

37. Azofarbstoffe und Immunbiologie. Zur „Diazotierung“ von Salvarsan

von H. E. Fierz, W. Jadassohn und A. Margot.

(11. II. 38.)

*Landsteiner*¹⁾), *Landsteiner* und *Levine*³⁾), *W. Jadassohn* und *Schaaf*⁴⁾), *H. E. Fierz*, *W. Jadassohn* und *W. G. Stoll*⁵⁾ u. a. haben mit Atoxyl-azoverbindungen anaphylaktische Experimente durchgeführt. Die Resultate dieser Untersuchungen könnten unter Umständen für den Mechanismus anaphylaktischer bzw. anaphylaktoider Reaktionen beim Menschen von Interesse sein, besonders da es gelang, ohne Auslösung von anaphylaktischen Reaktionen (Schock, Uteruskontraktion) die anaphylaktische „Überempfindlichkeit“ aufzuheben („Neutralisationsphänomen“).

Es lag natürlich sehr nahe, für solche Versuche statt Atoxyl Salvarsan zu verwenden, nicht nur weil dem Salvarsan eine viel grössere therapeutische Bedeutung als dem Atoxyl zukommt, sondern auch weil wir die anaphylaktoiden Reaktionen des Menschen auf Salvarsan genau kennen.

*Haxthausen*⁶⁾ hat mit tetrazotiertem Salvarsan beim Menschen zahlreiche Versuche durchgeführt und interessante Resultate erzielt. Gerade deswegen wäre es wichtig, die den Atoxylversuchen entsprechenden Tierversuche mit Salvarsan durchzuführen. Unsere Aufgabe war es daher, zunächst Verbindungen aus diazotiertem bzw. tetrazotiertem Salvarsan mit Eiweiss und Naphtholen herzustellen.

Trotz der umfangreichen chemischen Literatur über das Salvarsan und seine Derivate gibt es nur wenige Angaben über die Diazotierung⁷⁾ und die Herstellung von Azofarbstoffen. Schon *Benda*⁸⁾ erwähnt zwar, dass Natriumnitrit und Salzsäure das Dioxydiamino-arsenobenzol in die schwach kuppelnde Diazoverbindung überführt, die nur mit leicht kuppelnden Komponenten wie β -Naphthol, Resorcin, 2,7-Dioxynaphthalin kuppelt und intensiv gefärbte Farbstoffe liefert. Die Kupplung mit Phenolen und Naphtholen, speziell aber mit Resorcin wurde von *Abelin*⁹⁾ zum Nachweis des Salvarsans im Urin benützt. Diese *Abelin*'sche Methode wurde in der Folge zur Aufklärung der Ausscheidungsverhältnisse des Salvarsans aus dem Körper von einer Reihe von Autoren

1) *Landsteiner*, J. Expl. Med. **39**, 631 (1924).

2) *Landsteiner*, The Specificity of Serol. Reactions. Baltimore 1936.

3) *Landsteiner* und *Levine*, J. Expl. Med. **52**, 347 (1930).

4) *W. Jadassohn* und *Schaaf*, Arch. Dermat. Syph. **170**, 33 (1934).

5) *H. E. Fierz*, *W. Jadassohn* und *W. G. Stoll*, Helv. **20**, 1059 (1937).

6) *Haxthausen*, Arch. Dermat. Syph. **171**, 583 (1935).

7) Im folgenden soll, ohne Rücksicht auf die Resultate der vorliegenden Untersuchungen, für die Behandlung des Salvarsans mit Nitrit der Ausdruck Diazotierung gebraucht werden.

8) *Benda*, *Kolle* und *Zieler*, Hdbch. d. Salvarsanther. I, 400.

9) *Abelin*, Münch. med. Wchschr. **58**, 1002 (1911).

verwendet, zum Teil modifiziert, zum Teil in Verbindung mit anderen Methoden¹⁾. Aber schon *Ehrlich* hat gegenüber solchen Untersuchungen darauf hingewiesen, dass sie für Salvarsan nur dann beweisend seien, wenn gleichzeitig Arsen im entstandenen Farbstoff nachgewiesen wird. Tatsächlich gründet sich ja diese Reaktion nur auf das Vorhandensein einer aromatischen Aminogruppe, und der positive Ausfall ist für das Vorliegen von Salvarsan als Ganzes auch bei gleichzeitigem Nachweis von Arsen nicht beweisend. *Sieburg*²⁾ konnte mit exakten chemischen Methoden Salvarsan im Harn tatsächlich nicht nachweisen; er fand Amino-oxy-phenylarsinsäure, Phenylarsinsäure und arsenfreie Abbauprodukte. Die *Abelin'sche* Methode hat natürlich trotzdem ihre Bedeutung für die Verfolgung der Ausscheidung des Salvarsans durch den Nachweis seiner Abbauprodukte. Ferner bildet die Darstellung von Azofarbstoffen, die sich vom Arsenobenzol ableiten, den Gegenstand des D. R. P. 271271 von *Höchst*³⁾. Ihre Darstellung geschieht jedoch nicht auf dem Wege der Diazotierung des Salvarsans, sondern durch Diazotierung und Kupplung der 3-Amino-4-oxy-phenylarsinsäure und nachherige Reduktion zum Arsenobenzol mit unterphosphoriger Säure. *Remy*⁴⁾ will für das Neosalvarsan das Kupplungsprodukt mit Resorcin isoliert und identifiziert haben. Zur Bestimmung des Salvarsans beschreibt *Gaebel*⁵⁾ die Kupplung des diazotierten Salvarsans mit β -Naphthylamin.

Bei der leichten Oxydierbarkeit des Salvarsans erschien es uns wahrscheinlich, dass bei der Diazotierung in salzsaurer Lösung die salpetrige Säure die Arsenogruppe oxydierend angreifen würde. Dies wird auch im oben angeführten D. R. P. 271271 als Tatsache angeführt. *Benda*⁶⁾ erwähnt ebenfalls beim isomeren 4,4'-Diamino-3,3'-dioxy-arsenobenzol, dass es sich mit Nitrit nicht scharf titrieren lässt, da selbst bei 0° stets weit mehr salpetrige Säure infolge Oxydation der Arsenogruppe verbraucht wird, als die Theorie für zwei Aminogruppen verlangt. Es erschien darum fraglich, ob die von den oben aufgeführten Autoren beschriebenen Farbstoffe tatsächlich Derivate des Salvarsans waren und nicht solche der Phenylarsinsäure oder des Phenylarsinoxyds. (Eine Beschränkung auf die Darstellungsmethode des D. R. P. 271271 war nicht möglich, weil zur Anaphylaktisierung Salvarsan mit Serum gekuppelt werden sollte.) Es war also notwendig, sich zunächst über den Verlauf der Diazotierung und die Oxydationsmöglichkeiten des Salvarsans mehr Klarheit zu verschaffen.

