

Tiere mit Schilddrüsenextrakt (69% Hemmung) bzw. Thyroxin (65% Hemmung). Der anti-inflammatorye Wirkungsgrad des Pharmakons wird hingegen bei den mit Schilddrüsenextrakt bzw. Thyroxin vorbehandelten Tieren durch Numalnarkose im Vergleich zu vorbehandelten, wachen Ratten um 50 bzw. 100% reduziert. Unter den dargelegten Versuchsbedingungen blockiert somit die Numalnarkose einen Prozess, der zur Entfaltung der ödemhemmenden Eigenschaften des Phenylbutazons erforderlich ist.

E. G. STENGER

Pharmakologisches Institut der Universität des Saarlandes, Homburg, 19. September 1958.

Summary

Following pretreatment of rats by thyroid extract or thyroxin, the anti-inflammatory action of phenylbutazone on formalin edema of the rat paw was strongly diminished by simultaneous numal anaesthesia of the animals.

Experimenteller Beitrag zur Frage der Klärfaktoraktivierung

Die chemische Natur des Postheparinklärfaktors ist unbekannt, ebenso der Mechanismus der Klärfaktoraktivierung durch Heparin und Heparinoide. Die Frage, ob Heparin einen integrierenden Bestandteil des Klärfaktormoleküls darstelle, wurde immer wieder diskutiert. Heparin könnte in diesem Falle als ein Co-Ferment aufgefasst werden. Nachdem es gelungen war, aus Gewebe ohne jeden Heparinzusatz ein Enzym zu isolieren, das offenbar sehr weitgehend die biochemischen Eigenschaften des Postheparinklärfaktors aufwies, schien es zunächst wahrscheinlicher, dass das Heparin nur eine Ausschüttung des aktiven Fermentes aus der Zelle in die Blutbahn bewirkt (KORN¹, ISELIN und SCHULER²). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese aus Gewebe isolierte Lipoproteinlipase durch Inkubation mit einer Heparinase inaktiviert wird (KORN^{3,4}). Dies sprach wiederum für die gegenwärtige Annahme, dass nämlich Heparin einen integrierenden Bestandteil des Enzyms darstelle.

Wir haben versucht, den Heparinoidgehalt eines gereinigten Klärfaktorpräparates unter Verwendung eines mit ³⁵S markierten Heparinoids⁵ als Klärfaktoraktivator zu bestimmen. Als Heparinoid wurde der von STUDER *et al.*⁶ beschriebene N-Formyl-chitosanpolyschwefelsäureester [Ro 1-8307/13] verwendet mit einer Radioaktivität von ungefähr 4 µC pro mg. Dieses Heparinoid wurde einem Kaninchen in der Dosis von 8 mg/kg intravenös injiziert. 30 min später wurde das Versuchstier getötet und sein Plasma zur Gewinnung eines gereinigten Klärfaktorpräparates wie folgt aufgearbeitet: Adsorption des Enzyms durch Calciumphosphat (0,15 ml einer 0,2 molaren Suspension pro ml Plasma) während 30 min Waschen des Calciumphosphats mit Oxalatlösung. Elution des Klärfaktors mit 1,8%iger Natriumcitratlösung. Ausfällung des Klärfaktors aus dieser Natriumcitratlösung durch Verdünnen auf das 15fache Volumen mit CO₂-gesättigtem Wasser.

¹ E. D. KORN, J. biol. Chem. 215, 1 (1955).

² B. ISELIN und W. SCHULER, Helv. physiol. Acta 15, 14 (1957.)

³ E. D. KORN, Science 124, 489 (1956).

⁴ E. D. KORN, J. biol. Chem. 226, 827 (1957).

⁵ In unseren chemischen Laboratorien hergestellt von Herrn Dr. J. WÜRSCH.

⁶ A. STUDER, F. KOLLER, P. KAEGI, K. VOGLER, W. OBERHÄNSLI und M. KOFLER, Bull. Schweiz. Akad. med. Wiss. 13, 239 (1957).

