverbindung der Diazoäther entstehen kann:

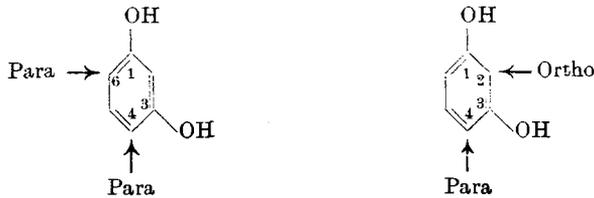


Wenn die Kupplungsdauer nur eine halbe Stunde beträgt, wie das *Landsteiner* und *van der Scheer* angeben, so könnte die Kupplung eventuell den von den Farbstofftechnikern gefürchteten Verlauf nehmen, dass kein einheitlicher Disazofarbstoff von der angegebenen Konstitution entsteht. Es ist nicht vorauszusehen, welcher Art der entstehende Körper ist. Da die Stickstoffanalysen von *Landsteiner* und *van der Scheer*²⁾ für diesen Disazofarbstoff innerhalb der Fehler-

¹⁾ *Fierz H. E.*, Künstl. org. Farbst. (III. Band aus *Herzog*: Technologie der Textilfasern), Berlin, *Springer* 1926.

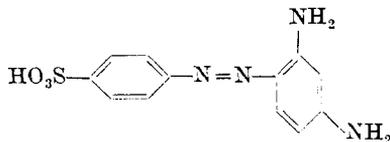
²⁾ *Landsteiner* und *van der Scheer*, *J. Exp. Med.* **56**, 399 (1932); **57**, S. 633 (1933).

grenzen liegen, was wir bestätigen konnten, müsste der Unterschied in der Isomerie liegen. Es wäre z. B. denkbar, dass ein in Säure unter Umständen ziemlich beständiger Diazoäther entstehen würde. Selbstverständlich braucht das nur zum Teil so zu gehen, um eine, von den normalen Azofarbstoffen verschiedene, biologische und chemische Wirkungsweise des *Landsteiner'schen* Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcins zu veranlassen. Zwischen zwei auf die eine und die andere Art hergestellten Farbstoffen könnten auch stellungs-isomere Differenzen entstehen in der Art, dass in einem Fall die Diazokörper in die beiden Parastellungen zu den beiden Oxygruppen des Resorcins eintreten, was nach den allgemeinen Regeln wahrscheinlich wäre, oder dann im andern Fall die eine der beiden Parastellungen frei bleiben würde und die Diazokörper in die 2,4-Stellungen eintreten würden.



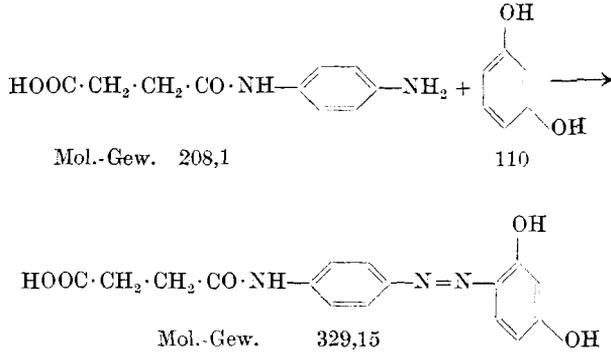
Es ist natürlich nicht leicht möglich, auf chemischem Wege diese Vermutung auf die eine oder andere Seite hin zu beweisen, in erster Linie deshalb, weil es uns bisher unmöglich war, diese eventuell unstablen Verbindungen von der Hauptmasse des wahrscheinlich indifferenten Farbstoffs zu trennen. Leider war es auch nicht möglich, einen dem Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcins von *Landsteiner* entsprechenden Diazoäther rein darzustellen. Das gleiche gilt für die Stellungsisomeren. Wir sind aber überzeugt, dass man die Versuche in dieser Richtung noch ausdehnen muss.

Auf Grund dieser Erwägungen kamen wir zu dem Schluss, es sei das Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcins unter Verwertung der technischen Erfahrungen noch einmal nach den in der Technik gebräuchlichen Methoden aufs sorgfältigste herzustellen und zu prüfen, ob dieser neue Disazofarbstoff sich in seinem biologischen und chemischen Verhalten von demjenigen von *Landsteiner* unterscheide. Wir stellten daher das Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcins in enger Anlehnung an das Beispiel von Sulfochrysoidin (*Fierz*) her. Wir lassen



hier gleich die Methode folgen:

I. Herstellung des Monoazofarbstoffes (p-Succinanilsäure-azo-resorcin):

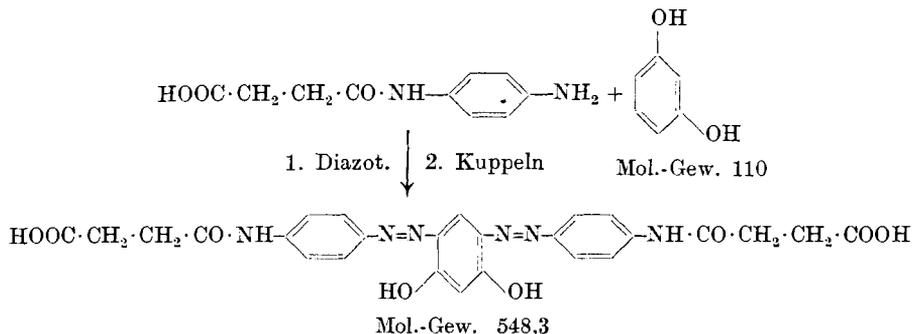


4,16 g 4-Amino-succinanilsäure wurden in 30 cm³ Wasser und 5 cm³ 2-n. Salzsäure gelöst, auf 0—5° abgekühlt und durch langsames Zutropfen von 20 cm³ n. Natriumnitritlösung diazotiert. Die Diazotierung wurde mit Kongo- und Kaliumjodidstärkepapier kontrolliert. Unterdessen wurden 2,20 g frisch destilliertes Resorcin in 200 cm³ Wasser gelöst, und auf 0—5° abgekühlt. Darauf wurde die Lösung des Diazoniumchlorids mit Natriumacetat abgestumpft, bis sie nicht mehr kongosauer reagierte, und langsam zur gut gerührten, neutralen Resorcinlösung getropft. Die Kupplung trat sofort ein. Die Lösung wurde zuerst gelb, dann rot, und bald schied sich ein ziegelroter Farbstoff aus. Es wurde durch Zugabe von kleinen Portionen Natriumacetat dafür gesorgt, dass die Azidität nie auf kongosauer stieg. Der Reaktionsverlauf wurde durch Tupfproben auf Filtrierpapier mit alkalischer R-Salzlösung verfolgt. Die Diazo-reaktion war nach einer Stunde verschwunden. Dennoch wurde noch eine Stunde bei 0—5° weitergerührt, darauf mit Soda versetzt, bis fast zur neutralen Reaktion und dann über Nacht die Temperatur auf 20° ansteigen gelassen. Am andern Tag wurde noch eine Stunde lang bei 40° gerührt und nachher durch Zugabe von 20 cm³ 37-proz. Salzsäure und 300 cm³ gesättigter Kochsalzlösung der Farbstoff ausgefällt, abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Dann wurde er nochmals mit Soda gelöst, filtriert und mit Salzsäure wieder gefällt. Nun wurde wieder abgesaugt, mit Wasser gewaschen und im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet.

Ausbeute: 5,9 g = 90% der Theorie.

C₁₆H₁₅O₅N₃ Ber. N 12,84 Gef. N 12,58%

II. Herstellung von Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin.
(Disazofarbstoff, hergestellt aus dem entsprechenden
Monoazofarbstoff.)



6,6 g 4-Succinanilsäure-azo-resorcin wurden in 200 cm³ Wasser und 5 cm³ 2-n. Sodalösung gelöst, und auf 0—5° abgekühlt. Darauf wurden 4,16 g 4-Amino-succinanilsäure diazotiert und wie oben unter gutem Rühren zur alkalischen Lösung des Monoazofarbstoffes getropft. Die Kupplung ging ziemlich träge vonstatten, was wiederum durch Tupfproben mit alkalischer R-Salzlösung kontrolliert wurde. Die Diazoreaktion war erst nach 2 Stunden verschwunden. Nun wurde das Reaktionsgemisch bei allmählich steigender Temperatur über Nacht stehengelassen. Am andern Tag wurde die Farbstofflösung mit Wasser auf 700 cm³ verdünnt, filtriert, nachher unter Rühren mit 2-n. Salzsäure ausgefällt und auf der Nutsche abgesaugt. Darauf wurde das entstandene Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin nochmals mit Ammoniak in Lösung gebracht, wieder gefällt, gründlich gewaschen und zum Schluss im Vakuum über konz. Schwefelsäure getrocknet.

