

1. Zum Problem der Anaphylaxie mit chemisch bekannten Substanzen

von Hans Eduard Fierz-David, Werner Jadassohn und Alois Kleemann.

(I u. II, 21. IX. 38; III, 11. XI. 38.)

I. Versuche mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin.

Landsteiner und *van der Scheer*¹⁾ konnten mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin bei mit dem entsprechenden Azoprotein anaphylaktisierten Meerschweinchen anaphylaktischen Schock auslösen. *H. E. Fierz*, *W. Jadassohn* und *W. Zürcher*²⁾ haben entsprechende Versuche statt mit dem klassischen Anaphylaxieexperiment (Schock) mit der *Schultz-Dale*'schen Technik (Untersuchung des überlebenden Uterus) durchgeführt. „Das Hauptresultat dieser Versuche war die Feststellung, dass bei den auf das entsprechende Azoprotein überempfindlichen Tieren mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin keine Reaktion ausgelöst werden konnte.“ Das widersprach den Versuchen von *Landsteiner* und *van der Scheer*, bei denen der Schock als Test angewendet wurde. Zur Erklärung dieser Differenz machten wir die Annahme einer Umkupplung des Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin in Succinanilsäure-azo-protein in vivo. Für eine solche Annahme sprach einmal die Feststellung, dass Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin in vitro mit R-Salz umkuppeln kann, ferner die Beobachtung, dass mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin vorbehandelte Meerschweinchen auf Succinanilsäure-azo-protein anaphylaktisch werden. Diejenigen Meerschweinchen, die mit dem in vitro besser umkuppelnden Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin L³⁾ vorbehandelt waren, wurden sehr viel häufiger anaphylaktisch als die mit dem in vitro schlechter umkuppelnden Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F³⁾ vorbehandelten.

Landsteiner und *van der Scheer*⁴⁾ haben unsere *Schultz-Dale*'schen Versuche wiederholt. Diesen beiden Autoren ist es — im Gegensatz zu unseren früheren Versuchen — in einwandfreier Weise gelungen, mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin den *Schultz-Dale*'schen Versuch auszulösen. Diese Experimente von *Landsteiner* und *van der Scheer* zwangen uns, unsere Untersuchungen wieder aufzunehmen. Dabei mussten wir unsere Versuchstechnik derjenigen von *Landsteiner* und *van der Scheer* angleichen.

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

²⁾ *H. E. Fierz*, *W. Jadassohn* und *W. Zürcher*, Helv. **20**, 16 (1937).

³⁾ Über die Differenz von Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin L und Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F vergleiche S. 10.

⁴⁾ *Landsteiner* und *van der Scheer*, J. Expl. Med. **67**, 79 (1938).

Für die Anaphylaktisierung der Tiere hatten wir schon früher ein nach *Landsteiner* und *van der Scheer* hergestelltes Succinanilsäure-azo-protein verwendet. Wir hatten dieses Präparat aber viermal intraperitoneal injiziert; die ersten dreimal je 2 cm³ und das letzte Mal 4 cm³ der 1-proz. Lösung. *Landsteiner* und *van der Scheer* haben in ihren Versuchen nur zweimal vorbehandelt, in einem Intervall von vier Tagen mit je 0,5 cm³ 1-proz. Lösung. Wir haben daher für die folgenden Versuche ebenfalls dieses Verfahren verwendet. *Landsteiner* und *van der Scheer* haben für ihre *Schultz-Dale*'schen Versuche eine andere Badeflüssigkeit verwendet. Wir stellen die Rezepte der bisher von uns verwendeten Tyrodelösung und der von *Landsteiner* und *van der Scheer* verwendeten *Dale*'schen Lösung hier einander gegenüber:

Tyrodelösung:	Dale'sche Lösung (mit halbem Ca ⁺⁺ -Gehalt)
pro 1 L: 8,0 g NaCl	pro 1 L: 9,0 g NaCl
0,2 g KCl	0,42 g KCl
0,2 g CaCl ₂	0,06 g CaCl ₂
0,1 g MgCl ₂	0,5 g NaHCO ₃
1,0 g NaHCO ₃	
0,05 g NaH ₂ PO ₄	

Die Verwendung der *Dale*'schen Lösung stiess im Anfang bei uns auf grosse Schwierigkeiten, indem die Uteri in dieser Lösung so unruhig waren, dass die Durchführung des Versuches ausgeschlossen erschien. Wir haben mehrfach vergeblich probiert, mit der *Dale*'schen Lösung zu arbeiten. Ohne dass wir an der Versuchsanordnung irgend etwas geändert hätten, konnten wir aber in den letzten Monaten mit dieser Lösung ebenso gut arbeiten wie mit der sonst von uns verwendeten Tyrodelösung. Eine Erklärung für diese Differenz können wir nicht geben. Man kann natürlich an Saisoneinflüsse denken. *Landsteiner* und *van der Scheer* haben zur Auslösung andere Dosen verwendet als wir. Während wir 0,5 cm³—1 cm³ 1-proz. Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin auf 50 cm³ Badeflüssigkeit verwendeten, benutzten *Landsteiner* und *van der Scheer* 0,02—0,1 mg Farbstoff auf 20 cm³. *Landsteiner* und *van der Scheer* haben also 40—100mal weniger Farbstoff verwendet als wir. Während wir für unsere Versuche Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin L verwendet hatten, benutzten *Landsteiner* und *van der Scheer* von uns hergestelltes Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F (vgl. S. 10).