Salvarsan wird schon durch die Luft oxydiert, besonders in Lösung und vor allem in alkalischer Lösung. *Ehrlich* und *Bertheim*⁷⁾ erwähnen, dass Salvarsan, der Luft ausgesetzt, alsbald Amino-oxy-phenylarsinoxyd enthält. In der Folge wurde allgemein angenommen, dass die Einwirkung von Luft auf wässrige Lösungen von Salvarsan und den sich ableitenden Präparaten in der Hauptsache zur Bildung der entsprechenden Arsinoxyde führe.

Voegtlin und *Smith*⁸⁾ untersuchten die Oxydation des Salvarsans und anderer Verbindungen durch die Luft. Sie saugten bei 38° Luft durch die Lösungen und titrierten

1) *Stühmer, Kollé und Zieler*, Hdbch. d. Salvarsanther. I, 490.

2) *Sieburg*, Z. physiol. Ch. **97**, 53 (1916).

3) *Frdl.* **11**, 1048.

4) *Remy*, Bioch. Z. **137**, 133 (1923).

5) *Gaebel*, Arch. Pharm. **249**, 49 (1911).

6) *Benda*, B. **44**, 3582 (1911).

7) *Ehrlich und Bertheim*, B. **45**, 764 (1912).

8) *Voegtlin und Smith*, J. Pharm. Exptl. Therap. **16**, 199 (1921).

sie dann sauer mit Jod. Die angewandte Titrationsmethode wurde von *Gaebel*¹⁾ ausgearbeitet. Sie stellten fest, dass Salvarsan als Dichlorhydrat gegen Luftsauerstoff sehr beständig ist. Die Zugabe von Alkali führt zu einer raschen Zunahme der Oxydationsgeschwindigkeit, die ungefähr proportional der OH⁻-Ionenkonzentration ist. Durch Ansäuern der Lösung wird die Oxydation unterbunden. Um zu entscheiden, wie die Oxydation bezüglich der Bildung von Arsinoxid und Arsinsäure verläuft, bestimmten die Autoren neben dem Total an dreiwertigem Arsen das jeweilig vorhandene Arsinoxid nach der Methode von *Ehrlich* und *Bertheim*²⁾ durch Trennung auf Grund der verschiedenen Löslichkeit in Natriumbicarbonat. Sie fanden dabei, dass das Verhältnis des noch vorhandenen Salvarsans und Arsinoxides bei einem bestimmten Punkt der Oxydation (wenn z. B. total 50% des Salvarsans oxydiert sind) verschieden ist, je nach der Geschwindigkeit, mit welcher die Oxydation vor sich geht, d. h. also je nach der Alkalität. Sie sind der Ansicht, dass das Natriumsalz des Salvarsans erst zum Arsinoxid und dieses parallel zur Arsinsäure oxydiert wird.

*Maschmann*³⁾ hält die Annahme der leichten Oxydierbarkeit des Salvarsans durch Luftsauerstoff zum Arsinoxid für nicht zutreffend. Er untersuchte die Reaktionsfähigkeit von Arsenobenzolen gegen molekularen Sauerstoff durch Messung des Sauerstoffverbrauchs. Es zeigte sich dabei, dass zwischen dem nichtsubstituierten Arsenobenzol und den „Salvarsanen“ ein grosser Unterschied besteht. Die „Salvarsane“ reagieren im Gegensatz zum Arsenobenzol nur träge. Die Sauerstoffaufnahme hängt stark davon ab, ob sie in fester Form, als Chlorhydrat, in neutraler oder alkalischer Lösung vorliegen. In trockenem Zustand ist die Sauerstoffaufnahme sehr gering und besteht nur in einer Adsorption. In Lösung muss es sich um chemische Reaktionen handeln, wie schon die sichtbaren Veränderungen der Farbe und das Auftreten von Niederschlägen wahrscheinlich machen. *Maschmann* konnte keinen einheitlichen Reaktionsmechanismus feststellen. Es zeigte sich jedoch, dass der Arsenogruppe in den gelösten Präparaten nicht die Empfindlichkeit gegen molekularen Sauerstoff zukommt, wie dies allgemein angenommen wurde und wie es bei der Reaktionsfähigkeit des Arsenobenzols erwartet werden sollte. Der Sauerstoffverbrauch ist hauptsächlich durch die Substituenten bedingt. In Natronlauge gehen wenigstens zwei Reaktionen vor sich, an der o-Amino-oxy-Gruppierung und an der Arsenogruppe, wobei die erste mit grösserer Geschwindigkeit verläuft und Hauptverbraucher des Sauerstoffs ist. Der Sauerstoffverbrauch steigt mit zunehmender Alkalität.

Es gelang *Maschmann*, aus dem Reaktionsgemisch bis zu 7% 3-Amino-4-oxyphenylarsinsäure zu gewinnen, so dass die Oxydation an der Arsenogruppe bewiesen ist. Der Nachweis der Arsinoxidbildung konnte nicht erbracht werden.

*Rosenthal*⁴⁾ benützte zum Nachweis von Arsinoxid die Farbstoffbildung mit 1,2-Naphthochinon-4-natriumsulfonat und stellte fest, dass Salvarsan bei p_H 7,3 langsam, bei p_H 9,5 rasch Arsinoxid bildet.

Die Angaben der einzelnen Autoren widersprechen sich also zum Teil und geben keineswegs ein klares Bild über die offenbar vielfältigen Reaktionen bei der Oxydation des Salvarsans durch Luftsauerstoff. Es herrscht übrigens auch über die Zusammenhänge der Oxydationsreaktionen mit der Zunahme der Toxizität trotz zahlreicher Untersuchungen keinerlei Klarheit.

Durch milde Oxydationsmittel, wie Sublimat, wird das Salvarsan in 3-Amino-4-oxyphenylarsinoxid übergeführt. Wasserstoffperoxyd in alkalischer Lösung und Jod in saurer Lösung oxydieren es zur 3-Amino-4-oxyphenylarsinsäure.

