

immer die Ausführung einer Serie von Parallelbestimmungen. Dadurch kann die Ungenauigkeit leicht auf die Hälfte reduziert werden, auf  $\pm 2$  bis 5%.

Als Vorteile unseres Verfahrens gegenüber jenem von *Scheibe* und *Rivas* möchten wir folgende Punkte hervorheben:

1. Das Untersuchungsmaterial wird der Anregung zeitlich gleichmässig zugeführt. Denn im Gegensatz zum Verfahren von *Scheibe* und *Rivas* wird bei uns effektiv aus dem Lösungszustand angeregt. Als Lösungsmittel fungiert Gelatine-Wasser-Gel. Die Elementverteilung ist in diesem so stabilisiert und der Hochfrequenzfunken in thermischer und elektrolytischer Beziehung so harmlos, dass mit dem gleichmässigen und verfolgbareren Aufzehren des Gel-Körpers durch den Funken auch eine absolut gleichmässige Anregung der darin eingelagerten Elemente in der Funkenbahn erfolgt.
2. Auch bei an sich recht reinen Kohle-elektroden ist die Gefahr zufälliger lokaler Beimengungen immer gegeben. Unsere Gel-Körper enthalten kleine Mengen Kupfer und erlauben deshalb keine Bestimmung kleinster Mengen dieses Elements. Ein Auftreten zufälliger, unkontrollierbarer Verunreinigungen ist aber nie zu befürchten.
3. Die Gel-Scheiben fassen rund 10 mal mehr Flüssigkeit als die Kohle-elektroden. Nötigenfalls werden aber auch kleinste Flüssigkeitsmengen vollständig homogen aufgenommen.

Chemische Abteilung des Pathologischen  
Instituts der Universität Basel.

---

### 136. Azofarbstoffe und Immunbiologie.

#### Aufhebung anaphylaktischer Azoprotein-Überempfindlichkeit durch p-Phenyl-arsinsäure-azofarbstoffe

von H. E. Fierz, W. Jadassohn und W. G. Stoll.

(28. VIII. 37.)

*Landsteiner*<sup>1)2)</sup>, *Landsteiner* und *Levine*<sup>3)</sup> haben nachgewiesen, dass es gelingt, bei mit Azoproteinen vorbehandelten Meerschweinchen durch nachträgliche Injektion von Azofarbstoffen zu verhindern, dass die Tiere im anaphylaktischen Schock zugrunde gehen. Voraussetzung ist, dass dieser schockverhindernde, „neutralisierende“

---

<sup>1)</sup> *Landsteiner*, J. Exp. Med. **39**, 631 (1924).

<sup>2)</sup> *Landsteiner*, The Specificity of Serological Reactions, Baltimore 1936.

<sup>3)</sup> *Landsteiner* und *Levine*, J. Exp. Med. **52**, 347 (1930).

Farbstoff dem Haptenbestandteil<sup>1)</sup> des Azoproteins vollkommen entspricht (vgl. S. 1068). Diese Autoren haben mit diazotierter p-Arsanilsäure, gekuppelt an Tyrosin oder p-Oxybenzoesäure, und diazotierter *d*- und *l*-p-Amino-tartranilsäure, gekuppelt an Resorcin, gearbeitet.

In allen diesen Versuchen konnte also eine anaphylaktische Überempfindlichkeit spezifisch aufgehoben werden durch Substanzen, die selber nicht imstande sind, anaphylaktische Reaktionen auszulösen. Es ist ganz klar, dass sich die klinische Medizin für solche Substanzen resp. für solche „Neutralisationsphänomene“ sehr stark interessieren muss. Wenn auch die in der Klinik beobachteten Überempfindlichkeitsreaktionen sicher nicht ohne weiteres in globo mit der Anaphylaxie identifiziert werden dürfen (wir können hierauf nicht näher eingehen, vgl. u. a. *W. Jadassohn*<sup>2)</sup>), so ist der anaphylaktische Schock des Meerschweinchens für den Kliniker doch von sehr grosser Bedeutung als Modellreaktion für die sogenannten allergischen Überempfindlichkeitsreaktionen des Menschen.

Zum besseren Verständnis dieser Überlegungen möchten wir ein Beispiel anführen. Bei der Salvarsantherapie werden gelegentlich Zwischenfälle beobachtet, welche auf spezifische Salvarsan-Überempfindlichkeit zurückzuführen sind. Es ist möglich, dass, wenigstens ein Teil dieser Reaktionen auf Salvarsan, dadurch zustande kommt, dass der Organismus, durch eine sich im Organismus bildende Salvarsan-Eiweissverbindung überempfindlich gemacht, sensibilisiert wird und dass durch dieselbe wiederum im Organismus entstandene Salvarsan-Eiweissverbindung bei einer späteren Injektion die Überempfindlichkeitsreaktionen ausgelöst werden. Dass ein solcher, von *Wolff-Eisner*<sup>3)</sup> angenommener Mechanismus möglich ist, beweisen u. a. Versuche von *Landsteiner* und *Jacobs*<sup>4)</sup> und solche, die wir seinerzeit mit Diazoaminobenzol-4'-sulfon-2'-carboxyl-4-arsinsäure durchgeführt haben, auf die wir hier nur hinweisen können<sup>5)</sup>.

*Haxthausen*<sup>6)</sup> hat für das Salvarsan Versuche in dieser Richtung unternommen, allerdings nicht speziell im Hinblick auf Substanzen, welche die Salvarsan-Eiweiss-Überempfindlichkeit, ohne sie auszulösen, verhindern können. Wir hatten ursprünglich die Absicht, die *Haxthausen*'schen Versuche in dieser Richtung zu erwei-

---

<sup>1)</sup> Hapten und andere immunbiologische Begriffe wurden in einer früher erschienenen Arbeit über Azofarbstoffe und Immunbiologie kurz besprochen, worauf hier verwiesen sei; vgl. *H. E. Fierz, W. Jadassohn* und *W. F. Zürcher*, *Helv.* **20**, 16 (1937).

<sup>2)</sup> *W. Jadassohn*, 1935, Delib. XI Congress. Internat. Dermat., Vol. I, Budapest.

<sup>3)</sup> *Wolff-Eisner*, *Dermat. Zentr.* **1907**, 10.

<sup>4)</sup> *Landsteiner* und *Jacobs*, *J. Exp. Med.* **64**, 625 (1936).

<sup>5)</sup> *H. E. Fierz, W. Jadassohn* und *W. Stoll*, *J. Exp. Med.* **65**, 339 (1937).

<sup>6)</sup> *Haxthausen*, *Arch. Dermat. Syph.* **171**, 583 (1935).

tern, mussten aber vorläufig davon absehen, nachdem es *A. Margot*<sup>1)</sup> im Gegensatz zu *Haxthausen* nicht gelang, die für diese Untersuchungen notwendigen Salvarsan-Eiweissverbindungen herzustellen. Nach den ausgedehnten Untersuchungen von *A. Margot* gelingt es nämlich nicht, im Gegensatz zu zahlreichen Angaben in der Literatur<sup>2)</sup>, Salvarsan kunstgerecht zu diazotieren bzw. zu tetrazotieren. Zur Anstellung von „Neutralisationsversuchen“ erschien es uns aber, wenigstens im jetzigen Zeitpunkt, noch notwendig, mit chemisch möglichst einfachen und wohl definierten Substanzen zu arbeiten. Wir haben daher die „Neutralisationsversuche“, die *W. Jadassohn* und *Schaaf*<sup>3)</sup> in Anlehnung an die Arbeiten von *Landsteiner* durchgeführt haben, wieder aufgenommen.

*W. Jadassohn* und *Schaaf* haben nachgewiesen, dass der Farbstoff aus diazotiertem Atoxyl, gekuppelt mit  $\alpha$ -Naphthol, die anaphylaktische Reaktionsfähigkeit auf das entsprechende Azoprotein aufhebt. Diese Untersuchungen wurden aber nicht, wie die Untersuchungen von *Landsteiner* und der anderen eingangs erwähnten Autoren im „klassischen anaphylaktischen Meerschweinchenversuch“ (Schock!) ausgeführt, sondern im *Schultz-Dale*'schen Versuch (Prüfung des überlebenden, isolierten Uterus überempfindlich gemachter Meerschweinchen auf Kontraktion bei Antigenkontakt)<sup>4)</sup>.