In einer ersten Versuchsserie im Juni dieses Jahres wurden fünf Tiere in der oben angegebenen Weise mit Succinanilsäure-azo-protein anaphylaktisiert und am 28. bzw. 29. Tag nach der ersten Injektion nach *Schultz-Dale* untersucht. Keines dieser Tiere zeigte auf Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F in der *Landsteiner* und *van der Scheer*'schen Dosierung eine Reaktion, trotzdem vier dieser Tiere,

wie am anderen Horn gezeigt werden konnte, auf Succinanilsäure-azo-protein einwandfrei anaphylaktisch waren. Beim fünften Tiere wurde die Reaktion auf Succinanilsäure-azo-protein nicht untersucht. Die Versuche wurden in der Dale'schen Lösung mit halbem Ca^{++} -Gehalt und unter Verwendung von ganz frisch verdünnter Farbstofflösung durchgeführt. Das Resultat entspricht also, trotzdem genau nach Landsteiner und van der Scheer vorgegangen wurde, unseren Versuchsergebnissen. Wir möchten noch hervorheben, dass drei der vier Tiere mit 10 mg Succinanilsäure-azo-protein wie in unseren früheren Versuchen geprüft wurden, während wir bei dem vierten Tier mit einer hundertmal geringeren, der Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin-Dosis entsprechenden Succinanilsäure-azo-protein-Menge (0,1 mg) gearbeitet haben. Diese Versuche bestätigen also, wie schon erwähnt, mit der von Landsteiner und van der Scheer verwendeten Technik unsere früheren Resultate und widersprechen denen dieser Autoren (Fig. 1).

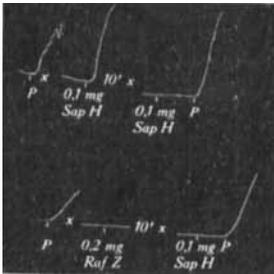


Fig. 1.

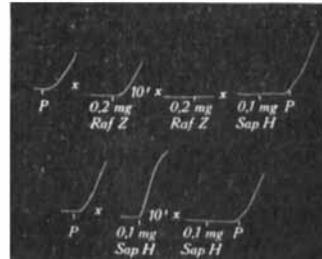


Fig. 2.

Fig. 1. Meerschweinchen Nr. 169.

Zweimal intraperitoneal vorbehandelt mit je $0,5 \text{ cm}^3$ 1-proz. Succinanilsäure-azo-protein-(Pferd)-lösung.

Versuch am 29. Tag nach der 1. Injektion; in Dale'scher Lösung mit halbem Ca^{++} -Gehalt.

P = Pituglandol.

x = Spülen.

Sap H = Succinanilsäure-azo-protein (Huhn).

Raf Z = Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F.

Fig. 2. Meerschweinchen Nr. 194.

Zweimal intraperitoneal vorbehandelt mit je $0,5 \text{ cm}^3$ 1-proz. Succinanilsäure-azo-protein-(Pferd)-lösung.

Versuch am 23. Tag nach der 1. Injektion; in Dale'scher Lösung mit halbem Ca^{++} -Gehalt.

P = Pituglandol.

x = Spülen.

Sap H = Succinanilsäure-azo-protein (Huhn).

Raf Z = Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F.

Im Juli dieses Jahres haben wir nun eine zweite Serie untersucht, die in genau gleicher Weise wie die vorhergehende und mit einer Succinanilsäure-azo-proteinlösung aus der gleichen Flasche

anaphylaktisiert waren. Es wurde auch das gleiche Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F (gleiche Operationsnummer) verwendet. Nur wurde neben einer Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcinlösung, die wir aus der 1-proz. Stammlösung frisch verdünnten, auch noch eine Lösung verwendet, welche während eines Monats auf einen Hundertstel verdünnt aufbewahrt worden war. Von vier Tieren reagierte eines weder auf Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F noch auf Succinanilsäure-azo-protein. Ein zweites zeigte auf Succinanilsäure-azo-protein eine einwandfreie Reaktion, reagierte aber nicht auf Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin (frisch verdünnte Lösung). Ein drittes Tier, das ebenfalls auf Succinanilsäure-azo-protein reagierte, zeigte auf Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F (gestandene Lösung) eine einwandfreie, neutralisierbare Reaktion. In diesem Versuch war es uns also zum ersten Male gelungen, entsprechend den Angaben von *Landsteiner* und *van der Scheer* mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F eine anaphylaktische Reaktion im *Schultz-Dale*'schen Versuch auszulösen (Fig. 2). Da wir gegenüber früher gar nichts geändert hatten, ausser dass wir statt einer frisch verdünnten Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcinlösung eine solche verwendeten, die in verdünntem Zustand einen Monat im Kühlschrank aufbewahrt worden war, drängte sich die Vermutung auf, dass durch das Stehenlassen der verdünnten Lösung das Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin die Fähigkeit erlangt haben könnte, anaphylaktische Reaktion auszulösen. Diese Annahme schien sich durch einen weiteren Versuch zu bestätigen. Bei dem letzten Tier dieser Serie haben wir am einen Horn frisch verdünntes, am anderen Horn gestandenes Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin verwendet. Wie Fig. 3 zeigt, löste in diesem Versuch das frisch verdünnte Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F keine Reaktion aus, während das gestandene eine einwandfrei positive ergab.

Mit der gleichen Succinanilsäure-azo-proteinlösung und in der genau gleichen Weise wie in den bis jetzt beschriebenen Versuchen, wurden nun 15 weitere Tiere vorbehandelt. 12 Tiere erwiesen sich als anaphylaktisiert. Sechs reagierten auf Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F (kein Unterschied zwischen gestandener und frischer Lösung), sechs auf das Azoprotein, nicht aber auf den Resorcinfarbstoff. Bei zwei von diesen Tieren war nicht die *Dale*'sche Lösung mit halbem Ca⁺⁺-Gehalt, sondern unsere gewöhnliche Tyrodelösung verwendet worden (Fig. 4).

Aus diesen Versuchen ergibt sich folgendes. In Bestätigung der Versuche von *Landsteiner* und *van der Scheer* und im Gegensatz zu unseren früheren Versuchen konnten wir im *Schultz-Dale*'schen Versuch mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F in einwandfreier Weise positive Resultate erzielen; und zwar nicht nur bei der Verwendung der von *Landsteiner* und *van der Scheer* benutzten *Dale*'schen Lösung, sondern auch mit der von uns gewöhnlich gebrauchten Tyrodelösung.