¹⁾ loc. cit. ²⁾ *Ehrlich* und *Bertheim*, B. 45, 756 (1912).

³⁾ *Maschmann*, B. 59, 1142 (1926).

⁴⁾ *Rosenthal*, Public Health Reports 47, 933 (1932).

Wie schon erwähnt, war also zu erwarten, dass auch die salpetrige Säure die Arsenogruppe oxydieren würde. Dabei bestanden grundsätzlich folgende Möglichkeiten:

1. Das Salvarsan wird durch das Nitrit zunächst diazotiert bzw. tetrazotiert und erst ein Überschuss an Nitrit oxydiert die Arsenogruppe.
2. Das Salvarsan wird zuerst oxydiert und die gebildeten Oxydationsprodukte werden diazotiert.
3. Die verschiedenen Reaktionen verlaufen nebeneinander.

Wir verwendeten für unsere Versuche das Altsalvarsan (Präparat 606, Dichlorhydrat des 3,3'-Diamino-4,4'-dioxy-arsenobenzols). Das jetzt meist in der Luestherapie zur Verwendung gelangende Neosalvarsan, Präparat 914, bildet zur Hauptsache ein Gemisch wechselnder Zusammensetzung der 3,3'-Diamino-4,4'-dioxy-arsenobenzolmonomethansulfinsäure und der -dimethansulfinsäure. Daneben enthält das Produkt freien Hyraldit, Natriumsulfit und -chlorid, sowie geringe Mengen anderer Arsenobenzolderivate und war somit für unsere Untersuchungen ungeeignet. Die beiden Aminogruppen des Salvarsans stehen in o-Stellung zu Oxygruppen. o-Aminophenole lassen sich im allgemeinen wie gewöhnliche Amine in kuppelnde Diazoverbindungen überführen. Ihr Verhalten ist nur insofern ein anderes, als die Diazoniumgruppe mit dem o-ständigen Hydroxyl reagiert, und man statt der Diazoniumsalze die meist schwerlöslichen Diazoxyde erhält. Nach *Wolff*¹⁾ ist diesen Verbindungen eine Formel vom Chinontypus zuzuschreiben. In bezug auf die Kupplung verhalten sich aber die Diazo-anhydride qualitativ genau wie normale Diazoniumverbindungen. In gewissen Fällen gelingt es jedoch nicht, o-Aminophenole in Gegenwart von Mineralsäure zu diazotieren, wie z. B. bei der 1,2,4-Amino-naphtholsulfosäure, welche durch die freie salpetrige Säure zum Chinon oxydiert wird. *Sandmeyer* fand aber, dass diese Verbindung bei Gegenwart von wenig Kupfer in neutraler Lösung diazotiert werden kann²⁾. *Elbel* zeigte, dass gleichfalls eine Diazotierung in neutraler Lösung möglich ist bei Gegenwart von mindestens einem Mol Zinksalz (Diazotierung mit Zinknitrit³⁾). Diese Methoden waren für die vorliegende Arbeit insofern von Interesse, als sie eine Möglichkeit der Diazotierung des Salvarsans ohne gleichzeitige Oxydation bieten konnten.

Experimentelles.

Das verwendete Altsalvarsan war zum Teil solches aus Originalampullen der *I. G. Farbenindustrie*, zum Teil ein von uns nach bekannten Methoden aus Atoxyl dargestelltes Produkt.

¹⁾ *Wolff*, A. 312, 126 (1900).

²⁾ D.R.P. 171024, 172446, Frdl. 8, 640—646.

³⁾ D.R.P. 175593, 178621, 178936, 176618, Frdl. 8, 648—650.

Bei der Diazotierung einer einprozentigen Salvarsanlösung ist folgendes zu beobachten: Beim ersten Tropfen Nitrit schlägt die blassgelbe Farbe der salzsauren Lösung in eine intensiv gelbe um, die Lösung kuppelt schwach mit sodaalkalischem Resorcin, α -Naphthol usw. Bei weiterer Zugabe von Nitrit unter gutem Rühren bleibt die Lösung bei 0° bis zur Zugabe von ca. 1,5 Mol klar, bei höherer Temperatur fällt schon früher ein gelber flockiger Niederschlag aus. Reaktion auf Kaliumjodidstärkepapier tritt erst bei Anwendung von 3,6 bis 3,8 Mol Nitrit pro Mol Salvarsan auf. Die Löslichkeit des Niederschlages bei Neutralisation und Alkalisierung mit Soda oder Lauge ist abhängig von der angewandten Menge Nitrit und der Zeit, während welcher das diazotierte Salvarsan stehen gelassen wurde. In wenigen Stunden verfärben sich die Lösungen und Niederschläge in saurer und alkalischer Lösung; sie kuppeln aber mit Resorcin noch nach mehreren Stunden.

Verfolgung der Diazotierung durch Kupplung mit einer Komponente.

Trotz sehr zahlreicher Versuche gelang es nicht, die Diazotierung des Salvarsans durch Kupplung mit Komponenten (Resorcin, α -Naphthol usw.) quantitativ zu verfolgen. Der Endpunkt der Kupplung lässt sich infolge der ungünstigen Färbung, der beschränkten Zahl anwendbarer Komponenten und der Verfärbung der Diazolösungen meistens nicht genau feststellen. Auch die Rücktitration der im Überschuss zugegebenen Komponente mit Diazobenzol führt zu keinem Resultat. Gibt man Diazobenzol zu diazotiertem und auch nicht diazotiertem Salvarsan in Abwesenheit einer Komponente, so setzt in neutraler und alkalischer Lösung sofort Gasentwicklung ein, während ein kleiner Teil zu kuppeln scheint. Offenbar wird aber die Hauptmenge an Diazobenzol zersetzt, analog der bekannten Reduktion durch das m-Amino-p-kresol, welche in diesem Fall nach *Richard*¹⁾ durch Zusatz von Thiosulfat, Thioharnstoff oder Rhodaniden verhindert werden kann.

Diazotierung in neutraler Lösung.

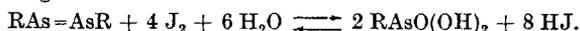
Die Diazotierung des Salvarsans in neutraler Lösung nach *Sandmeyer* in Gegenwart von wenig Kupfer und nach *Elbel* in Gegenwart eines Moles Zinksalz (vgl. S. 283) führte zu keiner kuppelnden Verbindung, während interessanterweise die 3-Amino-4-oxy-phenylarsinsäure nach *Elbel* diazotiert werden konnte, dagegen nicht nach *Sandmeyer*. Auf diese Versuche soll hier nicht näher eingegangen werden.