„Die *Schultz-Dale*'sche Technik gilt“, wir zitieren *Doerr*<sup>5)</sup>, „als eine empfindliche und zuverlässige Probe, empfindlich, weil sie schon deutlich positive Resultate liefert, wenn die intravenöse Injektion beim lebenden Meerschweinchen nur leichte und zweideutige Symptome auslöst (*Walzer* und *Grove*), zuverlässig, weil sie in ihren Ergebnissen das Verhalten des ganzen Tieres getreu widerspiegelt (*Dale*, *Kellaway* und *Cowell*). In den letzten Beziehungen existieren jedoch einige Ausnahmen, die noch nicht aufgeklärt sind. Wenn man nämlich Meerschweinchen mit exzessiven Antigenosen vorbehandelt, so werden sie nicht, oder nur in verringertem Grade anaphylaktisiert; aber ihr Uterus zeigt oft eine ganz bedeutende Empfindlichkeit gegen Antigenkontakt (*Dale*, *Manwaring* und *Kusama*, *Moore*). Auch gibt es Eingriffe, welche die anaphylaktische Reaktivität von sensibilisierten Meerschweinchen auf unspezifischem Weg reduzieren, ohne die spezifische Reaktionsfähigkeit des Uterus zu beeinflussen.“

Die *Schultz-Dale*'sche Methode hat noch weitere Vorteile; wir erwähnen nur noch, dass an einem Tier zwei Versuche gemacht werden können (zwei Uterushörner) und dass der Versuchsausfall graphisch registriert wird. Auf einen Punkt möchten wir noch speziell hinweisen. Beim *Schultz-Dale*'schen Versuch gelangt die zu untersuchende Substanz direkt an das Erfolgsorgan, den Uterus heran.

<sup>1)</sup> *A. Margot*, Diss. E. T. H. (in Bearbeitung).

<sup>2)</sup> *Abelin*, Münch. med. Wchschr. **58**, 1002 (1911); *Remy*, Bioch. Z. **137**, 133 (1923); *Gaebel*, Arch. Pharm. **249**, 49 (1911).

<sup>3)</sup> *W. Jadassohn* und *Schaaf*, Arch. Dermat. Syph. **170**, 33 (1934).

<sup>4)</sup> Technik des *Schultz-Dale*'schen Versuches siehe *H. E. Fierz*, *W. Jadassohn* und *W. F. Zürcher*, Helv. **20**, 16 (1937), ferner *O. Bucher*, *W. Jadassohn* und *Schaaf*, Z. Immunitätsf. **76**, 241 (1932).

<sup>5)</sup> *Doerr*, Handbuch d. norm. u. path. Physiol. **13**, 662 u. 678 (1929).

Beim „klassischen Anaphylaxieversuch“ wird sie auf dem Blutwege zum Erfolgsorgan transportiert; während dieses Transportes kann die Substanz sich verändern und deswegen können *Schultz-Dale*'scher Versuch und „klassisches Anaphylaxieexperiment“ unter Umständen verschiedene Resultate ergeben. Ein Beispiel hierfür sind mit grosser Wahrscheinlichkeit, wie dies *H. E. Fierz*, *W. Jadassohn* und *W. F. Zürcher* gezeigt haben, Versuche mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin<sup>1)</sup>.

Wenn wir für unsere „Neutralisationsversuche“ nach der *Schultz-Dale*'schen Methode experimentiert und nicht Versuche über die Hemmung von Präzipitation in vitro angestellt haben, so hat dies seinen Grund in Folgendem. Worauf es uns ankommt, ist die Aufhebung anaphylaktischer Überempfindlichkeit; es ist nicht ohne weiteres anzunehmen, dass, wenn eine Substanz präzipitationsverhindernd wirkt (Überschusshemmung, Inhibition-Test *Landsteiner*), sie auch „neutralisierend“ wirkt, d. h. die anaphylaktische Überempfindlichkeit aufhebt. Als Beispiel möchten wir nur das Atoxyl erwähnen, welches imstande ist, im „Präzipitationsversuch“ die Präzipitation zu verhindern (*Landsteiner*<sup>2)</sup>, *Klopstock* und *Selter*<sup>3)</sup>), im „klassischen Anaphylaxieexperiment“ aber (*K. Meyer* und *Alexander*<sup>4)</sup>) und im *Schultz-Dale*'schen Versuch (*W. Jadassohn* und *Schaaf*<sup>5)</sup>) nicht „neutralisiert“. Durch solche Überlegungen wird natürlich die grosse theoretische Bedeutung des Inhibition-Test in keiner Weise geschmälert.

*W. Jadassohn* und *Schaaf*<sup>5)</sup>) hatten ihre Meerschweinchen mit Atoxyl-azo-protein vorbehandelt und zum Auslösen der anaphylaktischen Überempfindlichkeit ebenfalls Atoxyl-azo-protein verwendet, wobei sie für die Vorbehandlung Pferdeserum-Protein, zur Auslösung Hühnerserum-Protein benutzten. Als „neutralisierende“ Substanz prüften sie, wie schon erwähnt, Atoxyl-azo- $\alpha$ -naphtol. Die Autoren gingen also genau nach den Angaben von *Landsteiner* vor, und wie dieser nahmen sie an, dass ihre Azoverbindungen die Gruppe  $—N—N—$  enthielten, fassend auf den Angaben von *Pauly*<sup>6)</sup>. Dem einen von uns (*F.*) schien dies a priori nicht unbedingt sicher. Er stellte sich auf den Standpunkt, dass es auch möglich sei, dass der wirksame Bestandteil der verwendeten Azoproteine nicht die Bindung  $—N—N—$  enthalten habe, sondern die Bindung  $—NH—N—$  (Chinonhydrazon) oder die Bindung  $—N=N—NH—$  (Diazoaminoverbindung). Für den verwendeten Naphtolfarbstoff erachtete er

<sup>1)</sup> Helv. **20**, 16 (1937).

<sup>2)</sup> *Landsteiner*, Bioch. Z. **1920**, 280.

<sup>3)</sup> *Klopstock* und *Selter*, Klin. Wechschr. **1927**, I, 1662.

<sup>4)</sup> *K. Meyer* und *Alexander*, Bioch. Z. **146**, 217 (1924).

<sup>5)</sup> *W. Jadassohn* und *Schaaf*, Arch. Dermat. Syph. **170**, 33 (1934).

<sup>6)</sup> *Pauly*, Z. physiol. Ch. **42**, 512 (1904); **94**, 284 (1915).

ebenfalls die Azogruppe nicht für bewiesen, sondern hielt es für möglich, dass dieser Farbstoff in der Hydrazonform<sup>1)</sup> vorliegen könnte. Es war ein Hauptzweck der folgenden Untersuchungen, dieses Problem klar zu stellen, d. h. zu untersuchen, wie das Hapten an das Protein resp. an das  $\alpha$ -Naphtol gebunden ist.

Wir haben es als unsere Aufgabe betrachtet, zuerst einmal die früheren Versuche von *W. Jadassohn* und *Schaaf*<sup>2)</sup> genau zu wiederholen. Zu diesem Zweck haben wir verschiedene Serien von Meerschweinchen auf Azoprotein anaphylaktisiert. Wir haben hierzu zwei verschiedene Methoden verwendet:

1. die übliche, d. h. mehrfache Injektion von Azoprotein, hergestellt aus diazotierter p-Arsanilsäure und Pferdeserum (siehe S. 1071)<sup>3)</sup>;
2. Injektionen von Diazoaminobenzol-4'-sulfon-2'-carboxyl-4-arsinsäure (s. S. 1072) (in einer früheren Arbeit<sup>4)</sup> haben wir festgestellt, dass es durch Injektionen von Diazoaminobenzol-4'-sulfon-2'-carboxyl-4-arsinsäure gelingt, Meerschweinchen auf das entsprechende Azoprotein überempfindlich zu machen, weil die Diazoaminobenzol-4'-sulfon-2'-carboxyl-4-arsinsäure im Organismus umkuppelt und das so entstehende Atoxyl-azoprotein anaphylaktisierend wirkt).

Bei der genauen Wiederholung der Versuche von *W. Jadassohn* und *Schaaf*<sup>2)</sup> konnten wir deren Resultate zuerst in keiner Weise bestätigen. Der von uns hergestellte Atoxyl-azo- $\alpha$ -naphtolfarbstoff (Farbstoff I) (s. S. 1073) erwies sich mit einer einzigen Ausnahme als vollkommen unwirksam; er „neutralisierte“ nicht (Tabelle 1). Diese Divergenz zwischen den Versuchen von *W. Jadassohn* und *Schaaf* und unseren eigenen war für uns vorerst unerklärlich. Man konnte nur vermuten, dass bei *W. Jadassohn* und *Schaaf* die Bindung im Atoxyl-azo-protein und die Bindung im Azofarbstoff übereinstimmte (in beiden Fällen Azobindung oder in beiden Fällen Hydrazonbindung, daher „Neutralisation“), während jetzt die Bindungen verschieden waren (entweder beim Azoprotein  $—N=N—$  und beim Farbstoff  $—NH—N=$  oder umgekehrt).

In der Annahme, dass im Azoprotein die Bindung  $—N=N—$  vorliegt, haben wir zunächst versucht, dadurch eine „Neutralisation“ zu erreichen, dass wir die alkalische Farbstofflösung ( $p_H = 8$ ) aus Atoxyl-azo- $\alpha$ -naphtol längere Zeit bei Zimmertemperatur stehen

<sup>1)</sup> Vgl. *H. E. Fierz*, Chinon-hydrazone und Hydrazon-chinonimine aus diazotiertem Anilin oder p-Nitranilin und Phenol oder Naphtol resp. Naphtylamin, siehe *H. E. Fierz-David*, Künstliche organische Farbstoffe, Berlin 1926, S. 88, 106.