Unter anscheinend genau den gleichen Versuchsbedingungen, mit denen die Bestätigung der *Landsteiner* und *van der Scheer*'schen Befunde gelang, wurden Resultate erzielt, die eine Bestätigung unserer früheren Beobachtungen darstellen. Es konnte bei einer Anzahl von Tieren mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F, trotzdem sie auf Succinanilsäure-azo-protein anaphylaktisch waren, eine Reaktion nicht ausgelöst werden. Die Differenz zwischen unseren früheren Untersuchungen und den Untersuchungen von *Landsteiner* und *van der Scheer* haben wir jetzt bei gleichzeitig, mit genau den gleichen Lösungen vorbehandelten und geprüften Tieren innerhalb derselben

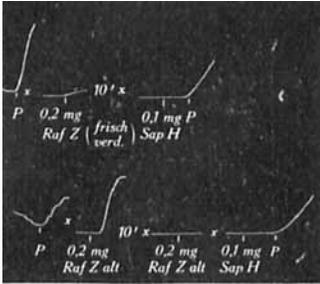


Fig. 3.

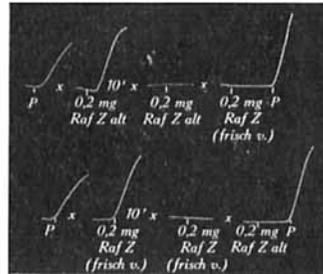


Fig. 4.

Fig. 3. Meerschweinchen Nr. 200.

Zweimal intraperitoneal vorbehandelt mit je 0,5 cm³ 1-proz. Succinanilsäure-azo-protein-(Pferd)-lösung.

Versuch am 24. Tag nach der 1. Injektion; in Dale'scher Lösung mit halbem Ca⁺⁺-Gehalt.

P = Pituglandol.

x = Spülen.

Sap H = Succinanilsäure-azo-protein (Huhn).

Raf Z = Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F.

Fig. 4. Meerschweinchen Nr. 8.

Zweimal intraperitoneal vorbehandelt mit je 0,5 cm³ 1-proz. Succinanilsäure-azo-protein-(Pferd)-lösung.

Versuch am 28. Tag nach der 1. Injektion; in Tyrode.

P = Pituglandol.

x = Spülen.

Raf Z = Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F.

Versuchsserie festgestellt. Wir können uns diese Differenz vorläufig nicht erklären. Während in den einen Versuchen es den Anschein hat, als ob es für die anaphylaxie-auslösende Wirkung von Succinylazoverbindungen gleichgültig wäre, ob das Hapten an Eiweiss gekuppelt ist oder nur an Resorcin, scheinen die anderen Versuche zu zeigen, dass das einen wesentlichen Unterschied ausmacht. *Landsteiner* und *van der Scheer* haben gegen unsere Annahme einer Umkuppelung eine Anzahl von Bedenken ausgesprochen, die uns durchaus berechtigt erscheinen. Ausgeschlossen ist allerdings eine solche Umkuppelung nicht, und man könnte annehmen, dass sie in den Versuchen,

in denen Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin auslöst, im überlebenden Uterus stattfinden könnte. Dann wäre die Differenz, die wir beobachtet haben, verständlich. Es erscheint uns aber nicht gestattet, gerade wegen der von *Landsteiner* und *van der Scheer* ausgesprochenen Bedenken, diese Hypothese als wahrscheinlich zu bezeichnen. Wir glauben vielmehr, dass man sich vor der Beibringung von neuem Tatsachenmaterial damit begnügen muss, festzustellen, dass entsprechend den Angaben von *Landsteiner* und *van der Scheer* bei mit Succinanilsäure-azo-protein anaphylaktisierten Meerschweinchen mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin eine anaphylaktische Reaktion ausgelöst werden kann, dass aber unter anscheinend identischen Versuchsbedingungen Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin sich als unwirksam erweisen kann, trotzdem Succinanilsäure-azo-protein einwandfreie Reaktion auslöst.

II. Versuche mit Oleyl-N-methyl-aurin.

Wir¹⁾ haben kürzlich darauf hingewiesen, dass es gelingt, Meerschweinchen mit Oleyl-N-methyl-aurin zu anaphylaktisieren. Zum Nachweis der anaphylaktischen Überempfindlichkeit wurde der *Schultz-Dale*'sche Versuch verwendet. Wir waren berechtigt, diese Versuche als gelungen zu bezeichnen. 20 Tiere, die mit Oleyl-N-methyl-aurin vorbehandelt waren, ergaben im *Schultz-Dale*'schen Versuch eine Kontraktion auf das gleiche Präparat. Bei 18 Tieren konnte die Reaktionsfähigkeit des Uterus neutralisiert werden, d. h., trotz erhaltener Reaktionsfähigkeit des Uterus (Pituglandolkontraktion am Schluss des Versuches) ergab die zweite oder dritte Zugabe von Oleyl-N-methyl-aurin keine Kontraktion mehr. Bei fünf nicht vorbehandelten Kontrolltieren konnten wir eine Reaktion mit der gleichen Dosis Oleyl-N-methyl-aurin nicht auslösen. Wir zogen aus diesen Versuchen den Schluss, dass Oleyl-N-methyl-aurin anaphylaktisiert und dass diese anaphylaktische Überempfindlichkeit sich im *Schultz-Dale*'schen Versuch in einwandfreier Weise nachweisen lässt.

Wir haben jetzt Untersuchungen angestellt, über die wir sofort berichten wollen, weil sie ein Resultat ergeben haben, das wir nach den früheren Versuchen nicht erwarteten. Wir sind jetzt allerdings nicht in der Lage, für die neuen Versuchsergebnisse eine sichere Erklärung abzugeben, und wir können auch noch nicht entscheiden, ob die neuen Versuche etwas Prinzipielles an den früher gezogenen Schlussfolgerungen ändern werden oder nicht.

Als Kontrolle zu anderen im Gange befindlichen Versuchen prüften wir nochmals Normaltiere mit Oleyl-N-methyl-aurin in

¹⁾ *H. E. Fierz, W. Jadassohn und A. Margot, Helv. 21, 280 (1938).*

genau der gleichen Weise, in der wir die früheren Kontrollen durchgeführt haben. Es wurde das gleiche Oleyl-N-methyl-aurin (aus der gleichen Flasche) verwendet. Die Lösungen wurden immer frisch hergestellt.

Wir konnten jetzt feststellen, dass mit Oleyl-N-methyl-aurin auch bei Normaltieren einwandfrei positive Reaktionen relativ häufig ausgelöst werden können. (Siehe Tabelle; vgl. Figg. 5 und 6).