¹⁾ *Richard*, D.R.P. 224024; Frdl. 10, 844.

Verfolgung der Oxydation der Arsenogruppe des Salvarsans bei der Diazotierung durch Titration mit Jod.

Da vor allem die Feststellung einer Oxydation der Arsenogruppe des Salvarsans bei der Diazotierung von Interesse war, führten wir eine Reihe von Titrationsen mit Jod durch.

*Gaebel*¹⁾ hat die Oxydation des Salvarsans durch Jod in saurer Lösung zur Gehaltsbestimmung von Salvarsanlösungen benützt. Die Reaktion entspricht der Oxydation von Arsenitrioxyd durch Jod in Gegenwart von Natriumbicarbonat und verläuft nach der Gleichung:



Im Gegensatz zum Arsenitrioxyd muss die Oxydation in saurer Lösung ausgeführt werden, da bei einer zu geringen Wasserstoffionenkonzentration die entstehende Oxy-amino-phenylarsinsäure mit dem Jod unter Bildung eines intensiv braun gefärbten Produktes reagiert und bedeutend mehr Jod verbraucht wird. *Gaebel* hat die entstehende 3-Amino-4-oxy-phenylarsinsäure isoliert, er nimmt aber an, dass intermediär das 3-Amino-4-oxy-phenylarsinoxyd gebildet wird. Die Oxydation verläuft nicht vollständig, sondern führt zu einem Gleichgewicht. Es werden effektiv nur 7,5 Atome Jod pro Mol Salvarsan verbraucht, statt 8 Atome, wie es die Theorie verlangt. Dass tatsächlich ein Gleichgewicht vorliegt, hat *Gaebel* durch einige Versuche dargelegt, indem z. B. die Gleichgewichtslage von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig ist. Trotzdem kann die Reaktion titrimetrisch zur quantitativen Bestimmung des Salvarsans bzw. des vorhandenen dreiwertigen Arsens verwendet werden, da die Gleichgewichtslage für ziemlich weite Grenzen der Konzentration dieselbe ist, das Gleichgewicht sich sehr rasch einstellt und der Endpunkt der Titration scharf ist.

Die Titration mit Jod wurde auch von *Ehrlich* und *Bertheim*²⁾ für die Bestimmung des p-Amino-phenylarsinoxydes angewandt, und zwar kann diese in essigsaurer Lösung ausgeführt werden, wodurch sie quantitativ verläuft. Das 3-Amino-4-oxy-phenylarsinoxyd hingegen muss wie das Salvarsan in mineralaurer Lösung oxydiert werden, da auch Oxy-amino-phenylarsinsäure entsteht, welche in essigsaurer oder bicarbonatalkalischer Lösung, wie bereits erwähnt, mit Jod reagiert³⁾.

Es fragte sich, ob die Methode auch für diazotiertes Salvarsan anwendbar ist. Wir stellten fest, dass diazotierte 3-Amino-4-oxy-phenylarsinsäure erwartungsgemäss kein Jod verbraucht und dass die Titration des diazotierten Salvarsans ebenfalls in mineralaurer Lösung vorgenommen werden muss. Zur Feststellung, ob die Oxydation zu einem ähnlichen Gleichgewicht führt, wie die des nicht diazotierten Salvarsans, benützten wir die Tatsache, dass beim Ansäuern einer Lösung von 3-Amino-4-oxy-phenylarsinsäure in Gegenwart von Kaliumjodid bei einem bestimmten p_H Jod ausgeschieden wird, indem das Gleichgewicht der weiter oben formulierten Oxydationsreaktion durch Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration nach links verschoben wird. Die Jodausscheidung trat in der diazotierten 3-Amino-4-oxy-phenylarsinsäure-Lösung und der Vergleichslösung bei ungefähr dem gleichen p_H ein. Hingegen ist der Endpunkt bei der Titration des diazotierten Salvarsans nicht mehr scharf. Die

¹⁾ *Gaebel*, Arch. Pharm. **249**, 241 (1911).

²⁾ *Ehrlich* und *Bertheim*, Ber. **43**, 921 (1910).

³⁾ *Ehrlich* und *Bertheim*, Ber. **45**, 759 (1912).

Schärfe nimmt mit steigender Diazotierung ab, offenbar wegen des entstehenden Niederschlages, der auch Jod verbraucht, aber langsamer reagiert. Zentrifugiert man ihn ab, so ist der Endpunkt der Lösung wieder ziemlich scharf. Es wurden in den verschiedenen Versuchsreihen Resultate erhalten, die genügend genau übereinstimmten.

Prinzipiell ist zu bemerken, dass durch einfache Titration einer Lösung mit ursprünglich bekannter Salvarsanmenge, die dann teilweise zur Arsinsäure oxydiert wurde, nicht berechnet werden kann, wie gross die Anteile der einzelnen Oxydationsprodukte waren. Die Tatsache, dass 1 Mol Phenylarsinoxyd nur ein Viertel der Menge an Jod verbraucht, die von 1 Mol Salvarsan reduziert wird, erlaubt lediglich, Minimum und Maximum für die einzelnen Verbindungen im Gemisch anzugeben. Ob nun bei der Diazotierung im Falle einer Oxydation Phenylarsinoxyd oder direkt Phenylarsinsäure entsteht, war unbekannt, so dass die Auswertung der Titrationsresultate auch nur eine beschränkte sein konnte.

Wir titrierten zunächst Salvarsanlösungen, die mit steigenden Mengen Nitrit diazotiert worden waren, und zwar nach folgendem Schema:

0,048 g Altsalvarsan (10^{-4} Mol) wurden in 5 cm^3 Wasser gelöst, 0,12 bis $0,45\text{ cm}^3$ n. HCl aus einer Mikrobürette zugefügt, die Lösung durch äussere Kühlung auf $0-3^\circ$ abgekühlt und bis zum Schluss des Versuches auf dieser Temperatur gehalten. Dann wurden unter Rühren 0,02 bis $0,35\text{ cm}^3$ n. NaNO_2 aus einer Mikrobürette zugetropft, und die Lösung anschliessend unter Zugabe von Stärkelösung mit 0,1-n. Jodlösung titriert. Infolge der starken Eigenfarbe der Diazolösung schlägt am Endpunkt die Farbe nach einer dunklen Mischfarbe um. Namentlich bei stark diazotierten Lösungen hellt sich diese mehrmals nach 1—2 Minuten wieder auf. bleibt dann aber nach weiterem Jodzusatz bestehen.