<sup>2)</sup> *W. Jadassohn* und *Schaaf*, Arch. Dermat. Syph. **170**, 33 (1934).

<sup>3)</sup> *Landsteiner* und *Lampl*, Bioch. Z. **86**, 343 (1918); **93**, 106 (1919).

<sup>4)</sup> *H. E. Fierz*, *W. Jadassohn* und *W. Stoll*, J. Exp. Med. **65**, 339 (1937).

liessen, denn es war zu erwarten, dass sich der Farbstoff bei längerem Stehen in schwach alkalischer Lösung aus der tautomeren Hydrazoneform in die Azoform umlagert. Es ist tatsächlich gelungen, mit einer solchen Farbstofflösung (Farbstoff II) nach 10-tägigem Stehenlassen die „Neutralisationsversuche“ von *W. Jadassohn* und *Schaaf* zu bestätigen (Tabelle 1). Zu den gleichen Resultaten führte die Atoxyl-azo- $\alpha$ -naphtolfarbstofflösung (Farbstoff III), die direkt nach der Kupplung, ohne Isolierung des festen Farbstoffes zur „Neutralisation“ im *Schultz-Dale*'schen Versuch verwendet wurde. Ebenso „neutralisierte“ ein Atoxyl-azo- $\alpha$ -naphtolfarbstoff (Farbstoff IV), der dadurch gewonnen wurde, dass er nach der Kupplung aus der alkalischen Lösung mit Kochsalz ausgesalzen, getrocknet und daraus eine schwach alkalische Farbstofflösung ( $p_H = 8$ ) hergestellt wurde.

Dass der Atoxyl-azo- $\alpha$ -naphtolfarbstoff tatsächlich in zwei tautomeren Formen vorliegen kann, beweist besonders deutlich ein Versuch (Fig. 1) (Tabelle 1, Tier Nr. 729), bei dem das eine Uterushorn mit dem Farbstoff III „neutralisiert“ werden konnte, während beim anderen Horn sich der Farbstoff I als unwirksam erwies, d. h. dieses Horn reagierte trotz der vorherigen Gabe des Farbstoffes I noch auf Azoprotein<sup>1</sup>).

Meerschweinchen Nr. 729.

Vorbehandlung: am 1., 7. und 14. Tag 2 cm<sup>3</sup>, am 21. Tag 4 cm<sup>3</sup> Atoxyl-azo-pferdeserumlösung intraperitoneal; am 54. Tag *Schultz-Dale*'scher Versuch: oben: rechtes Uterushorn, unten: linkes Uterushorn.

F<sub>79</sub> = 1 cm<sup>3</sup> Farbstoff III (3-proz.)

F<sub>72</sub> = 1 cm<sup>3</sup> Farbstoff I (3-proz.)

AH = 0,5 cm<sup>3</sup> Atoxyl-azo-protein (Huhn)

P = 1 cm<sup>3</sup> Pituglandol (1:250)

x = Spülen

Resultat: Das Tier ist sensibilisiert (Kontraktion auf AH), Farbstoff I „neutralisiert“ nicht, Farbstoff III „neutralisiert“.

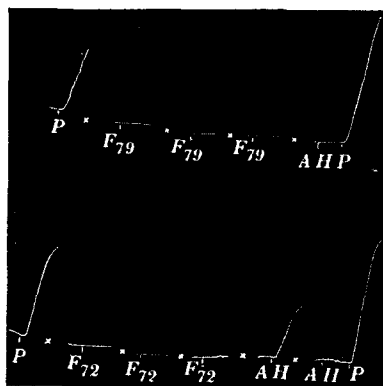


Fig. 1.

Durch diese Versuche erschien es bereits ausserordentlich wahrscheinlich, dass zur „Neutralisation“ der Azoprotein-Überempfindlichkeit ein Farbstoff mit der Gruppe  $—N=N—$  notwendig ist. Um dies sicher zu beweisen, war es notwendig, „Neutralisationsversuche“ vorzunehmen

<sup>1</sup>) Bei Tieren, welche auf Bis-p-succinanilsäure-azoprotein anaphylaktisch reagierten, konnten *H. E. Fierz*, *W. Jadassohn* und *W. F. Zürcher*, *Helv.* **20**, 16 (1937), mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin manchmal „Neutralisation“ erzielen und manchmal nicht. Es wäre noch zu untersuchen, ob auch dieser Farbstoff in der Azo- und in der Chinon-hydrazoneform sich punkto „Neutralisation“ verschieden verhält. Es ist sehr wohl möglich, dass genau die gleichen Verhältnisse vorliegen wie beim Atoxyl-azo- $\alpha$ -naphtol.

1. mit einem Azofarbstoff, bei dem es sicher ist, dass die Bindung  $\text{—N=N—}$  vorliegt, die Bindung  $\text{—NH=N—}$  aber ausgeschlossen ist,

2. mit einem Farbstoff, der sicher die Bindung  $\text{—NH—N=}$  und nicht die Bindung  $\text{—N=N—}$  besitzt.

**Tabelle 1.**  
„Neutralisationsversuche“ mit den Farbstoffen I, II, III, IV.

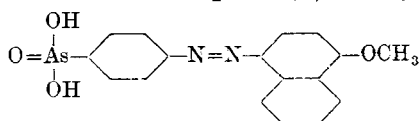
| Tier Nr.          | sensibilisiert mit                                      | auf „Neutralisation“<br>geprüfter Stoff | Ergebnis <sup>1)</sup> |
|-------------------|---|---|------------------------|
| 422               | Atoxyl-azo-Pferdeserum                                  | Farbstoff I                             | —                      |
| 713               | „   | „                                       | —                      |
| 715               | „   | „                                       | —                      |
| 716               | „   | „                                       | —                      |
| 1881              | „   | „                                       | —                      |
| 1883              | „   | „                                       | —                      |
| 1992              | „   | „                                       | —                      |
| 1993              | „   | „                                       | —                      |
| 1994              | „   | „                                       | +                      |
| 452               | Diazoaminobenzol-4'-sulfon-<br>2'-carboxyl-4-arsinsäure | „                                       | —                      |
| 453               | „   | „                                       | —                      |
| 458               | „   | „                                       | —                      |
| 459               | „   | „                                       | —                      |
| 1067              | „   | „                                       | —                      |
| 1204              | „   | „                                       | —                      |
| 719               | Atoxyl-azo-Pferdeserum                                  | Farbstoff III                           | +                      |
| 720               | „   | Farbstoff IV                            | +                      |
| 728               | „   | Farbstoff III                           | +                      |
| 729 <sup>2)</sup> | „   | „                                       | +                      |
| 729 <sup>2)</sup> | „   | Farbstoff I                             | —                      |
| 730               | „   | Farbstoff II                            | +                      |
| 731               | „   | „                                       | +                      |
| 842               | „   | Farbstoff III                           | +                      |
| 843               | „   | „                                       | —                      |
| 845               | „   | „                                       | +                      |
| 855               | „   | Farbstoff II                            | +                      |
| 868               | „   | „                                       | +                      |

Zu diesem Zweck wurden folgende chemisch reinen Farbstoffe hergestellt:

<sup>1)</sup> + : Der Farbstoff „neutralisierte“, d. h. er hob die anaphylaktische Reaktionsfähigkeit auf,  
— : der Farbstoff „neutralisierte“ nicht.

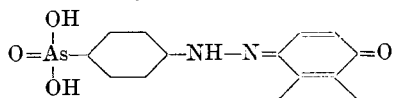
<sup>2)</sup> Vgl. Fig. 1.

1. der Methyläther des p-Phenylarsinsäure-azo-naphtolfarbstoffes [4-Phenylarsinsäure-azo-naphtol-(1)-methyläther] (s. S. 1076)



(Farbstoff V)

2. die Hydrazoneform des p-Phenylarsinsäure-azo-naphtolfarbstoffes [4-Phenylarsinsäure-hydrazon-naphtochinon-(1)] (s. S. 1075)



(Farbstoff VI)

Wie es nach vorangegangenen Versuchen zu erwarten war, „neutralisierte“ nur derjenige Farbstoff, der die Azogruppe enthält (Farbstoff V), nicht aber der Farbstoff, der in der Hydrazoneform vorliegt (Farbstoff VI) (vgl. Fig. 2) (Tabelle 2).

Meerschweinchen Nr. 6 C.

Vorbehandlung: am 1., 7., 14. Tag mit 2 cm<sup>3</sup>, am 21. Tag mit 4 cm<sup>3</sup> 1-proz. neutraler Lösung von Diazoaminobenzol-4'-sulfon-2'-carboxyl-4-arsinsäure, i. p. Am 47. Tag *Schultz-Dale'scher* Versuch: oben: rechtes Uterushorn, unten: linkes Uterushorn.