Wiederauflösen des Präzipitats in physiologischer Kochsalzlösung. Das ganze Procedere wurde bei einer Temperatur von 2° ± 1°C durchgeführt. Die Testung des so gewonnenen Präparates auf Lipoproteinlipaseaktivität geschah an einem Substrat folgender Zusammensetzung: 0,04% Sesamöl (+ Emulgator und Konservierungsmittel), 10% Kinderserum, physiologische Kochsalzlösung ad 100%.

Die Zunahme der Lichtdurchlässigkeit einer Mischung dieses Substrats mit dem Testpräparat innert 2 h bei Inkubation bei 37°C diente als Indikator für die Klärfaktoraktivität. Die quantitative Bestimmung der Lipoproteinlipaseaktivität ist besonders für gereinigte Präparate vorläufig ein ungelöstes Problem. Immerhin erlaubt die Methode die Aussage, dass das gereinigte Präparat ungefähr 50% der Aktivität des verarbeiteten Plasmas aufwies.

Der Gehalt dieses Präparates und des verarbeiteten Plasmas an markiertem Heparinoid wurde durch Verschaltung des Klärfaktorpräparates, bzw. des Plasmas mit Kaliumpermanganat, Kaliumhydroxid und Salzsäure unter Zusatz von Trägersulfat in Form von Schwefelsäure, nachfolgender Ausfällung als Bariumsulfat und Messung der Radioaktivität im «Flowcounter» (Tracerlab) bestimmt.

Ferner wurde der Proteingehalt des verarbeiteten Plasmas und des gewonnenen Klärfaktorpräparates kolorimetrisch nach der Methode von GLEISS und HINSBERG⁷ bestimmt, die auf der Biuret-Reaktion beruht.

Werden die Werte für das verarbeitete Plasma = 100% gesetzt, so ergibt sich für das Klärfaktorpräparat ein Eiweißgehalt von 0,06% und eine Radioaktivität von 2,65%.

Durch analoge Ermittlung der Radioaktivität einer Heparinoidlösung bekannter Konzentration konnte für das Klärfaktorpräparat ein absoluter Heparinoidgehalt von 0,8 γ/ml errechnet werden.

Während somit der Eiweißgehalt beim Reinigungsvorgang um etwa das 1700fache gesenkt wurde (was bei dem beschriebenen Vorgehen wohl nur ausnahmsweise gelingt), betrug der Abfall der Heparinoidkonzentration nur ungefähr das 40fache. Aus diesen Daten muss geschlossen werden, dass der Heparinoidgehalt des Enzyms etwa 40mal grösser ist als der durchschnittliche Heparinoidgehalt der Gesamt-Plasmaeiweiße. Diese Beobachtung stützt die Vermutung, dass das Heparinoid (bzw. Heparin) nach intravenöser Zufuhr zu einem integrierenden Bestandteil des Enzymmoleküls wird.

Unter der Annahme, dass der Gesamteiweißgehalt des verarbeiteten Plasmas ungefähr 6 g% betrug, resultiert ein absoluter Eiweißgehalt von etwa 35 γ/ml gereinigtes Klärfaktorpräparat. Das Molekulargewicht des Heparinoids kann mit ungefähr 5000 eingesetzt werden. Daraus ergibt sich, dass auf 1 Molekül Heparinoid immer noch mehrere Moleküle Eiweiß entfallen.

Als Arbeitshypothese könnte angenommen werden, dass sich zwischen den verschiedenen Plasmaeiweißfraktionen und dem Heparinoid ein Adsorptionsgleichgewicht einspielt. Die vom Apo-Ferment beanspruchte absolute Heparinoidmenge bleibt dabei – trotz der etwa 40fach grösseren Affinität – klein infolge der geringen absoluten Menge von vorhandenem Apo-Ferment.

K. REBER und A. STUDER

Abteilung für experimentelle Medizin der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel, 24. Juli 1958.