Die Resultate sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Sie ergeben die Tatsache, dass die Oxydation der Arsenogruppe bei der Diazotierung des Salvarsans im Gegensatz zur Oxydation mit Luftsauerstoff auch in saurer Lösung sofort einsetzt. Ferner zeigen sie, dass bei vollständiger Diazotierung, d. h. bis zur Reaktion der Lösung auf Kaliumjodidstärkepapier, das Salvarsan nicht vollständig zur Arsinsäure oxydiert ist, da in diesem Falle kein Jod verbraucht werden dürfte. Tatsächlich beträgt aber der Jodverbrauch noch ungefähr 40% desjenigen der nicht diazotierten Lösung.

Untersuchung des Diazotierungsgemisches.

Es handelte sich darum, festzustellen, welche Reaktionsprodukte im offenbar entstehenden Gemisch tatsächlich auftreten. Nach den obigen Titrationsresultaten und den bei der Oxydation des Salvar-

sans durch Luftsauerstoff gemachten Feststellungen konnten es folgende Verbindungen sein:

- Salvarsan, diazotiertes bzw. tetrazotiertes Salvarsan;
- Amino-oxy-phenylarsinoxyd, diazotiertes Amino-oxy-phenylarsinoxyd;
- Amino-oxy-phenylarsinsäure, diazotierte Amino-oxy-phenylarsinsäure;
- andere Phenylarsinderivate (Chinone, Nitroverbindungen usw.).

Tabelle 1.

Titration von diazotiertem Salvarsan mit Jod.

Angewandte Salvarsanmenge: 0,048 g (10^{-4} Mol)

Temperatur: 0—3°.

Mole NaNO ₂ pro Mol Salvar- san	J ₂ -Ver- brauch cm ³ 0,1-n.	Salvarsan + 0,003 g Gleichgew. Korrektur ¹⁾ g	Salvar- san % ²⁾	Phenyl- arsin- säure % ²⁾	Salvar- san % ³⁾	Phenyl- arsin- oxyd % ³⁾
0,2	7,45	0,0472	98,4	1,6	96,8	3,2
0,5	6,75	0,0431	89,8	10,2	79,6	20,4
1,0	5,65	0,0366	76,2	23,8	52,4	47,6
2,0	4,90	0,0321	66,9	33,1	33,9	66,1
3,0	4,40	0,0292	60,8	39,2	21,6	78,4
3,5	3,25	0,0223	46,5	53,5		
1,0	5,70	0,0368	76,7	23,3	53,4	46,6
2,0	5,00	0,0327	68,1	31,9	36,2	63,8
2,5	4,80	0,0315	65,7	34,3	31,4	68,6
3,0	4,40	0,0291	60,7	39,3	21,4	78,6
3,2	3,95	0,0264	55,2	44,8	10,4	89,6
0,5	6,70	0,0428	89,2	10,8	78,4	21,6
1,5	5,15	0,0336	70,0	30,0	40,0	60,0
2,0	4,90	0,0321	66,9	33,1	33,8	66,2
0,2	7,25	0,0461	96,0	4,0	92,0	8,0
1,5	5,10	0,0333	69,4	30,6	38,8	61,2
2,5	4,65	0,0306	63,8	36,2	27,6	72,4
3,2	3,73	0,0252	52,5	47,5	5,0	95,0

¹⁾ Bei der Berechnung des Salvarsangehaltes aus dem Jodverbrauch berücksichtigt *Gaebel* die Tatsache der Erreichung des Gleichgewichtes und damit des Endpunktes der Titration, wenn erst 94% des Salvarsans oxydiert sind, dadurch, dass er einen entsprechenden Faktor einsetzt. Dies ist korrekt, wenn zu Beginn der Titration keine Arsinsäure in der Lösung ist. Bei den vorliegenden Versuchen musste dieser Faktor durch einen Summanden ersetzt werden. Ob beim Gleichgewicht effektiv Arsinoxyd und Arsinsäure vorhanden sind oder Salvarsan und Arsinsäure, spielt für die Umrechnung des Jodverbrauchs auf Salvarsangehalt keine Rolle, wenn die entsprechenden Molekulargewichte in die Rechnung eingesetzt werden.

²⁾ für den Fall, dass bei der Diazotierung nur Arsinsäure entsteht.

³⁾ für den Fall, dass bei der Diazotierung nur Arsinoxyd entsteht.

Die Untersuchung wurde aber sehr erschwert durch die Tatsache, dass die für die einzelnen Verbindungen, bekannten qualitativen Einzelreaktionen in diesem Gemisch versagen mussten. Überdies hat man es beim Salvarsan und den meisten Arsenobenzolen nicht mit krystallisierten, sondern amorphen Substanzen zu tun, deren Lösungen beim blossen Stehen an der Luft in wenigen Stunden chemisch nicht geklärte Veränderungen erleiden.

Der Nachweis von unverändertem und nicht diazotiertem Salvarsan im Diazotierungsgemisch interessierte nicht.

Der Nachweis von diazotiertem bzw. tetrazotiertem Salvarsan war biologisch von besonderem Interesse, musste aber auf Schwierigkeiten stossen, da es eine direkte Nachweismethode des Salvarsans selbst als Ganzes nicht gibt. Die zur Klärung des Schicksals des Salvarsans im Organismus ausgeführten zahlreichen Untersuchungen stützen sich alle auf Methoden, welche auf allgemeinen Reaktionen der o-Amino-oxy-Gruppierung (Farbreaktionen) fussen, oder auf solchen der Aminogruppe (Diazotierung, Kupplung, Kondensation mit Aldehyden), oder auf dem Nachweis des Arsens als solches. Es sind also alles Reaktionen, die beim diazotierten Salvarsan nicht anwendbar sind.

Nicht diazotiertes Amino-oxy-phenylarsinoxyd interessierte biologisch ebenfalls nicht.

Für den Nachweis des diazotierten Amino-oxy-phenylarsinoxydes stand keine spezifische Reaktion zur Verfügung.