O = 1 cm<sup>3</sup> Farbstoff VI 2-proz. (Hydrazonform)

S = 1 cm<sup>3</sup> Farbstoff V 2-proz. (Azoform)

AH = 0,5 cm<sup>3</sup> Atoxyl-azo-protein (Huhn)

P = 1 cm<sup>3</sup> Pituglandol (1:250)

x = Spülen.

Resultat: Das Tier ist sensibilisiert (Kontraktion auf AH), Farbstoff VI „neutralisiert“ nicht, Farbstoff V „neutralisiert“.

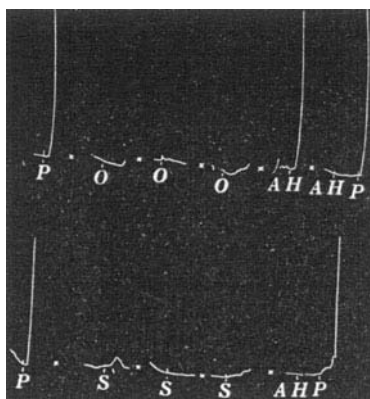


Fig. 2.

Tabelle 2.

„Neutralisationsversuche“ mit den Farbstoffen V und VI.

Die Tiere sind sensibilisiert auf Atoxyl-azo-Protein.

| Tier Nr.          | auf „Neutralisation“ geprüfter Stoff | Ergebnis <sup>1)</sup> |
|-------------------|--------------------------------------|------------------------|
| 2 C               | Farbstoff V (—N=N—)                  | +                      |
| 4 C               | „ (—N=N—)                            | +                      |
| 6 C <sup>2)</sup> | „ (—N=N—)                            | +                      |
| 6 C <sup>2)</sup> | Farbstoff VI (—NH—H=)                | —                      |
| 5 C               | „ (—NH—N=)                           | —                      |
| 1461              | „ (—NH—N=)                           | —                      |

<sup>1)</sup> Vgl. Anm. <sup>1)</sup>, S. 1065.

<sup>2)</sup> Vgl. Fig. 2.



Durch diese Versuche ist nun auch bewiesen, dass die weiter oben erwähnte Annahme von *Pauly, Landsteiner* u. a. zutrifft, d. h. dass die Azoproteine tatsächlich die Bindung  $—N—N—$  besitzen. Es ist möglich, dass die Azoproteine unter bestimmten Bedingungen auch in der Hydrazonform vorliegen können (vgl. Tabelle 1, Tier Nr. 843 und 1994), doch halten wir das nach diesen beiden Versuchen noch nicht für sicher bewiesen. Bewiesen wäre es, wenn man unter Umständen einmal mit einem Farbstoff, der sicher ausschliesslich die Hydrazonbindung enthält, „neutralisieren“ könnte. Da sich der Farbstoff in der Azoform (Farbstoff V) auch bei Tieren als „neutralisierend“ erwies, die mit Diazoaminobenzol-4'-sulfon-2'-carboxyl-4-arsinsäure vorbehandelt worden sind, so zeigen die Versuche, dass bei der Umkupplung in vivo entstehendes Azoprotein genau wie das in vitro hergestellte in der Azoform vorliegt.

Tabelle 3.

„Neutralisationsversuche“ mit Diazoaminobenzol-4'-sulfon-2'-carboxyl-4-arsinsäure.

| Tier Nr.         | sensibilisiert mit                                  | „Neutralisation“ mit Diazoaminobenzol-4'-sulfon-2'-carboxyl-4-arsinsäure <sup>1)</sup> |
|------------------|---|--|
| 29 <sup>2)</sup> | Atoxyl-azo-Pferdeserum                              | +  |
| 30               | „   | -  |
| 418              | „   | -  |
| 420              | „   | -  |
| 421              | „   | -  |
| 1879             | „   | -  |
| 1882             | „   | -  |
| 1885             | „   | -  |
| 1886             | „   | -  |
| 317              | Diazoaminobenzol-4'-sulfon-2'-carboxyl-4-arsinsäure | -  |
| 318              | „   | -  |
| 453              | „   | -  |
| 454              | „   | -  |
| 458              | „   | -  |
| 1888             | „   | -  |

Wir haben weiter oben auseinandergesetzt, dass mit der Möglichkeit gerechnet werden musste, dass der wirksame Bestandteil der Azoproteine weder die Bindung  $—N—N—$  noch die Bindung  $—NH—N—$ , sondern die Bindung  $—N=N—NH—$  enthält. Wir haben deswegen „Neutralisationsversuche“ mit Diazoaminobenzol-4'-sulfon-2'-carboxyl-4-arsinsäure durchgeführt. Diese Versuche fielen meist negativ aus (Tabelle 3), gelegentlich aber einwandfrei positiv (Fig. 3). Es erscheint uns nun aber nicht erlaubt, ohne weiteres

<sup>1)</sup> Vgl. Anm. <sup>1)</sup>, S. 1065.

<sup>2)</sup> Vgl. Fig. 3.

anzunehmen, dass in denjenigen Fällen, in denen diese Diazoaminoverbindung „neutralisierte“, die Anaphylaktisierung durch die Gruppe  $—N=N—NH—$  hervorgerufen worden ist, und zwar aus folgendem Grund. Wir haben, wie schon erwähnt, früher festgestellt,

Meerschweinchen Nr. 29.

Vorbehandlung: am 1., 7., 14. Tag 2 cm<sup>3</sup>, am 21. Tag 4 cm<sup>3</sup> Atoxyl-azoprotein intraperitoneal.

Am 77. Tag *Schultz-Dale'scher* Versuch: oben: rechtes Uterushorn, unten: linkes Uterushorn.

B = 1 cm<sup>3</sup> neutrale 5-proz. Lösung von Diazoaminobenzol-4'-sulfon-2'-carboxyl-4-arsinsäure

F = 1 cm<sup>3</sup> Farbstoff I (3-proz.)

AH = 0,5 cm<sup>3</sup> Atoxyl-azo-protein (Huhn)

P = 1 cm<sup>3</sup> Pituglandol (1:250)

x = Spülen.

Resultat: Das Tier ist sensibilisiert (Kontraktion auf AH), Farbstoff I „neutralisiert“ nicht, Diazoaminobenzol-4'-sulfon-2'-carboxyl-4-arsinsäure bewirkt eine „Neutralisation“.

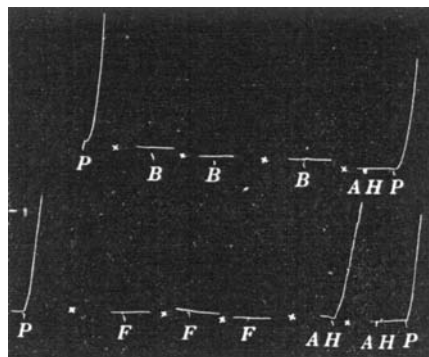


Fig. 3.

dass Diazoaminobenzol-4'-sulfon-2'-carboxyl-4-arsinsäure in vivo zum Azoprotein umkuppeln kann<sup>1)</sup>. Dies wäre nun auch möglich, wenn diese Diazoaminoverbindung mit dem überlebenden Uterus in Kontakt kommt. In diesem Fall wäre die „Neutralisation“ nicht auf Diazoaminobenzol-4'-sulfon-2'-carboxyl-4-arsinsäure selber, sondern auf das bei Kontakt mit dem Uterus entstehende Azoprotein zurückzuführen. Dass durch dieses Azoprotein nur „Neutralisation“ erreicht und keine anaphylaktische Kontraktion ausgelöst wurde, wäre durchaus verständlich, denn kleine Mengen Antigen können „neutralisieren“, ohne auszulösen (vgl. *O. Bucher, W. Jadassohn und Schaaf: „Vorneutralisationsphänomen“*<sup>2)</sup>).

Durch unsere Versuche ist bewiesen, dass die Azoproteine, gleichgültig, ob sie in vitro hergestellt werden oder in vivo entstehen, die Bindung  $—N=N—$  enthalten; ob daneben noch die Bindungen  $—NH—N—$  und  $—N=N—NH—$  vorkommen können, muss vorläufig unentschieden bleiben. Unsere Versuche zeigen ferner die grosse Spezifität des „Neutralisationsphänomens“, sie zeigen, wie sehr bei „Neutralisationsversuchen“ darauf geachtet werden muss, dass die „neutralisierende“ Substanz genau die gleiche Gruppierung hat und behält wie das Hapteneiweissprodukt, das die Überempfindlichkeit bewirkt. Dies entspricht vollkommen den Versuchen von *Landsteiner und van der Scheer*<sup>3)</sup>; doch handelte es sich bei ihren Versuchen nicht um

<sup>1)</sup> *H. E. Fierz, W. Jadassohn und W. Stoll, J. Exp. Med.* **65**, 339 (1937).