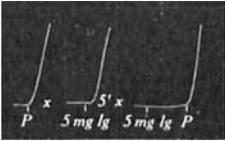


Fig. 5. Normaltier. Versuch in Tyrode.
 P = Pituglandol.
 x = Spülen.
 Jg = 5 cm³ Oleyl-N-methyl-aurin
 (Lösung 1⁰/₁₀₀).

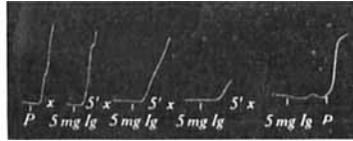


Fig. 6. Normaltier. Versuch in Tyrode.
 P = Pituglandol.
 x = Spülen.
 Jg = 5 cm³ Oleyl-N-methyl-aurin
 (Lösung 1⁰/₁₀₀).

Diese positiven Reaktionen unterscheiden sich in keiner Weise von den bei vorbehandelten Tieren erzielten. Diese Resultate können wir uns, wie schon erwähnt, zur Zeit nicht mit Sicherheit erklären. Wir möchten hervorheben, dass es sicherlich nicht möglich ist, einfach anzunehmen, dass jetzt Ende Mai bis Ende August (die letzten Versuche wurden Ende Dezember bis Anfang April durchgeführt) eine unspezifische Empfindlichkeitssteigerung entstanden ist. Eine solche Annahme würde zwar erklären, dass sich jetzt die Uteri bei Zugabe von 5 mg Oleyl-N-methyl-aurin häufig kontrahieren, während dies früher nicht der Fall war. Sie erklärt aber keineswegs, warum in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle in einwandfreier Weise das Neutralisationsphänomen nachgewiesen werden konnte. Die Tatsache einwandfreier Neutralisierung, wie sie z. B. Figg. 5 und 6 zeigen, können wir uns zur Zeit nicht anders erklären, als dass hier doch eine anaphylaktische Reaktion vorliegt. Es wurde strengstens darauf geachtet, dass auch eine perorale Anaphylaktisierung, z. B. durch Exkreme von mit Oleyl-N-methyl-aurin vorbehandelten Tieren, ausgeschlossen war. Es bleiben zur Erklärung der positiven „Normaltiere“, wenigstens soweit wir bis jetzt sehen, nur zwei Möglichkeiten bestehen. Erstens die Annahme, dass auf irgend eine uns unbekannte Weise die positiven „Normaltiere“ doch anaphylaktisiert wurden. Zweitens muss daran gedacht werden, dass die positiven Reaktionen auf Normalantikörpern beruhen.

Über die bisher durchgeführten Untersuchungen orientiert Tabelle I.

Auf theoretische Schlussfolgerungen möchten wir uns vor der Beibringung von neuem Tatsachenmaterial nicht einlassen.

Tabelle I.

Normaltiere:				Vorbehandelte Tiere:			
	+	-	u*		+	-	u*
Von den im gesamten untersuchten 65 Hörnern . . .	38%	47%	14%	Von den im gesamten untersuchten 47 Hörnern . . .	72%	9%	19%
Von den verwertbaren 56 Hörnern	44%	55%		Von den verwertbaren 38 Hörnern	90%	10%	
**Von Ende Dez. bis Anfang April untersuchten 10 Hörnern	0%	100%	0%	**Von Ende Dez. bis Anfang April untersuchten 27 Hörnern	70%	7%	22%
Von Ende Mai bis Ende August untersuchten 55 Hörnern	45%	38%	16%	Von Ende Mai bis Ende August untersuchten 20 Hörnern	75%	10%	15%

u* = unbrauchbar. Das sind diejenigen Versuche, welche wegen Unruhe des Uterushornes nicht zu Ende geführt werden konnten.

** Versuche der früheren Publikation¹⁾.

Wir möchten bloss feststellen, dass wir bei Tieren, die nicht mit Oleyl-N-methyl-aurin vorbehandelt waren, einwandfrei positive Reaktionen mit Neutralisationsphänomen beobachten konnten, und zwar bei 44% der untersuchten verwertbaren Normalhörner, während bei den vorbehandelten Tieren 90% der verwertbaren Hörner eine positive Reaktion aufwiesen.

III. Untersuchung der Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcinfarbstoffe.

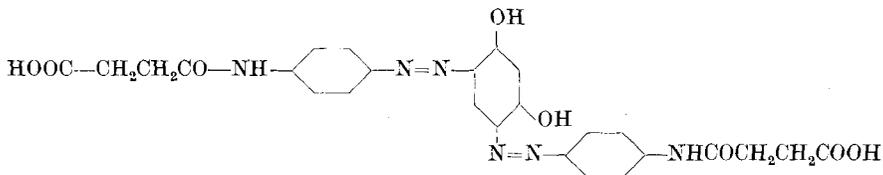
Für die Versuche über die Anaphylaxieauslösung mit chemisch bekannten Substanzen haben *H. E. Fierz*, *W. Jadassohn* und *W. Zürcher*²⁾ zwei verschiedene Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcinfarbstoffe verwendet. Der eine war das Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin L, nach den Angaben von *Landsteiner* und *van der Scheer*³⁾ hergestellt, indem zwei Mole p-Amino-succinanilsäure diazotiert und in sodaalkalischer Lösung mit einem Mol Resorcin gekuppelt wurden. Der andere war Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F, ausgeführt nach einer Vorschrift von *Fierz*. Zur Herstellung dieses Farbstoffes wurde zuerst nur ein Mol p-Amino-succinanilsäure diazotiert und in schwach saurer Lösung mit einem Mol Resorcin gekuppelt. Der entstandene Monoazofarbstoff fiel aus, wurde abfiltriert, ausgewaschen und über konz. Schwefelsäure im Vakuum getrocknet. Zur Überführung in den entsprechenden Disazofarbstoff diazotierte man ein zweites Mol

¹⁾ *H. E. Fierz*, *W. Jadassohn* und *A. Margot*, *Helv.* **21**, 280 (1938).

²⁾ *H. E. Fierz*, *W. Jadassohn* und *W. Zürcher*, *Helv.* **20**, 16 (1937).