Ausbeute: 10,4 = 95% der Theorie.

| | | | | |
|---|--------------|--------|----------|-------------|
| C ₂₆ H ₂₄ O ₈ N ₆ | Ber. C 56,90 | H 4,41 | N 15,34% | |
| | Gef. „ 57,22 | „ 4,53 | „ 15,32 | Asche 0,33% |

Wir machten die Beobachtung, dass das Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin, hergestellt nach der Methode von *Landsteiner* und *van der Scheer*¹⁾, beim Verdünnen mit starkem Alkali eine violette bis blaue Farbe annimmt. Dieser Effekt ist bei dem nach der neuen Methode hergestellten Körper nicht erzielbar. Er behält seine Farbe auch bei dieser Behandlung bei. Das brachte uns die Gewissheit, dass bestimmte Unterschiede zwischen den beiden Präparaten bestehen und wenn sie auch nur auf dem Reinheitsgrad beruhen. Dafür sprechen auch die Analysenresultate.

¹⁾ *Landsteiner* und *van der Scheer*, J. Exp. Med. **56**, 399 (1932); **57**, S. 633 (1933).

Umkupplungsversuche mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin, hergestellt nach unserer Methode zum Vergleich mit dem entsprechenden Landsteiner'schen Körper.

In vitro:

Diese wurden in der genau gleichen Weise ausgeführt wie bei den oben beschriebenen Umkupplungsversuchen. Bei der qualitativen Untersuchung zeigte es sich, dass auch der neue Disazofarbstoff, wenn auch nur in viel geringerem Masse, mit R-Salz umkuppeln kann.

Quantitative Untersuchung:

500 mg R-salz
+ 3 cm³ Wasser
+ 7 cm³ 2-n. Sodalösung
+ 100 mg Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin

wurden 10 Tage lang auf 37° erwärmt. Darauf in der gleichen Weise wie oben beim Landsteiner'schen Disazofarbstoff gefällt und gereinigt.

C₂₆H₂₄O₈N₆ Ber. N 15,34 Gef. N 15,02%
Vor der Umkupplung N 15,32%

Aus diesen quantitativen Umkupplungsversuchen ergibt sich im Verein mit den vorher angeführten Resultaten, dass der von Landsteiner und van der Scheer¹⁾ hergestellte Farbstoff in vitro viel leichter umkuppelt als der nach den Methoden der Technik hergestellte. Der Unterschied wird gezeigt durch das Absinken des Stickstoffwertes durch die Behandlung mit R-salzlösung. Diese Verminderung des Stickstoffgehaltes beträgt beim Landsteiner'schen Produkt 1,96, während der Gehalt beim andern Produkt nur um 0,30 erniedrigt wird.

In vivo:

(Schultz-Dale'sche Versuche an mit dem nach technischen Methoden hergestellten Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin vorbehandelten Meerschweinchen.)

8 Meerschweinchen wurden, genau entsprechend denjenigen, welche mit dem Landsteiner'schen Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin vorbehandelt worden waren, mit dem nach technischen Methoden hergestellten Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin vorbehandelt und im Schultz-Dale'schen Versuch wiederum vollkommen entsprechend jener Serie von Tieren mit 4-Succinanilsäure-azo-protein (Huhn) geprüft. Von den 8 untersuchten Tieren erwies sich nur eines als auf 4-Succinanilsäure-azo-protein sensibilisiert, bei einem war die Reaktion fraglich und bei allen andern negativ. Die beiden Disazofarbstoffe, die in bezug auf ihre Bruttoformeln identisch sein sollten, unterscheiden sich also nicht nur durch die Farbveränderung in starkem

¹⁾ Landsteiner und van der Scheer, J. Exp. Med. 56, 399 (1932); 57, S. 633 (1933).

Alkali und durch die verschieden starke Umkupplung mit R-salz, sondern vor allem durch ihre Umkupplungsfähigkeit im Organismus des Meerschweinchens.

Ein weiterer Unterschied zwischen diesen beiden Produkten sei hier nebenbei erwähnt. Bei den mit *Landsteiner's* Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin vorbehandelten Tieren erwies sich der Uterus bei der Sektion als sehr deutlich rot-blau gefärbt, während dies bei den mit dem neuen Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin vorbehandelten Tieren gar nicht der Fall war (auch das mit dem neuen Farbstoff auf 4-Succinanilsäure-azo-protein (Huhn) anaphylaktisierte Tier zeigte keine Färbung des Uterus). Eine genauere Analyse dieser sehr interessanten Vitalfärbung ist im Gange.

Zusammenfassung.

1. Es wurde z. T. nach *Landsteiner* und *van der Scheer*, z. T. nach andern Verfahren 4-Nitro-succinanilsäure, 4-Amino-succinanilsäure, 4-Succinanilsäure-azo-resorcin, Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin und 4-Succinanilsäure-azo-proteine hergestellt.