<sup>2)</sup> *O. Bucher, W. Jadassohn und F. Schaaf, Z. Immunitätsf.* **76**, 241 (1932).

<sup>3)</sup> *Landsteiner und van der Scheer, J. Exp. Med.* **48**, 315 (1928); **50**, 407 (1929); **52**, 347 (1930).

Unterschiede in der Azogruppierung, sondern um Differenzen in der Diazokomponente (z. B. Nichtersetzbarkeit einer „neutralisierenden“ Komponente durch die stereoisomere).

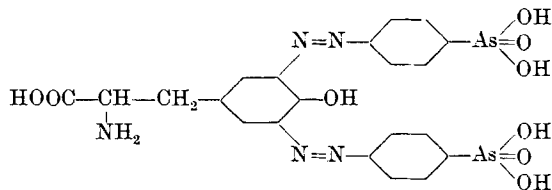
Wir haben weiter oben aus der Unzahl menschlicher Überempfindlichkeitsreaktionen als Beispiel die Salvarsan-Überempfindlichkeit herausgegriffen. Hier wäre die Auffindung „neutralisierender“ Substanzen von ganz besonderer Wichtigkeit. Die Forderungen, die an solche Substanzen gestellt werden müssen, ergeben sich aus dem Vorhergehenden von selbst. Wenn man annimmt, dass die Salvarsan-Überempfindlichkeit durch ein im Organismus sich bildendes Salvarsan-Eiweiss hervorgerufen wird, so kann man sich „neutralisierende“ Wirkung von einer Salvarsanverbindung nur dann versprechen, wenn in dieser Verbindung die gleiche Gruppierung vorhanden ist, wie in dem hypothetischen Salvarsan-Eiweiss. Das Gleiche gilt mutatis mutandis für andere anaphylaktische oder anaphylaktoide Überempfindlichkeiten.

**Herstellung der Antigene und der zu den „Neutralisationsversuchen“  
verwendeten Azofarbstoffe.**

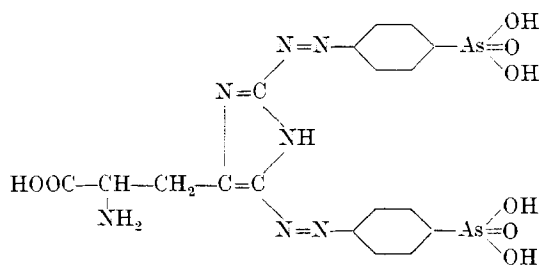
**1. 4-Phenylarsinsäure-azo-protein  
(Atoxyl-azo-protein).**

Arsenhaltige Azoproteine können erhalten werden, wie dies *Pauly*<sup>1)</sup> gezeigt hat, wenn man diazotiertes Atoxyl mit Serum oder Serumfraktionen in Gegenwart von Alkali mischt. Es entstehen dabei rote Farbstofflösungen, aus welchen die Azoproteine bei einem  $p_H = 5,2$  ausgefällt werden, während das unveränderte Eiweiss bei dieser Azidität noch in Lösung bleibt. Auf diese Weise gelingt es, durch mehrmaliges Umfällen (Alkali/Säure) ein einigermaßen reines, d. h. von unverändertem Eiweiss befreites Azoprotein zu erhalten.

Die chemische Zusammensetzung der Azoproteine, die für die Aufklärung der Immunitätsreaktionen von grossem Interesse wäre, ist noch sehr problematisch. Die Schwierigkeiten liegen eben darin, dass man über die Zusammensetzung und die Molekelgrösse der Eiweisskörper relativ wenig weiss. *Pauly*<sup>1)</sup> hat angenommen, dass im Verband der Eiweissmolekel nur das Tyrosin und das Histidin mit dem Diazoniumsalz kuppeln und zwar in der Weise, dass Tyrosin- resp. Histidin-bis-azo-benzolarsinsäure entstehen:



<sup>1)</sup> *Pauly*, Z. physiol. Ch. **42**, 512 (1904); **94**, 284 (1915).



Diese Bisazoverbindungen lassen sich aus Tyrosin resp. Histidin chemisch rein herstellen<sup>1)</sup>. Es ist jedoch nicht ohne weiteres einzusehen, dass nicht auch andere cyclische Aminosäuren des Eiweisses sich bei der Kupplung zum Azoprotein beteiligen können. *Hanke*<sup>2)</sup> hat darauf hingewiesen, dass die kolorimetrische Bestimmung z. B. von Tyrosin mittelst diazotierter Sulfanilsäure durch grössere Tryptophanmengen und wahrscheinlich auch andere Eiweissbestandteile gestört werde. Zur Prüfung der Frage, inwieweit auch andere Eiweissbestandteile der Kupplung zu Azoverbindungen fähig sind, kuppelten *Boyd* und *Hooker*<sup>3)</sup> native Eiweisskörper (Casein, Gelatine, Zein) unter verschiedenen Bedingungen mit diazotierter Arsanilsäure und analysierten die entstandenen Produkte auf Arsen- und Stickstoffgehalt. Obwohl die Resultate nicht der *Pauly*'schen Annahme entsprachen, so konnten diese Autoren doch eine eindeutige Folgerung nicht ableiten. *Kapeller-Adler* und *Boxer*<sup>4)</sup>, die diazotierte Arsanilsäure mit Gelatine, Casein, Fibroin und Zein kuppelten, daneben auch die Azofarbstoffe aus diazotierter Arsanilsäure und Phenylalanin, Tryptophan, Prolin und Oxyprolin herstellten, berechneten die N/As-Verhältnisse der Proteine bzw. der Azoproteine und folgerten aus den erhaltenen Stickstoff- und Arsenwerten der Azoproteine und der dargestellten Azofarbstoffe, dass in der Eiweissmolekel neben Tyrosin und Histidin auch Tryptophan, Phenylalanin, Prolin und Oxyprolin mit Diazoniumsalzen zu Azoverbindungen kuppeln. *H. Eagle* und *P. Vickers*<sup>5)</sup> nehmen neben der Indolgruppe des Tryptophans, der NH-Gruppe des Prolins und Oxyprolins auch noch die aliphatischen NH<sub>2</sub>-Gruppen als aktive resp. aktivierende oder dirigierende Substituenten bei der Bildung von Azoproteinen an.

Wenn man schon an die Schwierigkeiten bei relativ einfachen Kupplungskomponenten denkt, wie sie in der Technik der Azofarbstoffe gebraucht werden, so ist nicht anzunehmen, dass eine so komplizierte Kupplungskomponente, wie sie in diesem Falle die

<sup>1)</sup> *Busch, Patrascanu und Weber, J. p. [2] 140, 117 (1934).*

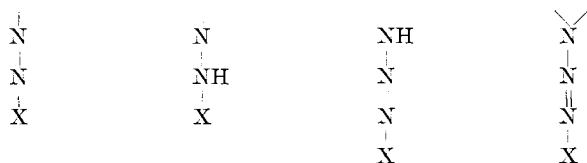
<sup>2)</sup> *Hanke, J. Biol. Chem. 79, 591 (1928).*

<sup>3)</sup> *Boyd und Hooker, J. Immunol. 23, 465 (1932); J. Biol. Chem. 104, 238 (1934); 110, 457 (1935).*

<sup>4)</sup> *Kapeller-Adler und Boxer, Bioch. Z. 285, 55 (1936).*

<sup>5)</sup> *H. Eagle und P. Vickers, J. Biol. Chem. 114, 193 (1936).*

Eiweissmolekel darstellt, nach den klassischen Regeln der Azochemie mit den Diazokörpern reagiert. Es ist in Betracht zu ziehen, dass, wie wir schon auf S. 1062 erwähnt haben, neben der eigentlichen Azobindung auch die Chinonhydrazonform sich bilden kann und dass die verschiedenen basischen Gruppen auch selber mit dem Diazokörper in Reaktion treten können<sup>1)</sup>. Danach kann man vielleicht ganz allgemein, unter der Annahme der Polypeptidkette der Proteine, ein Azoprotein folgendermassen formulieren (X = z. B. Phenylarsinsäure):

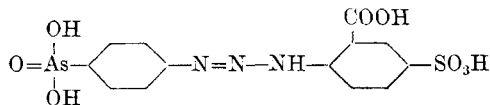


Für unsere Versuche stellten wir die Azoproteine [4-Phenylarsinsäure-azo-protein (Pferd) und (Huhn)] in Anlehnung an die Angaben von *Landsteiner*<sup>2)</sup> her.