Die Amino-oxy-phenylarsinsäure kann ausser mit hier nicht anwendbaren Reaktionen (Reduzierbarkeit usw.) durch zwei Farbreaktionen nachgewiesen werden: Rotfärbung mit Bichromat in saurer Lösung, Olivgrünfärbung mit Hypochlorit in alkalischer Lösung. Erwartungsgemäss zeigen aber auch Salvarsan und Amino-oxy-phenylarsinoxyd diese Oxydationsreaktionen, die somit für den positiven Nachweis der Arsinsäure keine Anwendung finden konnten. Die diazotierten Verbindungen geben sie aber nicht, so dass der Ausfall der Reaktionen Rückschlüsse erlaubt. Wie wir feststellten, sind die Reaktionen für die drei Verbindungen bei einer Verdünnung auf 10^{-3} noch deutlich, bei 10^{-4} nur noch schwach. Wir führten nun diese Reaktionen bei Salvarsanlösungen aus, die genau nach dem Schema für die Diazotierung bei der Jodtitration mit verschiedenen Mengen Nitrit (0,2 Mol bis 3,5 Mol pro Mol Salvarsan) diazotiert wurden. Die Reaktionen waren positiv bis zur Diazotierung mit 3 Mol Nitrit, negativ bei 3,5 Mol Nitrit.

Daraus geht hervor, dass bei Diazotierung von Salvarsan bis zur Reaktion auf Kaliumjodidstärkepapier kein unverändertes Salvarsan, kein nicht diazotiertes Amino-oxy-phenylarsinoxyd und keine nicht diazotierte

Amino-oxy-phenylarsinsäure in der Lösung sein kann (bzw. die Mengen bei Berücksichtigung der Empfindlichkeit der Reaktionen unter 1% der angewandten Salvarsanmenge liegen).

Der Versuch, die bei der Diazotierung von Salvarsan entstehenden Reaktionsprodukte durch Isolierung oder Überführung in Derivate zu identifizieren, schien wenig erfolgversprechend. Wir trachteten daher, auf indirektem Wege weitere Anhaltspunkte zu gewinnen, indem wir das Verhalten der Amino-oxy-phenylarsinsäure und des Amino-oxy-phenylarsinoxydes bei der Diazotierung untersuchten.

Diazotierung der 3-Amino-4-oxy-phenylarsinsäure.

Diese Verbindung stellten wir aus p-Chloranilin her, das wir nach *Bart*¹⁾ in bekannter Weise durch Diazotieren und Eintragen in alkalische Arsenitlösung in die 4-Chlor-phenylarsinsäure überführten. Dieses Produkt wurde nach den Angaben von *Ismailski* und *Ssimonow*²⁾ mit Kaliumnitrat in Schwefelsäure nitriert und durch Verkochen in 40-proz. Kaliumhydroxyd bei 85° die 4-Oxy-3-nitro-phenylarsinsäure gewonnen. Über die Reduktion der Nitroverbindung in saurer und alkalischer Lösung mit allen möglichen Reduktionsmitteln besteht eine grössere Anzahl von Patenten und Literaturangaben. Aber alle diese Vorschriften besitzen wesentliche Nachteile, wie dies auch aus den Angaben des D.R.P. 592870³⁾ hervorgeht. Wir wählten die Reduktion in salzsaurer Lösung mit Eisen, die zwar den Nachteil hat, dass bei der Neutralisation nach beendeter Reduktion zur Abscheidung der freien Amino-oxy-phenylarsinsäure gleichzeitig Eisenionen ausgefällt werden und die gewonnene Verbindung nur sehr schwer von den Verunreinigungen zu befreien ist.

Wir fanden aber, dass die neutrale Abscheidung aus der eisenhaltigen Lösung umgangen werden kann, indem beim Abkühlenlassen der Lösung nach beendeter Reduktion und Abtrennung des unangegriffenen Eisens das Chlorhydrat der Amino-oxy-phenylarsinsäure ohne weiteres in weissen verfilzten Nadeln auskrystallisiert und abgesaugt werden kann. Auf diese Weise erhält man ein genügend reines Produkt in einer Ausbeute von über 90%.

Zu 40 g 3-Nitro-4-oxyphenylarsinsäure, suspendiert in 135 cm³ Wasser und 114 cm³ HCl spez. Gewicht 1,19 werden bei anfänglich 50° nach und nach 30 g Eisenfeile in der Weise zugegeben, dass die rasch auf 90° steigende Temperatur zwischen 85 und 90° bleibt. Nach Beendigung der Zugabe wird weiter gerührt, bis die Temperatur auf 60° gesunken ist, sodann vom unangegriffenen Eisen abfiltriert und das Filtrat auf 0° gekühlt. Das ausgeschiedene Chlorhydrat der 3-Amino-4-oxy-phenylarsinsäure wird abgesogen, vorsichtig mit 5-proz. Salzsäure, mit Alkohol und Äther gewaschen. Die Verbindung krystallisiert mit 2 Molekeln Wasser.

Die 3-Amino-4-oxy-phenylarsinsäure lässt sich in normaler Weise in salzsaurer Lösung mit Nitrit diazotieren. Die Diazolösung ist gelb, in konzentrierter Lösung fällt das Diazo-oxyd grob krystallin aus, während es in 1-proz. Lösung (d. h. in Konzentrationen, welche bei der Diazotierung des Salvarsans angewandt wurden) gelöst bleibt, auch beim Alkalisieren. Beim Stehen an der Luft färbt sich die

¹⁾ *Bart*, A. 429, 86 (1922).

²⁾ *Ismailski* und *Ssimonow*, C. 1934, II, 3503.

³⁾ *Frdl.* 20, 822.

Lösung im Laufe einiger Stunden rot. Sie kuppelt nur mit leicht kuppelnden Komponenten. Die Verbindung kann auch in neutraler Lösung bei Gegenwart eines Moles Zinksalz diazotiert werden.

Diazotierung des 3-Amino-4-oxy-phenylarsinoxydes.

Wir stellten diese Verbindung aus der 3-Amino-4-oxy-phenylarsinsäure durch Reduktion mit Schwefeldioxyd in Gegenwart von Kaliumjodid nach den Angaben von *Ehrlich* und *Bertheim*¹⁾ her. Die Phenylarsinsäure wird durch Kaliumjodid bzw. Jodwasserstoff zum Phenylarsinoxyd reduziert; das Gleichgewicht der Reaktion liegt jedoch ganz auf der Seite der Arsinsäure, so dass durch fortlaufende Reduktion des entstandenen Jodes durch Schwefeldioxyd die vollständige Umsetzung der Arsinsäure herbeigeführt werden muss.