2. Bei mit 4-Succinanilsäure-azo-protein (Pferd) vorbehandelten Meerschweinchen fällt der *Schultz-Dale'sche* Versuch mit 4-Succinanilsäure-azo-protein (Huhn) positiv aus, während mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin im *Schultz-Dale'schen* Versuch keine Reaktion erzielt werden kann. (Gegensatz zu den Versuchen von *Landsteiner* und *van der Scheer*¹⁾, in denen mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin anaphylaktischer Schock ausgelöst werden konnte.)

3. Werden Meerschweinchen mit dem nach *Landsteiner's*¹⁾ Vorschrift hergestellten Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin vorbehandelt, so erweisen sich diese Tiere im *Schultz-Dale'schen* Versuch auf 4-Succinanilsäure-azo-protein sensibilisiert, nicht aber auf Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin.

4. Es wurden in vitro Versuche gemacht, die eindeutig zeigten, dass Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin in alkalischer R-salzlösung umkuppeln kann.

5. Das nach der Vorschrift von *Landsteiner* und *van der Scheer*¹⁾ hergestellte Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin löste sich in viel konzentriertem Alkali mit violetter Farbe, während das nach unsrer Methode hergestellte bei gleicher Behandlung orangerot blieb.

6. Die beiden Farbstoffe zeigen auch bei den Umkupplungsversuchen in vitro mit R-salz ein verschiedenes Verhalten.

7. Mit dem nach den Methoden der Industrie hergestellten Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin vorbehandelte Meerschweinchen

¹⁾ *Landsteiner* und *van der Scheer*, J. Exp. Med. **56**, 399 (1932); **57**, S. 633 (1933).

sind im Gegensatz zu den mit dem nach *Landsteiner* und *van der Scheer*¹⁾ hergestellten Produkt nur ausnahmsweise auf 4-Succinanilsäure-azo-protein sensibilisiert.

Aus diesen Versuchen muss der Schluss gezogen werden, dass das nach *Landsteiner* und *van der Scheer*¹⁾ hergestellte Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin in vivo in 4-Succinanilsäure-azo-protein umkuppelt. Daraus ergibt sich, dass die von *Landsteiner* und *van der Scheer* festgestellte schockauslösende Wirkung des Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcins nicht direkt auf diese chemisch bekannte Substanz, sondern auf das in vivo auf dem Wege zum Schockorgan entstehende Umkupplungsprodukt 4-Succinanilsäure-azo-protein (Meerschweinchen) zurückzuführen sein dürfte.

Solche Umkupplungen im Organismus erscheinen uns von grossem biologischem Interesse (vgl. *H. E. Fierz-David, W. Jadassohn* und *W. Stoll*)²⁾.

Der Eidgen. Volkswirtschaftstiftung, sowie Frau Prof. Dr. *Bruno Bloch* möchten wir auch an dieser Stelle für die finanzielle Förderung unserer Untersuchungen den besten Dank aussprechen.

Organisch-technisches Laboratorium der Eidg. Techn. Hochschule und Dermatologische Klinik der Universität Zürich.

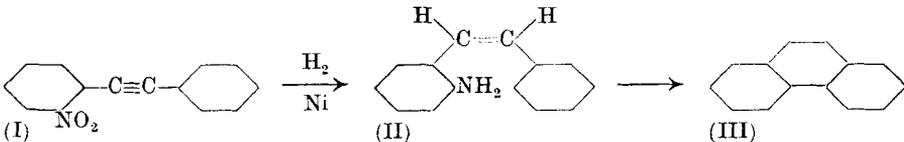
3. Stereoisomere o-Nitro- und o-Amino-stilbene, o-Amino-dibenzyl und Ringschluss zu Phenanthren bzw. Dihydro-phenanthren II

(4. Mitteilung über cis-trans-isomere Stilbene³⁾)

von Paul Ruggli und Alfred Staub.

(17. XII. 36.)

Vor kurzem haben wir gezeigt³⁾, dass durch partielle katalytische Hydrierung von o-Nitro-tolan (I) ein öliges Amin entsteht, in welchem die cis-Form des o-Amino-stilbens (II) vorliegt. Diese lässt sich — im Gegensatz zur trans-Form — durch Diazotieren und Behandeln mit Kupferpaste in Phenanthren (III) überführen.



¹⁾ *Landsteiner* und *van der Scheer*, *J. Exp. Med.* **56**, 399 (1932); **57**, S. 633 (1933).

²⁾ *H. E. Fierz, W. Jadassohn* und *W. G. Stoll*, *J. Exp. Med.* im Druck.

³⁾ Letzte Mitteilung *Helv.* **19**, 1288 (1936).