2,17 g 4-Amino-phenyl-arsinsäure wurden in 40 cm<sup>3</sup> Wasser und in 15 cm<sup>3</sup> 2-n. Salzsäure gelöst und bei 0—4° unter Rühren innerhalb 10 Minuten 10 cm<sup>3</sup> einer normalen Lösung von Natriumnitrit zutropfen gelassen. Nach einer halben Stunde wurde die Diazoniumsalzlösung, die klar und nur ganz schwach grüngelb gefärbt sein soll, in dünnem Strahle in 100 cm<sup>3</sup> einer ebenfalls gekühlten, gut gerührten und mit 40 cm<sup>3</sup> 2-n. Sodalösung versetzten Proteinlösung (Pferdeserum resp. Hühnerserum) fliessen gelassen. Die Kupplung geht innerhalb 2 Stunden zu Ende. Die rote Azoproteinlösung wurde über Nacht im Eisschrank stehen gelassen, dann unter starkem mechanischem Rühren tropfenweise mit soviel verdünnter Salzsäure versetzt, dass Kongopapier eben mit schwach violetter Farbe reagierte. Das ausgefallene, gelbgefärbte Azoprotein wurde abzentrifugiert, mit schwach angesäuert Kochsalzlösung (7<sup>0</sup>/<sub>100</sub>) aufgeschwemmt, wieder zentrifugiert, dann mit Wasser und verdünnter Natronlauge in Lösung gebracht und das Umfällen mit verdünnter Salzsäure wie soeben noch zweimal wiederholt. Schliesslich wurde das Azoprotein mit Kochsalzlösung (7<sup>0</sup>/<sub>100</sub>) und soviel verdünnter Natronlauge gelöst, dass eine schwach alkalische (p<sub>H</sub> = 8) und 100 cm<sup>3</sup> messende Proteinlösung entstand. Der Zusatz eines Konservierungsmittels war nicht notwendig, da sich die arsenhaltigen Azoproteine gegen Infektionen genügend resistent erwiesen.

Die so hergestellten, blutrot gefärbten Azoproteinlösungen dienten für die intraperitonealen Injektionen zur Sensibilisierung bzw. zur Auslösung der anaphylaktischen Überempfindlichkeit im *Schultz-Dale'schen* Versuch.

## 2. Diazoaminobenzol-4'-sulfon-2'-carboxyl-4-arsinsäure.



<sup>1)</sup> Die Darstellung von Diazoaminverbindungen aus Diazoniumsalzen und Prolin, Oxyprolin und natürlichen Aminosäuren (Eiweiss) hat bereits Eingang in die Patentliteratur gefunden (S.P. 180 662 und Russ. P. 43 423).

<sup>2)</sup> *Landsteiner* und *Lampl*, *Bioch. Z.* **86**, 343 (1918); **93**, 106 (1919).

Bei einer grossen Zahl unserer Untersuchungen haben wir für die Sensibilisierung der Tiere an Stelle der 4-Phenylarsinsäure-azoproteine eine chemisch einfache Substanz, das Trinatriumsalz der Diazoaminobenzol-4'-sulfon-2'-carboxyl-4-arsinsäure verwendet. Über den Reaktionsverlauf im tierischen Organismus nach intraperitonealer Injektion dieser Diazoaminoverbindung haben wir in einer früher erschienenen Arbeit berichtet<sup>1)</sup>. Die Verbindung lässt sich in der Weise herstellen, dass man diazotierte 4-Amino-phenylarsinsäure in essigsaurer bis neutraler Lösung mit 6-Amino-3-sulfon-benzoesäure umsetzt.

21,7 g 4-Amino-phenylarsinsäure werden in 200 cm<sup>3</sup> Wasser und 125 cm<sup>3</sup> 2-n. Salzsäure gelöst, auf 0° gekühlt und mit 100 cm<sup>3</sup> n. Natriumnitritlösung diazotiert. Daneben stellt man die Lösung des Stabilisators her, indem man 22,6 g 6-Amino-3-sulfon-benzoesäure in 50 cm<sup>3</sup> heissem Wasser löst, mit verdünnter Natronlauge gegen Lakmus neutralisiert, mit 25 g krystallisiertem Natriumacetat versetzt und ebenfalls auf 0° kühlt. Zu dieser Lösung lässt man innerhalb 15 Minuten die mineralische Diazoniumlösung zutropfen und eine halbe Stunde bei 0—5° rühren. Die Reaktionslösung muss klar bleiben, soll orange Farbe und essigsaurer Reaktion zeigen. Die Lösung wird hierauf durch Zugabe von 23 g festem Natriumbicarbonat gegen Lakmus neutralisiert. Nach halbständigem Rühren ist kein freies Diazoniumsalz mehr nachweisbar. Ein Teil des gebildeten Diazoaminokörpers scheidet sich bereits in feinen gelben Nadelchen ab. Zur vollständigen Ausfällung werden unter Rühren und Erwärmen auf 40° 100 g chemisch reines Kochsalz zugesetzt; dann lässt man abkühlen und 15 Stunden im Eisschrank stehen. Der fast quantitativ ausgefallene, gelbe Diazoaminokörper wird abfiltriert, aus 50-proz. Äthanol umkrystallisiert und über Calciumchlorid bei 60° und unter 12 mm Druck getrocknet.

Erhalten: 42 g reines Trinatriumsalz der Diazoaminobenzol-4'-sulfon-2'-carboxyl-4-arsinsäure.

Ausbeute: 84%.

|                          |              |        |        |           |
|--------------------------|--------------|--------|--------|-----------|
| $C_{13}H_9O_3N_3SAsNa_3$ | Ber. C 30,52 | H 1,76 | N 8,22 | As 14,66% |
|                          | Gef. „ 30,45 | „ 2,05 | „ 8,29 | „ 14,43%  |

Das reine Trinatriumsalz krystallisiert in schwefelgelben, monoklinen Prismen. Es ist ausserordentlich leicht löslich in Wasser, schwerlöslich in Methyl- und Äthylalkohol und praktisch unlöslich in anderen organischen Solventien. Bei 210° C zersetzt es sich unter Braunfärbung. Während es in alkalischer Lösung vollkommen beständig ist, so spalten es verdünnte Mineralsäuren schon in der Kälte momentan, Ameisen- und Essigsäure beim Erwärmen in 6-Amino-3-sulfonbenzoesäure und diazotierte 4-Amino-phenylarsinsäure, die mit Phenolen und Aminen zu Azofarbstoffen kuppelt. So erhält man z. B. den entsprechenden arsenhaltigen  $\beta$ -Naphtholfarbstoff, der die animalische Faser orange färbt, wenn man eine wässrige Lösung des Trinatriumsalzes der Diazoaminobenzol-4'-sulfon-2'-carboxyl-4-arsinsäure mit alkalischer  $\beta$ -Naphthollösung mischt, mit verdünnter Essigsäure ansäuert und auf ca. 50° erwärmt.

Zur Sensibilisierung der Tiere wurde jeweils 1% Trinatriumsalz der Diazoaminobenzol-4'-sulfon-2'-carboxyl-4-arsinsäure in phy-

<sup>1)</sup> H. E. Fierz, W. Jadassohn und W. Stoll, J. Exp. Med. 65, 339 (1937).

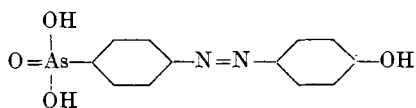
siologischer Kochsalzlösung (7% NaCl) gelöst. Die Injektionslösung soll klar und hellgelb gefärbt sein und gegen Lakmus neutrale Reaktion zeigen.

### 3. Azofarbstoffe.

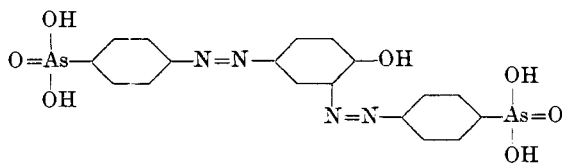
Für unsere ersten Versuche zur Aufhebung der anaphylaktischen Überempfindlichkeit im *Schultz-Dale*'schen Versuch verwendeten wir einen Azofarbstoff (Farbstoff I), der nach der Methode zur technischen Herstellung von „sauren Azofarbstoffen“ (z. B. Säureorange A) dargestellt wurde, d. h. 1 Mol diazotierte Arsanilsäure wurde mit 1 Mol  $\alpha$ -Naphthol, das in der äquivalenten Menge Natronlauge gelöst war, in Gegenwart von Soda gekuppelt.