3 g 3-Amino-4-oxy-phenylarsinsäure-chlorhydrat werden in 22 cm³ Wasser und 5,8 cm³ HCl spez. Gewicht 1,19 gelöst, 0,5 g KJ zugefügt und in mässigem Strome Schwefeldioxyd bei Zimmertemperatur bis zur Sättigung eingeleitet. Unter Kühlen und Rühren wird bis zur Alkalität gegen Lackmus mit konz. Ammoniak tropfenweise versetzt, 11 g Kochsalz zugefügt, nach längerem Rühren abgesogen und im Vakuum getrocknet.

Das so gewonnene Phenylarsinoxyd ist stark mit Kochsalz verunreinigt. Die Reindarstellung dieser Verbindung stösst aber wegen ihrer Empfindlichkeit und der ungünstigen Lösungsverhältnisse auf Schwierigkeiten. Für unsere Untersuchungen störte jedoch eine Beimengung von Kochsalz nicht, so dass wir uns darauf beschränkten, durch sorgfältiges Nachwaschen mit Kochsalzlösung das Ammoniumsulfid, welches bei der Titration mit Jod stören konnte, zu entfernen. Die Titration mit Jod ergab eine Reinheit des weissen bis schwach rötlichen Produktes von 95%. Reaktion mit Bariumchlorid nach vorgängiger Oxydation mit Wasserstoffperoxyd negativ.

Das 3-Amino-4-oxy-phenylarsinoxyd kann in salzsaurer Lösung mit 1,5 Mol Nitrit pro Mol Phenylarsinoxyd versetzt werden, bis Reaktion auf Kaliumjodidstärkepapier eintritt, was eine Oxydation des dreiwertigen Arsens wahrscheinlich machte. In 1-proz. Lösung entsteht dabei keine Fällung. Die gelbe Lösung kuppelt nur mit leicht kuppelnden Komponenten.

Wir titrierten vier Proben mit Jod, die nach folgendem Schema diazotiert worden waren:

0,042 g Amino-oxy-phenylarsinoxyd 95-p. *z.* (2×10^{-4} Mol) wurden in 4 cm³ Wasser gelöst, 0,5 cm³ n. HCl zugefügt, die Lösung auf 0—3° abgekühlt und 0—0,28 cm³ n. NaNO₂ zugetropft. Die Lösung wurde anschliessend unter Zugabe von Stärkelösung mit 0,1-n. Jod titriert. Die Resultate sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2.

Mole NaNO ₂ pro Mol Phenylarsinoxyd	J ₂ -Verbrauch cm ³ 0,1-n.
0,0	3,77
0,5	3,24
1,0	2,83
1,2	2,30
1,4	1,83

¹⁾ *Ehrlich* und *Bertheim*, B. 45, 759 (1912); D.R.P. 235 391, Frdl. 10, 1243.

Aus diesen Zahlen geht hervor, dass das Phenylarsin-oxyd bei der Diazotierung an der Arsenogruppe oxydiert wird. Bemerkenswert ist, dass bei Eintritt der Reaktion auf Kaliumjodidstärkepapier nicht die Gesamtmenge zur Phenylarsinsäure oxydiert ist, sondern dass sich offenbar ein Gleichgewicht einstellt.

Beim Salvarsan entsteht, wie erwähnt, bei Diazotierung in 1-proz. Lösung ein gelblicher flockiger Niederschlag. Da dies bei der Amino-oxy-phenylarsinsäure, dem Amino-oxy-phenylarsin-oxyd und ihrem Gemisch bei dieser Konzentration nicht der Fall ist, konnten in diesem Niederschlag nur diazotiertes bzw. tetrazotiertes Salvarsan und an der Amino-oxygruppierung veränderte Derivate bzw. Abbauprodukte des Salvarsans vorliegen. Zur Untersuchung trennten wir daher den schlecht filtrierbaren Niederschlag durch Zentrifugieren ab, der zweimal durch Aufnehmen in verdünnter Salzsäure und Zentrifugieren gewaschen wurde. Wir stellten folgendes fest:

Die Niederschlagsmenge ist bei Diazotierung mit 3,5 Mol Nitrit pro Mol Salvarsan kleiner als bei Diazotierung mit 2 Mol. (Trocknen im Vakuum und wägen.) Der Niederschlag löst sich in verdünnter und konzentrierter Salzsäure kaum, dagegen nach Zugabe von Bichromat (Rotfärbung). Er löst sich in Soda und Lauge. Mit Resorcin kuppelt er nicht oder nur schwach. In saurer Lösung verbraucht er Jod und geht dabei zum grössten Teil in Lösung. Der Jodverbrauch ist bei Diazotierung mit 3,5 Mol Nitrit auch relativ kleiner als bei Diazotierung mit 2 Mol Nitrit.

Aus diesen Tatsachen geht hervor, dass im Niederschlag ein Gemisch von Verbindungen vorliegen muss, die zum Teil dreiwertiges, zum Teil fünfwertiges Arsen enthalten und nicht kuppeln. In der Hauptsache dürften es also an der Amino-oxygruppierung veränderte Derivate und Abbauprodukte sein.

Die vom Niederschlag befreite Lösung kuppelt sofort mit Resorcin. Der Jodverbrauch ist ebenfalls von der angewandten Nitritmenge abhängig. Versetzt man die niederschlagsfreie Lösung mit sodaalkalischem Resorcin, so fällt beim Ansäuern mit Salzsäure ein rotbrauner Niederschlag aus. Wird dieses Kupplungsprodukt durch Zentrifugieren abgetrennt, so verbraucht die verbleibende Lösung 20% weniger Jod als vor der Kupplung.

Somit muss auch in der Lösung ein Gemisch von Verbindungen vorliegen. Es befinden sich darin kuppelnde Verbindungen mit dreiwertigem Arsen.

Diazotiert man eine Salvarsanlösung mit 2 Mol Nitrit, kuppelt sodaalkalisch mit Resorcin, säuert an und entfernt den Niederschlag, so kann das Filtrat noch weiter mit 4 Mol Nitrit (total also 6 statt 3,8)

versetzt werden, bis Reaktion auf Kaliumjodidstärkepapier eintritt. Dies lässt sich durch Annahme der Einstellung eines Gleichgewichtes bei der Diazotierung erklären.

Wir verzichten darauf, über diese und weitere durchgeführte quantitative Kupplungs- und Titrationsuntersuchungen genauere Angaben zu machen, da die Zahlenresultate stark von den angewandten Nitritmengen und anderen Versuchsbedingungen abhängen und keine sicheren quantitativen Schlüsse ermöglichen.