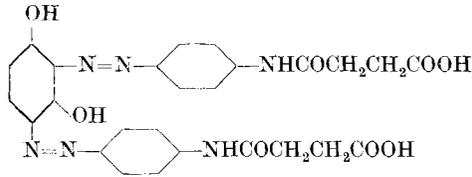
³⁾ *Landsteiner* und *van der Scheer*, *J. Expl. Med.* **56**, 399 (1932); **57**, 633 (1933).

p-Amino-succinanilsäure und tropfte es zu einer sodaalkalischen Lösung von Succinanilsäure-azo-resorcin. Diese beiden Farbstoffe waren aus den gleichen Komponenten hervorgegangen, besaßen die gleiche Bruttoformel und den gleichen chemischen Charakter, waren aber doch nicht identisch. Sie unterschieden sich im Farbton, im Verhalten gegen konz. Natronlauge und biologisch. Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin L war kastanienbraun, gab mit konz. Lauge eine violette Farbe und anaphylaktisierte Meerschweinchen. Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F war ein rotstichiges Braun, gab mit konz. Lauge keine Farbreaktion und anaphylaktisierte Meerschweinchen nur ganz ausnahmsweise. Diese Differenz legte uns die Vermutung nahe, dass im Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin L eine gewisse, wenn auch noch so geringe Menge Diazoäther vorhanden sein könnte. Dieser unstabile Diazoäther könnte sich nämlich im Organismus leicht mit Eiweiss zu einem Azoprotein verbinden. Es ist uns jedoch nie gelungen, den entsprechenden Diazoäther herzustellen oder auch nur in einem der beiden Farbstoffe nachzuweisen. Diese Vermutung musste darum wieder aufgegeben werden. Der Unterschied zwischen den beiden Farbstoffen konnte aber auch auf Stellungsisomerie beruhen. Das war umso wahrscheinlicher, als auch bei der Herstellung von Bis-benzol-azo-resorcin aus Resorcin und Phenyldiazoniumchlorid zwei verschiedene stellungsisomere Körper erhalten wurden¹⁾. Wenn die Kupplung in stark alkalischer Lösung vorgenommen wurde, erhielt man das 4,6-Bis-benzol-azo-resorcin, während bei der Kupplung in schwach alkalischer oder schwach saurer Lösung das 2,4-Bis-benzol-azo-resorcin resultierte. Diese beiden Darstellungsmethoden entsprechen denen unserer Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcinfarbstoffe vollkommen; denn auch das Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin L wurde in alkalischer Lösung gekuppelt, während Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F zum Monoazofarbstoff zuerst in saurer, dann in alkalischer Lösung zum Disazofarbstoff gekuppelt wurde. Um diese Stellungsisomerie zu untersuchen, wurden diese beiden Farbstoffe reaktiv gespalten. Im einen Falle musste dann ein Mol 4,6-Diamino-resorcin und zwei Mol p-Amino-succinanilsäure, im andern Falle dagegen ein Mol 2,4-Diamino-resorcin und zwei Mol p-Amino-succinanilsäure entstehen. Tatsächlich lieferte das Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin L 4,6-Diamino-resorcin und das Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F 2,4-Diamino-resorcin. Damit ist bewiesen, dass dem *Landsteiner*'schen Farbstoff folgende Konstitution zukommt:



¹⁾ v. Kostanecki, B. 21, 3116 (1888).

Der nach *Fierz* hergestellte Farbstoff ist demnach:



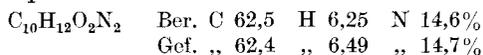
Experimentelles.

I. Spaltung von Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin L.

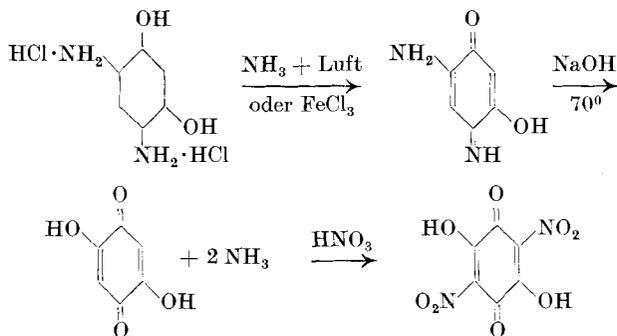
Die Spaltung von Azofarbstoffen kann in verschiedener Weise erfolgen. Am günstigsten schien uns die Reduktion mit Zinn und starker Säure; denn die zu erwartenden Diamino-resorcine sind in alkalischer Lösung sehr oxydabel, in saurer Lösung hingegen ist die Oxydation viel geringer, und zudem können sie mit konz. Salzsäure ausgefällt und isoliert werden.

13 g Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin L (N 15,43%; ber. N 15,34%) wurden mit wenig Wasser aufgeschlämmt und mit ca. 120 cm³ konz. Salzsäure und ca. 25 g Zinngranalien versetzt. Bei gelindem Erwärmen ging die Reduktion sehr rasch und energisch von statten. Nach einer Stunde war die dunkelbraune Suspension in eine gelbliche Lösung übergegangen, die vom überschüssigen Zinn abdekantiert wurde und aus welcher sich beim Abkühlen gelbe Krystalle abschieden. Es waren die Zinndoppelsalze der entstandenen Amine. Diese wurden mit Wasser gelöst und mit Schwefelwasserstoff entzinnt. Man filtrierte vom Zinnsulfid ab und dampfte das Filtrat im Vakuum ein, bis sich Krystalle abzuschneiden begannen. Aus dieser konz. Lösung fiel auf Zusatz von konz. Salzsäure ein dicker Krystallbrei aus. Dieser wurde abgenutscht, mit möglichst wenig Wasser gelöst, mit Blutkohle gereinigt, filtriert und wiederum mit konz. Salzsäure gefällt. Das nun fast weisse Produkt wurde im Vakuum über konz. Schwefelsäure und gebr. Kalk getrocknet. Der trockene Niederschlag enthielt noch eine grosse Menge p-Phenylendiamin-dichlorhydrat, das durch Verseifung von p-Amino-succinanilsäure entstanden und mit konz. Salzsäure ebenfalls ausgefallen war. Die Trennung dieses Gemisches war nicht leicht; denn es entstanden zwei Mol p-Phenylendiamin und nur ein Mol Diamino-resorcin. Das letztere war also mit der doppelten Menge p-Phenylendiamin verunreinigt. Zudem sind die Löslichkeiten der beiden Körper einander sehr ähnlich. Die Chlorhydrate von p-Phenylendiamin und von Diamino-resorcin sind in Wasser gut löslich, ihre Sulfate sind beide schwer löslich. Eine Trennung durch Lösen in Alkali liess sich nicht durchführen, da das 4,6-Diamino-resorcin in alkalischer Lösung sehr rasch oxydiert wird. Eine gewisse, wenn auch unvollständige Trennung konnte man durch Überführung in das Sulfat erreichen. Das