2,17 g 4-Amino-phenylarsinsäure, gelöst in 40 cm<sup>3</sup> Wasser und 15 cm<sup>3</sup> 2-n. Salzsäure, wurden bei 0—4° mit 10 cm<sup>3</sup> n. Natriumnitritlösung diazotiert. Gleichzeitig wurden 1,44 g frisch destilliertes  $\alpha$ -Naphthol in 10 cm<sup>3</sup> n. Natronlauge, 2,5 g Soda und 25 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und auf 3° gekühlt. Zu dieser Naphthollösung wurde unter Rühren die Diazoniumsalzlösung in dünnem Strahle zugegeben. Die Kupplung ist schon nach einigen Minuten beendet (Prüfung mit Resorcin oder R-salz und p-Nitrobenzol-diazoniumchlorid). Die tiefrote, alkalische Farbstofflösung wurde auf 50° erwärmt und mit 15 g Kochsalz versetzt, wobei sich der Farbstoff in roten Flocken abschied. Diese wurden abfiltriert und mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Zur weiteren Reinigung wurde der Farbstoff in 300 cm<sup>3</sup> Wasser und 25 cm<sup>3</sup> 2-n. Natronlauge gelöst, von Verunreinigungen abfiltriert und unter Rühren tropfenweise mit verdünnter Salzsäure bis zu kongosaurer Reaktion versetzt. Die in roten Flocken anfallende Farbstoffsäure wurde abfiltriert und mit eiskaltem Wasser gewaschen. Da sie sich weder aus Wasser noch aus organischen Lösungsmitteln umkristallisieren liess, wurde die oben beschriebene Reinigung durch Umfällen aus alkalischer Lösung mit verdünnter Salzsäure noch zweimal wiederholt; dann wurde bei 110° getrocknet.

Dieser Farbstoff I stellt ein dunkelrotes, amorphes Pulver dar, ist leicht löslich in wässrigen Alkalien, unlöslich in organischen Solventien. Die Analyse dieser Substanz stimmt nicht auf die Formel des Monoazofarbstoffes. Wahrscheinlich entsteht ein Gemisch des Mono- und Disazofarbstoffes. Auch die dunkle Farbe des trockenen Produktes, die tiefrote Lösungsfarbe und die Vergleichsausfärbung auf Wolle gegenüber dem reinen Monoazofarbstoff (s. S. 1075) lassen auf einen nicht einheitlichen Azofarbstoff schliessen. Diese Ansicht wird noch durch Erfahrungen gestützt, die wir bei Untersuchungen mit den entsprechenden Phenolfarbstoffen



und



gemacht haben. Kuppelt man, wie bei der Herstellung des Farbstoffes I, diazotierte Arsanilsäure mit der äquivalenten Menge Phenol, gelöst in Natronlauge und bei Gegenwart von Soda, so entsteht ebenfalls ein nicht einheitliches Produkt. Zum reinen Monoazofarbstoff gelangt man nach einer Methode, wie sie bei der technischen Darstellung des Brillantgelb<sup>1)</sup> angewendet wird.

2,17 g 4-Amino-phenylarsinsäure werden, wie auf S. 1073 angegeben, diazotiert. Die mineralisaure Diazoniumsalzlösung wird mit Natriumacetat abgestumpft und bei 0° zu einer Lösung von 0,94 g Phenol in 20 cm<sup>3</sup> Wasser gegeben. Dazu stürzt man auf einmal 30 cm<sup>3</sup> 2-n. Sodalösung. Es bildet sich sofort ein gelber Farbstoff, der sich zum Teil bereits krystallin ausscheidet. Die Kupplung geht rasch zu Ende. Nach einer Stunde wird auf 70° erwärmt und mit 10% Kochsalz versetzt, abkühlen gelassen und der ausgefällte Farbstoff abfiltriert. Durch Umkrystallisieren aus Wasser erhält man den reinen Monoazofarbstoff in schönen, goldgelben Blättchen. Er färbt Wolle aus saurem Bade in hellgelben Tönen.

$C_{22}H_{10}O_4N_2AsNa$  Ber. C 41,86 H 2,93 N 8,13%  
 Gef. „ 41,71 „ 3,04 „ 8,17%

Zum entsprechenden Disazofarbstoff gelangt man durch alkalisches Kuppeln von einem zweiten Mol diazotierter Arsanilsäure mit einem Mol reinem Monoazofarbstoff.

3,5 g des oben erhaltenen reinen Monoazofarbstoffes werden in 25 cm<sup>3</sup> Wasser und 12,5 cm<sup>3</sup> 2-n. Natronlauge gelöst. Dazu gibt man bei 0—5° eine Diazoniumchloridlösung aus 2,17 g 4-Amino-phenylarsinsäure. Die Farbe der anfangs orange gefärbten Reaktionslösung vertieft sich allmählich zu einer dunkelroten. Bis zur Beendigung der Kupplung dauert es etwa zwei Stunden. Hierauf wird auf 70° erwärmt, mit 20 g Kochsalz versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wird der ausgefallene Farbstoff abfiltriert und, da er sich weder aus Wasser noch aus organischen Lösungsmitteln umkrystallisieren lässt, dreimal aus alkalischer Lösung mit verdünnter Salzsäure umgefällt. Der so erhaltene Disazofarbstoff wird bei 110—120° getrocknet. Er stellt, im Gegensatz zum gelben, krystallisierten Monoazofarbstoff, ein braunes amorphes Pulver dar und färbt die animalische Faser in orangen Tönen.

$C_{18}H_{16}O_7N_4As_2$  Ber. C 39,27 H 2,90 N 10,18%  
 Gef. „ 39,05 „ 3,06 „ 10,23

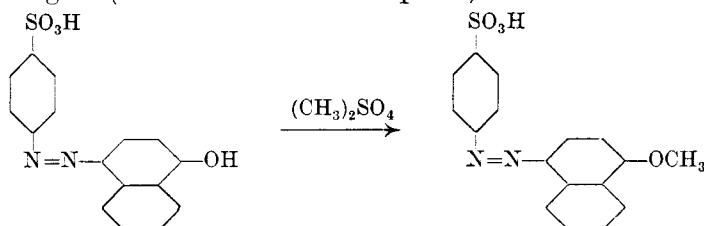
Für die weiteren Untersuchungen zur Aufhebung der anaphylaktischen Überempfindlichkeit im *Schultz-Dale'schen* Versuch war es nun notwendig, den reinen Monoazofarbstoff aus diazotierter Arsanilsäure und  $\alpha$ -Naphtol herzustellen. Wegen der praktischen Unlöslichkeit des  $\alpha$ -Naphtols in Wasser lässt sich jedoch die für die Herstellung des reinen Phenolfarbstoffes gegebene Methode nicht anwenden. Hingegen gelingt die Darstellung des reinen Naphtolfarbstoffes, wenn man nach einer von *O. N. Witt*<sup>2)</sup> beschriebenen Methode zur Darstellung eines reinen Orange I in Äthylalkohol oder Aceton sauer kuppelt. Der auf diese Weise hergestellte reine Naphtolfarbstoff (Farbstoff VI), der sich im Tierversuch als unwirksam erwies (s. S. 1066), dürfte in der Hydrazoneform vorliegen.

<sup>1)</sup> *H. E. Fierz-David*, Grundlegende Operationen der Farbenchemie, 3. Aufl., Berlin 1924, S. 145.

<sup>2)</sup> *O. Witt*, Soc. 1879, 184.

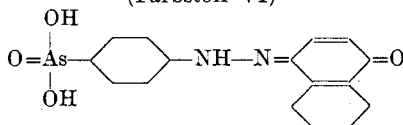


Um zu einem Azofarbstoff zu gelangen, der sich nicht mehr in die Hydrazonform umlagern kann, haben wir die phenolische Hydroxylgruppe veräthert. Als Modellversuch diente uns die Methylierung von Orange I (Sulfanilsäure  $\rightarrow$   $\alpha$ -Naphtol):



Der Methyläther dieses Oxyazofarbstoffes ist bereits im Jahre 1911 in der Schule *Friedländer's* von *Woroshtzow*<sup>1)</sup> durch Schütteln einer warmen alkalischen Lösung der Oxyazoverbindung mit Dimethylsulfat<sup>2)</sup> hergestellt worden. Während wir zu gleichen Ergebnissen kommen wie *Woroshtzow*, fanden *K. H. Slotta* und *W. Franke*<sup>3)</sup>, dass bei der Methylierung mit Dimethylsulfat die Methylgruppe nicht an das phenolische Hydroxyl, sondern an den dem Benzolkern benachbarten Azostickstoff geht. Mit diesen Untersuchungen werden wir uns in einer später erscheinenden Publikation befassen.

a) 4-Phenyl-arsinsäure-hydrazon-naphtochinon-(1).  
(Farbstoff VI)



21,7 g 4-Aminophenylarsinsäure wurden in 200 cm<sup>3</sup> Wasser und 15 cm<sup>3</sup> Salzsäure (d = 1,19) gelöst, auf 0° gekühlt und mit 100 cm<sup>3</sup> n- Natriumnitritlösung diazotiert. Die klare Diazoniumsalzlösung wurde zu einer eiskalten Lösung von 14,4 g  $\alpha$ -Naphtol in 250 cm<sup>3</sup> Äthylalkohol tropfen gelassen. Nach zweistündigem Rühren wurde über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen, hernach der krystallin ausgefallene Farbstoff abfiltriert, mit Aceton gewaschen, durch Extrahieren mit 50-proz. Alkohol gereinigt und bei 70° unter 12 mm Druck über Calciumchlorid getrocknet.