*Remy*¹⁾ gibt an, einen Farbstoff aus diazotiertem Neosalvarsan und Resorcin krystallisiert erhalten zu haben. Wir versuchten ebenfalls, diesen Farbstoff herzustellen. Nun sind schon in den Angaben *Remy's* einige Unkorrektheiten, indem er z. B. offenbar mit dem Molekulargewicht des mono-methylsulfoxylsauren Natriums des Salvarsans rechnet. Neosalvarsan ist aber ein Gemisch, wie schon aus dem Arsengehalt hervorgeht, der statt 32% nur 18,5 bis 19,5% beträgt. Nach den Angaben wird der Farbstoff durch sorgfältige Alkoholzugabe aus der Kupplungslösung gefällt. Alkohol ergibt aber auch in nicht diazotierten Lösungen und in solchen ohne Komponente eine Fällung. Bis zur Reaktion auf Kaliumjodidstärkepapier können ca. 7 Mol Nitrit zugegeben werden. Es gelang uns nicht, den Farbstoff herzustellen, und es erscheint uns bei Berücksichtigung der Verhältnisse bei der Diazotierung des Salvarsans und der noch grösseren Oxydierbarkeit des Neosalvarsans verwunderlich, dass *Remy* auf diese Weise einen krystallisierten Farbstoff erhielt.

Zusammenfassend lässt sich also für das Salvarsan feststellen, dass bei der Diazotierung einer salzsauren Lösung sofort Oxydation an der Arsenogruppe einsetzt. Auch die Amino-oxygruppierung unterliegt sehr wahrscheinlich einer Oxydation. Es entsteht ein Gemisch von kuppelnden und nicht kuppelnden Verbindungen mit dreiwertigem und fünfwertigem Arsen. Auch bei Diazotierung bis zur Reaktion auf Kaliumjodidstärkepapier sind noch Verbindungen mit dreiwertigem Arsen vorhanden. Die Zusammensetzung des Gemisches ist von den Versuchsbedingungen stark abhängig. Ob darin auch diazotiertes bzw. tetrazotiertes Salvarsan enthalten ist, kann nicht entschieden werden. Es ist somit nicht korrekt, von diazotiertem Salvarsan zu sprechen.

Was nun die eingangs erwähnten Untersuchungen von *Haxthausen* betrifft, so waren durch die Tatsache, dass bei der „Diazotierung“ von Salvarsan ein nicht genau bestimmtes Gemisch von Verbindungen entsteht, die nötigen Voraussetzungen für ihre Übertragung auf das Tier und ihre Einbeziehung in die Untersuchungen über das Neutralisationsphänomen nicht mehr vorhanden, da ihre Ausführung nur mit chemisch definierten Substanzen einen Sinn hatte. *Haxthausen* macht keine Angaben über die Art der „Diazotierung“ des Salvarsans in seinen Versuchen. Interessehalber sei jedoch erwähnt, dass er nach Sensibilisierung mit „diazotiertem“ Salvarsan Hautreaktionen nicht nur mit Salvarsan, sondern auch mit Arsanilsäure und Natrium-p-phenylarseniat auslösen konnte.

¹⁾ *Remy*, *Bioch. Z.* **137**, 133 (1923).

Wir versuchten auch, „diazotiertes“ Salvarsan und diazotierte Amino-oxy-phenylarsinsäure mit Pferdeserum und Tyrosin zu kupeln. Es gelang jedoch nicht, nach der für Atoxyl, Sulfanilsäure und andere Verbindungen anwendbaren Methode, Azoproteine zu gewinnen. Die Kupplung wurde in sodaalkalischer und essigsaurer Lösung versucht, ferner mit Magnesia, Kalk und Baryt als säurebindenden Mitteln.

Die Untersuchungen wurden durch einen Beitrag aus der *Eidgenössischen Volkswirtschaftsstiftung E. T. H.* unterstützt.

Organisch-Technisches Laboratorium der E.T.H.

38. Anaphylaktisierung und Anaphylaxieauslösung durch eine chemisch bekannte Substanz. Oleyl-N-methyl-aurin

von H. E. Fierz, W. Jadassohn und A. Margot.

(11. II. 38.)

Bis vor kurzer Zeit stand man auf dem Standpunkt: ohne Eiweiss keine Anaphylaxie und keine anaphylaktoiden Erscheinungen. Wohl zeigten die Haptenuntersuchungen *Landsteiner's*¹⁾, dass für die Spezifität der anaphylaktischen Reaktion das Eiweiss nicht massgebend ist, wohl gelang es, ohne Eiweiss anaphylaktische Reaktionsfähigkeit aufzuheben (Neutralisation), aber zum Anaphylaktisieren und zum Schock-Auslösen erschien Eiweiss immer noch ein unbedingtes Erfordernis. Überall dort, wo es bei anaphylaktoiden Reaktionen den Anschein hatte, dass Eiweiss keine Rolle spiele, nahm man nach *Wolff-Eisner*²⁾ an, dass sich im Organismus Eiweissverbindungen bilden und dass diese Eiweissverbindungen für die anaphylaktoiden Phänomene verantwortlich zu machen seien. Dass die *Wolff-Eisner's*che Hypothese zutreffen kann, haben die Tierversuche von *Klopstock* und *Selter*³⁾, *Landsteiner* und *Jacobs*⁴⁾, *Fierz*, *W. Jadassohn* und *Stoll*⁵⁾ bewiesen.

Was die Auslösung anaphylaktischer und anaphylaktoider Reaktionen anbetrifft, ist zu sagen, dass es eine Anzahl von Beobachtungen gibt, die dafür sprechen, dass Eiweiss kein unbedingtes Erfordernis ist. So gelang die Auslösung einer anaphylaktischen Reaktion mit eiweissfreien bzw. sehr eiweissarmen kohlehydrathaltigen

¹⁾ *Landsteiner*, The Specificity of Serological Reactions (Thomas, Baltimore 1936).

²⁾ *Wolff-Eisner*, Dermat. Zentr. 1907, 10.

³⁾ *Klopstock* und *Selter*, Klin. Wochschr. 6, 1662 (1927).

⁴⁾ *Landsteiner* und *Jacobs*, J. Expl. Med. 61, 634 (1936).

⁵⁾ *Fierz*, *W. Jadassohn* und *Stoll*, J. Expl. Med. 65, 339 (1937).