p-Phenylendiamin-sulfat fiel nämlich rascher aus als das ebenfalls schwer lösliche Sulfat von 4,6-Diamino-resorcin. Man löste das Gemisch der beiden Chlorhydrate in möglichst wenig Wasser und versetzte mit verdünnter Schwefelsäure. Das p-Phenylendiamin-sulfat schied sich sofort aus. Als sich der Niederschlag nicht mehr vergrößerte, saugte man ab und fällte aus dem Filtrat das Diamino-resorcin mit konz. Salzsäure. Der erste Sulfat-Niederschlag gab in wässriger Lösung mit Eisen(III)-chlorid eine Blaufärbung, die langsam in rotviolett überging. Der zweite, mit konz. Salzsäure erzeugte Niederschlag gab unter den gleichen Bedingungen eine für das 4,6-Diamino-resorcin typische fuchsinrote Färbung¹⁾ und schied bald rotbraune Krystalle ab. Die Trennung war aber, wie schon gesagt, keine vollständige; denn beide Fällungen waren noch mit der andern Komponente verunreinigt. Der erste Sulfatniederschlag wurde nun mit der gleichen Menge festem Natriumacetat vermischt und durch halbstündiges Kochen mit einem Überschuss von Essigsäure-anhydrid in das Acetylderivat übergeführt. Beim Verdünnen mit Wasser fielen Krystalle aus, die aus 50-proz. Essigsäure umkrystallisiert wurden und nach zweimaliger Sublimation im Hochvakuum den konstanten Smp. von 303° unkorrr. zeigten. Es war das Diacetyl-p-phenylen-diamin; denn die Mischprobe mit aus käuflichem p-Phenylendiamin durch Kochen mit Eisessig hergestelltem Acetylderivat ergab keine Schmelzpunktsdepression.



Der zweite mit konz. Salzsäure abgeschiedene Niederschlag gab mit Eisen(III)-chlorid die typische fuchsinrote Färbung und schied nach kurzer Zeit rotbraune Nadeln von Oxy-amino-chinonimid aus. Diese wurden auch aus ammoniakalischer Lösung beim Durchleiten von Luft erhalten. Durch Zusatz von überschüssiger Natronlauge gingen sie bei 70° bald in p-Dioxychinon über²⁾, das beim Ansäuern



¹⁾ v. Kostanecki, B. 21, 3116 (1888).

²⁾ Nietzki und Schmidt, B. 21, 2374—2375 (1888).

in strohgelben Nadeln ausfiel. Die Alkalisalze des Dioxychinons gehen in Wasser sehr leicht mit roter Farbe in Lösung. Rauchende Salpetersäure nitrierte das Dioxychinon zur gelben Nitransäure, die sich in Wasser leicht löste und auf Zusatz von Kalilauge das Kaliumsalz als schöne, gelbe Krystalle ausschied.

Zum Vergleich wurden diese Reaktionen auch mit 4,6-Diamino-resorcin ausgeführt, welches aus 4,6-Dinitro-resorcin¹⁾ durch Reduktion erhalten wurde. Es zeigte sich dabei keine Differenz, sondern die Reaktionen verliefen in allen Fällen identisch. Zur weiteren Identifizierung wurde nun ein Teil des Abbauproduktes von Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin L mit gleich viel trockenem Natriumacetat vermischt und durch halbstündiges Kochen mit überschüssigem Essigsäure-anhydrid acetyliert. Beim Verdünnen mit Wasser fielen Krystalle aus, die, aus Eisessig umkrystallisiert, bei 180° schmolzen. Es war ein Acetylderivat des 4,6-Diamino-resorcins; denn die Mischprobe mit auf gleiche Weise acetyliertem 4,6-Diamino-resorcin, das aus 4,6-Dinitro-resorcin erhalten wurde, zeigte keine Depression. Bei der Spaltung von Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin L ist also 4,6-Diamino-resorcin entstanden, und der ihm zugrunde liegende Farbstoff trägt die Azogruppen in 4,6-Stellung.

Bis jetzt waren vom 4,6-Diamino-resorcin ein Di-acetyl-²⁾ (Smp. 335°), ein Tri-acetyl-³⁾ (Smp. 225°) und ein Tetra-acetyl-derivat⁴⁾ (Smp. 180°) beschrieben worden. Ursprünglich wurde das bei 225° schmelzende Produkt für das Tetra-acetylderivat gehalten³⁾. Die Analyse schien das zu bestätigen. Dann aber galt das bei 180° schmelzende als das Tetra-acetyl- und das bei 225° schmelzende als das Tri-acetyl-4,6-diamino-resorcin⁴⁾. Es wurde geltend gemacht, dass nur eine Bestimmung der Acetylgruppen diese Frage entscheiden könne, da die Werte für Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff vom Tri- und vom Tetra-acetylderivat zufälligerweise so nahe beieinander liegen, dass sie noch innerhalb der Fehlergrenze sind. Die Stickstoffwerte allerdings weisen eine deutliche Differenz auf. Wir haben dieses fragliche, bei 180° schmelzende Produkt aus dem 4,6-Diamino-resorcin durch Kochen mit Essigsäure-anhydrid gewonnen. Es wurde darauf viermal aus Eisessig und zweimal aus Alkohol umkrystallisiert und zeigte dann den konstanten Smp. von 180°. Die Analyse gab immer folgende Werte:

C 55,01 H 5,03% N 7,07 CH₃CO 68,23%

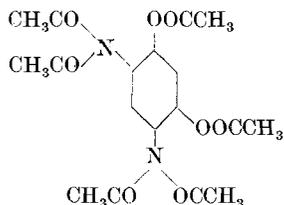
Diese Zahlen stimmen aber auffallend auf das Hexa-acetyl-4,6-diamino-resorcin:

¹⁾ P. Typke, B. **16**, 551—555 (1883).