Nach dieser Darstellungsweise erhält man den Farbstoff in chemisch reiner Form als ziegelrote, leichte, krystallisierte Blättchen, leicht löslich mit karminroter Farbe in wässrigen Alkalien, schwerer löslich in Wasser und Alkohol, unlöslich in anderen organischen Lösungsmitteln; er färbt auf Wolle ein helles Orange. Der Farbenumschlag von Gelb (saure Form) nach Rot (alkalische Form) erfolgt bei einem p<sub>H</sub> von 7,4—8.

Erhalten: 34 g reinen Farbstoff. Ausbeute: 91%.

|  |              |        |        |           |
|--|--------------|--------|--------|-----------|
| C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> As | Ber. C 51,47 | H 3,49 | N 7,52 | As 20,16% |
|  | Gef. „ 51,56 | „ 3,75 | „ 7,61 | „ 20,02%  |

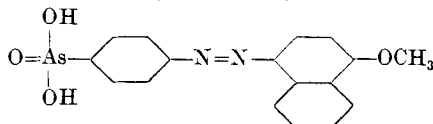
<sup>1)</sup> *Woroshtzow*, Z. Farbenind. **10**, 169 (1911); C. **1911**, II, 611.

<sup>2)</sup> *A. Colombano*, Atti Accad. Lincei [5] **16**, II, 457 (1907); C. **1908**, I, 23.

<sup>3)</sup> *K. H. Slotta* und *W. Franke*, B. **64**, 86 (1931).

Für die „Neutralisationsversuche“ im *Schultz-Dale*'schen Versuch wurde eine 2-proz. Lösung hergestellt und zwar in der Weise, dass 0,2 g des Farbstoffes in 8 cm<sup>3</sup> Wasser gegeben und vorsichtig mit 2 cm<sup>3</sup> 1-proz. Ammoniak in Lösung gebracht wurden, sodass die Lösung noch gelb blieb (p<sub>H</sub> = 7—7,2).

b) 4-Phenyl-arsinsäure-azo-naphtol-(1)-methyläther.  
(Farbstoff V)



Eine Lösung von 3,72 g des reinen Azofarbstoffes aus 4-Amino-phenylarsinsäure und  $\alpha$ -Naphtol in 50 cm<sup>3</sup> Wasser, 50 cm<sup>3</sup> Alkohol und 10 cm<sup>3</sup> 2-n. Natronlauge wurde auf 50° erwärmt. Dazu wurden unter Rühren ca. 5 g Dimethylsulfat (300% Überschuss) und 30-proz. Natronlauge abwechselungsweise zutropfen gelassen, sodass die Lösung immer alkalisch reagierte. Die Reaktionswärme hält die Lösung von selbst auf ca. 60°. Nachdem die karminrote Farbe des Oxy-azofarbstoffes verschwunden war, wurde die gelbrote, alkalische Lösung des Methoxy-azofarbstoffes zur Zerstörung von überschüssigem Dimethylsulfat noch eine Stunde auf dem Wasserbad erwärmt und hierauf mit verdünnter Salzsäure kongosauer gemacht. Der dabei anfallende Methoxyfarbstoff wurde abfiltriert, zur Entfernung von Spuren nicht methylierten Farbstoffes mit 1-proz. Natronlauge gewaschen und das auskristallisierte Natriumsulfat mit Wasser herausgelöst. Dann wurde aus Äthylalkohol umkristallisiert und bei 60° unter 12 mm Druck über Calciumchlorid getrocknet.

Erhalten: 2,8 g. Ausbeute: 72%.

Der 4-Phenyl-arsinsäure-azo-naphtol-(1)-methyläther wurde in goldgelben Blättchen erhalten, sehr schwer löslich in Wasser, Alkohol und verdünnten Alkalien, unlöslich in verdünnten Säuren. Beim langen Kochen in wässrigem Alkohol wird die Methoxygruppe zum Teil bereits verseift, wobei man wieder den ziegelroten Oxy-azofarbstoff erhält.

|  |        |       |   |      |   |      |    |       |                  |       |
|--|--------|-------|---|------|---|------|----|-------|------------------|-------|
| C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> As | Ber. C | 52,85 | H | 3,92 | N | 7,25 | As | 19,43 | OCH <sub>3</sub> | 8,03% |
|  | Gef. „ | 52,96 | „ | 4,10 | „ | 7,34 | „  | 19,40 | „                | 8,23% |

Bei der Reduktion des 4-Phenyl-arsinsäure-azo-naphtol-(1)-methyläthers mit Natriumhyposulfit erhält man 4-Amino-phenyl-arsinsäure und 1,4-Methoxy-amino-naphtalin:

0,4 g 4-Phenyl-arsinsäure-azo-naphtol-(1)-methyläther wurden in 20 cm<sup>3</sup> 2-n. Sodalösung suspendiert und unter gelindem Erwärmen und Schütteln solange Natriumhyposulfit eingetragen, bis Lösung und vollständige Entfärbung eintrat. Die sauer und etwas trübe gewordene Lösung wurde alkalisch gemacht und mit Äther mehrmals ausgeschüttelt. Im wässrig-alkalischen Teil war die 4-Amino-phenyl-arsinsäure durch Diazotieren und Kuppeln mit R-Salz nachweisbar. Der ätherische Teil enthielt den 4-Amino-naphtol-(1)-methyläther, der mit Eisen(III)chlorid einen indigoblauen Niederschlag gab; dieser blaue Niederschlag blieb im Gegensatz zur Eisen(III)chloridreaktion des 1,4-Amino-naphtols (gibt  $\alpha$ -Naphtochinon) vollkommen beständig. Die Isolierung des reinen Amino-naphtoläthers gelang jedoch nicht. Beim Abdestillieren des Äthers hinterblieb ein dunkles Öl, aus dem weder durch Destillation noch durch Umkristallisieren des Chlorhydrates ein reines Produkt erhalten wurde. Hingegen gelang es, durch Er-

wärmen des erhaltenen dunklen Öles mit Essigsäure-anhydrid und darauf folgendes Kochen des Acetylproduktes mit Tierkohle in Alkohol, den 4-Acetamino-naphtol-(1)-methyläther in kleinen, schwach gelb gefärbten Prismen vom Smp. 180° zu erhalten.

Für die Verwendung zu „Neutralisationsversuchen“ im *Schultz-Dale*'schen Versuch wurde der schwerlösliche Farbstoff V durch Sulfuration in eine wasserlösliche Form übergeführt:

1 g 4-Phenyl-arsinsäure-azo-naphtol-(1)-methyläther wurden in kleinen Portionen unter Rühren in 60 g eiskalte Schwefelsäure (100-proz.) eingetragen. Nach einer halben Stunde wurde die violett gefärbte Sulfurationsmasse auf 150 cm<sup>3</sup> Eiswasser gegossen, der ausgefallene Farbstoff abfiltriert und aus 50-proz. Alkohol umkrystallisiert, wobei man feine, bronzefarbige Kryställchen erhielt. Daraus wurde für die „Neutralisationsversuche“ eine schwach alkalische Farbstofflösung (p<sub>H</sub> = 8,2) hergestellt.

Auf Grund der Elementaranalyse und der positiven Resultate im *Schultz-Dale*'schen Versuch kann angenommen werden, dass bei der Sulfurierung ein Wasserstoffatom des Naphtalinkerns durch eine Sulfongruppe substituiert worden ist.

|   |              |        |        |         |
|---|--------------|--------|--------|---------|
| C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> O <sub>7</sub> N <sub>2</sub> SAs | Ber. C 43,77 | H 3,21 | N 6,01 | S 6,86% |
|   | Gef. „ 43,72 | „ 3,46 | „ 6,23 | „ 6,78% |

#### *Zusammenfassung.*

1. Azoprotein (sowohl in vitro hergestelltes als in vivo entstehendes) enthält entsprechend der Annahme von *Pauly* die Azogruppierung —N=N—.

2. Für die Aufhebung der anaphylaktischen Azoprotein-Überempfindlichkeit im *Schultz-Dale*'schen Versuch muss der diese Aufhebung bewirkende Farbstoff genau die gleiche Azogruppierung enthalten, wie das die Überempfindlichkeit hervorrufende Azoprotein.

3. Der Azofarbstoff aus 4-Amino-phenylarsinsäure und α-Naphtol existiert in zwei tautomeren Formen, als Naphto-chinon-hydrason (—NH—N=) und als Azonaphtol (—N=N—).

4. Die Azogruppierung (—N=N—) kann dadurch fixiert werden, dass man den phenolischen Wasserstoff des 4-Phenyl-arsinsäure-azo-naphtol-(1) durch die Methylgruppe substituiert. Die Bildung des 4-Phenyl-arsinsäure-azo-naphtol-(1)-methyläther erfolgt praktisch quantitativ durch alkalisches Methylieren mit überschüssigem Dimethylsulfat.

Der *Schweiz. Stiftung zur Förderung der Volkswirtschaft*, sowie Frau Prof. *B. Bloch* danken wir für die Unterstützung obiger Arbeit.

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