²⁾ Heller und Sourlis, B. **43**, 2584 (1910).

³⁾ Nietzki und Schmidt, B. **22**, 1657 (1889).

⁴⁾ Kehrman und Betsch, B. **30**, 2102 (1897).



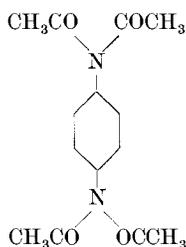
Ber. $C_{18}H_{20}O_8N_2$ C 55,1 H 5,1 N 7,15 CH_3CO 65,8%

Wie man sieht, sind tatsächlich mindestens sechs Acetylgruppen vorhanden. Allerdings ist das entsprechende Analysenergebnis um 2,43% zu hoch. Das kommt aber daher, dass bei der Verseifung mit alkoholischem Kali das wieder frei gemachte 4,6-Diamino-resorcin rasch sich zum Dioxychinon oxydiert und nachher bei der Destillation aus saurer Lösung zu einem kleinen Teil mit den Wasserdämpfen in die alkalische Vorlage übergeht. Hier verbraucht es natürlich ebenfalls die ihm äquivalente Menge Natronlauge und erschwert zudem wegen der rosaroten Farbe seines Natriumsalzes die Erkennung des Umschlagspunktes des angewandten Indikators. Genauer ist dafür der Stickstoffwert. Das Tetra-acetylderivat müsste 9,1% N enthalten, während wir immer 7,07—7,15% N fanden. Das bei 180° schmelzende Produkt ist darum das Hexa-acetyl-4,6-diamino-resorcin.

II. Spaltung von Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F.

13 g Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F (N 15,53%) wurden mit wenig Wasser zu einem Brei angerührt und mit ca. 120 cm³ konz. Salzsäure und ca. 25 g Zinngranalien reduziert. Nachdem die Reaktionsmasse gelb geworden war, wurde sie vom unverbrauchten Zinn abgossen, mit Wasser verdünnt und mit Schwefelwasserstoff entzint. Das allmählich braunrot gewordene Filtrat wurde im Vakuum eingedampft bis zur beginnenden Krystallisation. Auf Zusatz von konz. Salzsäure fielen rötliche Krystalle aus. Zur Reinigung löste man sie in wenig Wasser, filtrierte und fällte nochmals mit konz. Salzsäure. Jetzt waren sie nur noch schwach gefärbt. Eine Probe davon zeigte in wässriger Lösung mit Eisen(III)-chlorid, wie auch mit Ammoniak, eine Violettfärbung, die aber rasch in Braun überging. Es waren natürlich auch hier wieder durch Verseifung von p-Aminosuccinanilsäure zwei Mol p-Phenylendiamin entstanden. Zur Trennung löste man die Krystallmasse in wenig Wasser und versetzte mit verdünnter Schwefelsäure. Das p-Phenylendiaminsulfat fiel sofort aus und wurde abgesogen. Aus dem Filtrat erhielt man mit konz. Salzsäure eine Fällung von salzsaurem Diamino-resorcin. Diese Trennung war auch hier wieder nicht vollständig; denn beide Fällungen enthielten noch eine gewisse Menge von der andern Substanz. Beide Niederschläge gaben mit Eisen(III)-chlorid die bekannte Violettfärbung; die zweite mit konz. Salzsäure gefällte Krystallmasse zeigte diese Reaktion aber viel intensiver. Zur Überführung in das

Acetylderivat wurde nun der Sulfatniederschlag mit gleich viel trockenem Natriumacetat vermischt und mit überschüssigem Essigsäure-anhydrid eine Stunde gekocht. Die beim Verdünnen mit Wasser ausgefallene Masse wurde aus Eisessig umkrystallisiert. Die erste Fraktion zeigte den Smp. 207° unkor., die zweite schmolz bei 304°. Diese letztere war wiederum Diacetyl-p-phenylendiamin; denn die Mischprobe mit dem aus dem käuflichen p-Phenylendiamin genau gleich hergestellten Produkt ergab keine Schmelzpunktserniedrigung. Die erste Fraktion wurde nochmals aus Eisessig, dann noch zweimal aus Alkohol umkrystallisiert und zuletzt im Hochvakuum bei 192° sublimiert. Das Produkt schmolz dann bei 207° unkor. unter Zersetzung. Auf Grund der Analyse musste es das Tetra-acetyl-p-phenylendiamin sein. Diese Substanz ist bis jetzt in der Literatur noch nicht beschrieben worden.



$C_{14}H_{16}O_4N_2$	Ber. C 60,8	H 5,81	N 10,12%
	Gef. „ 60,81	„ 5,61	„ 10,28%

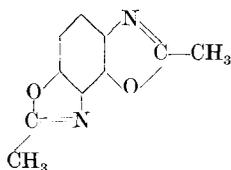
Zur Bestätigung wurde käufliches p-Phenylendiamin-sulfat mit gleich viel trockenem Natriumacetat und überschüssigem Essigsäure-anhydrid drei Stunden unter Rückfluss gekocht. Nachher wurde das Anhydrid abdestilliert, der Rückstand mit Wasser ausgeschüttelt und abgesaugt. Auf dem Filter blieb eine graue Masse zurück, die, aus Eisessig und Alkohol umkrystallisiert, ebenfalls bei 207° unter Zersetzung schmolz. Die Mischprobe zeigte keine Erniedrigung.

Nun wurde auch noch die mit konz. Salzsäure erzeugte Fällung auf die oben beschriebene Art acyliert. Beim Verdünnen mit Wasser fiel aber nichts aus, auch dann nicht, wenn die entstandene Essigsäure mit Soda abgestumpft wurde. Zum Vergleich wurde dann 2,4-Diamino-resorcin aus 2,4-Dinitroso-resorcin¹⁾ hergestellt. Eine Probe davon wurde genau wie oben acyliert. Beim Verdünnen fiel auch nichts aus. Darauf versuchten wir über das Acetylprodukt zum Dimethylbenzo-dioxazol zu gelangen. Nach den Angaben von *Henrich* und *Roedel*²⁾ wurden 5 g fein gepulvertes 2,4-Diamino-resorcin-dichlorhydrat mit Essigsäure-anhydrid gekocht, darauf das Anhydrid abdestilliert und der Rückstand der trockenen Destillation unterworfen. Bei 253—260° ging eine Substanz über, die sehr bald erstarrte und aus

¹⁾ *A. Fitz*, B. **8**, 631—633 (1875).

²⁾ *Henrich* und *Roedel*, B. **54**, 2501 (1921).

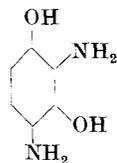
Alkohol, Eisessig und Wasser umkrystallisiert bei 111° uncorr. schmolz. Nach der Analyse könnte es das Dimethyl-benzo-dioxazol sein:



$C_{10}H_8O_2N_2$ Ber. C 63,8 H 4,25 N 14,9%
 Gef. „ 63,79 „ 4,21 „ 15,04%

Allerdings schmilzt unser Produkt bei 111°, während das von *Henrich* und *Roedel* dargestellte bei 192° schmilzt.

Zur Identifizierung des mit konz. Salzsäure erzeugten Niederschlages aus den Spaltprodukten von Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F wurde er in das schwer lösliche Sulfat übergeführt und analysiert. Zuerst aber musste er vom vorhandenen p-Phenyldiamin befreit werden. Die Trennung gelang am besten durch Ausschütteln mit 96-proz. Alkohol. Das 2,4-Diaminoresorcin-dichlorhydrat ging dabei leichter und mit rötlicher Farbe in Lösung; das p-Phenyldiamin-dichlorhydrat hingegen löste sich weniger gut und konnte zum grössten Teil abfiltriert werden. Aus dem Filtrat fiel auf Zusatz des gleichen Volumens konz. Salzsäure nur 2,4-Diaminoresorcin-dichlorhydrat aus, während die nun geringe Menge p-Phenyldiamin-dichlorhydrat im Alkohol gelöst blieb. Eine Wiederholung dieser Operation ergab das 2,4-Diamino-resorcin-dichlorhydrat vollkommen rein. Diese Krystalle gaben in wässriger Lösung mit Eisen(III)-chlorid die schon erwähnte, instabile Violett-färbung, die rasch in Braun übergeht. Auch die beschriebene kornblumenblaue Farbe, welche die Suspension des salzsauren Salzes von 2,4-Diaminoresorcin in Chloroform auf Zusatz von Natronlauge und Wasser ergibt¹⁾, wurde erhalten. Die vom p-Phenyldiamin gereinigten Krystalle wurden dann in möglichst wenig Wasser gelöst und mit verdünnter Schwefelsäure in das schwer lösliche Sulfat übergeführt. Auf Zusatz von etwas Alkohol fielen die Krystalle rascher aus. Das Sulfat enthält 1 1/2 Mol Krystallwasser und zeigt folgende Zusammensetzung:



$\cdot H_2SO_4 \cdot 1\frac{1}{2} H_2O$ $C_6H_{13}O_{7,5}N_2S$ Ber. C 27,2 H 4,94 N 10,5 S 12,1%
 Gef. „ 27,45 „ 4,94 „ 10,72 „ 12,63%

Bei der Aufspaltung von Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F ist 2,4-Diamino-resorcin gebildet worden. Das beweist, dass der Farbstoff ein 2,4-Resorcin-disazofarbstoff ist.

¹⁾ *Liebermann* und *v. Kostanecki*, B. 17, 882 (1884).

Zusammenfassung.

- I. 1. Bei mit Succinanilsäure-azo-protein vorbehandelten Meer-schweinchen konnten wir mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F im *Schultz-Dale*'schen Versuch gelegentlich den anaphylaktischen Schock auslösen. Das ist eine Bestätigung der Versuche von *Landsteiner* und *van der Scheer*¹⁾.
2. Bei mit Succinanilsäure-azo-protein vorbehandelten und sicher sensibilisierten Meerschweinchen konnten wir häufig mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F keinen anaphylaktischen Schock auslösen, wohl aber die spezifische Überempfindlichkeit neutralisieren. Das ist eine Bestätigung unserer früheren Versuche²⁾.
3. Die Resultate, wie sie unter I. 1. und I. 2. zusammengefasst wurden, wurden unter anscheinend identischen Versuchsbedingungen erzielt.
- II. Oleyl-N-methyltaurin bewirkte auch bei Normaltieren, allerdings seltener als bei vorbehandelten, eine neutralisierbare Kontraktion des überlebenden Uterus³⁾.
- III. 1. Die früher festgestellten Unterschiede zwischen Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin L¹⁾ und Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin F²⁾, die nach verschiedenen Methoden hergestellt wurden, beruhen auf Stellungsisomerie. Der erstere ist ein 4,6-, der zweite ein 2,4-Resoreindisazofarbstoff.
2. Das bei 180° schmelzende Acetylderivat von 4,6-Diamino-resorcin ist das Hexa-acetyl-4,6-diamino-resorcin.
3. Es wurde Tetra-acetyl-p-phenylendiamin hergestellt, das bei 207° schmilzt.
4. Es wurde aus reinem 2,4-Diamino-resorcin-dichlorhydrat durch Acylieren und anschliessende trockene Destillation ein Dimethyl-benzo-dioxazol erhalten, das bei 111° schmilzt. Das in der Literatur beschriebene, auf gleiche Weise gewonnene Produkt zeigt allerdings einen Smp. von 192°⁴⁾.

Für finanzielle Unterstützungen unserer Arbeiten danken wir der *Chemischen Fabrik Sandoz A. G.* aufs beste.

Organisch-technisches Laboratorium der Eidg. Techn.
Hochschule, Zürich.

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

²⁾ *H. E. Fierz*, *W. Jadassohn* und *Zürcher*, Helv. **20**, 16 (1937).

³⁾ Vgl. *H. E. Fierz*, *W. Jadassohn* und *A. Margot*, Helv. **21**, 280 (1938).

⁴⁾ *Henrich* und *Roedel*, B. **54**, 2501 (1921).