⁷ J. GLEISS und K. HINSBERG, Z. exp. Med. 116, 599 (1951).

Summary

After intravenous injection of a ^{35}S -labelled heparinoid (N-formyl-chitosan-polysulfuric acid ester) into rabbits, a highly purified clearing factor preparation was obtained from the blood plasma. The heparinoid content of this preparation is approximately 40 times higher, weight for weight, than that of the other plasma proteins.

Extensive clinical trials of this compound have substantiated the high activity and low toxicity found in our Laboratories.

G. DE STEVENS, L. H. WERNER,
A. HALAMANDARIS, and S. RICCA, JR.

Research Department, CIBA Pharmaceutical Products Inc., Summit, N. J., October 27, 1958.

Zusammenfassung

Die Gewinnung eines neuen, tierexperimentell und klinisch hochwirksamen Diureticums der Formel III (6-Chlor-7-sulfamyl-3,4-dihydro-1,2,4-benzothiadiazin-1,1-dioxyd) wird beschrieben.

PRO EXPERIMENTIS**Zur Kenntnis der «Keller-Reaktion»****und ihre Anwendung****zur spektrophotometrischen Bestimmung von Indolen**

In der Absicht, einen für Indolkörper möglichst spezifischen, quantitativen *in vitro*-Test auszuarbeiten, wurde die von HOFMANN¹ zitierte und im qualitativen Sinne verwendete «Keller-Reaktion»² zum Ausgangspunkt der vorliegenden spektrophotometrischen Untersuchung. Diese Reaktion wurde von HOFMANN zum Nachweis der Indolstruktur bei Rauwolfia-Alkaloiden¹ und Pilzgiften³ angewandt und wie folgt beschrieben:

0,5 mg Alkaloid in 1,0 ml Eisessig, der 0,035 % Eisen als Eisen-III-chlorid enthält, auflösen und mit 1,0 ml conc. H_2SO_4 unterschichten; Ring in der Berührungszone 1 min beobachten, dann durchschütteln, Färbung unmittelbar nach Mischen und Endfärbung nach einigem Stehen beobachten. Auf diese Weise werden für einzelne indolartige Alkaloide charakteristische Farbtönungen und Farbveränderungen festgestellt.

Unsere eigenen Versuche legten weniger Wert auf die an den Schichtgrenzen zu beobachtenden Ringe als auf die nach Mischung entstehende Endfärbung, das heißt im speziellen auf die Frage, ob diese «Keller-Reaktion» sich zu einem quantitativen Spektrophotometer-Test eigne und ob sich die einzelnen Indolkörper durch spezifische, eventuell für bestimmte Gruppen charakteristisch voneinander verschiedene Absorptionskurven auszeichnen. Zu diesem Zweck haben wir vorerst die folgende Arbeitsweise eingehalten:

0,5 ml einer meist 0,0002 M indolhaltigen, wässrigen Lösung werden mit 1 ml FeCl_3 -haltigem Eisessig versetzt und mit 2 ml conc. H_2SO_4 unterschichtet, wobei der entstehende Ring beobachtet werden kann. Darauf wird unter Kühlung am Wasserhahn vermisch, sobald die Lösung abgekühlt ist in Messküvetten eingefüllt und, um das Entweichen der meistens gebildeten Bläschen abzuwarten, etwa 10–15 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde im Zeiss-Spektrophotometer gemessen zwischen den Wellenlängen 650–330 μm . Der Blindwert enthält alle Zugaben mit Ausnahme des in Frage stehenden Indolkörpers (an dessen Stelle nur 0,5 ml destilliertes Wasser).

¹ F. C. NOVELLO and J. M. SPRAGUE, J. Amer. chem. Soc. **79**, 2028 (1957). This compound has been assigned the generic name of chlorothiazide.

² Generic name: Hydro-chlorothiazide, trademark 'ESIDREX'.

³ We are indebted to Drs. J. J. CHART, W. BARRETT, A. RENZI, and H. SHEPPARD for the biological data.

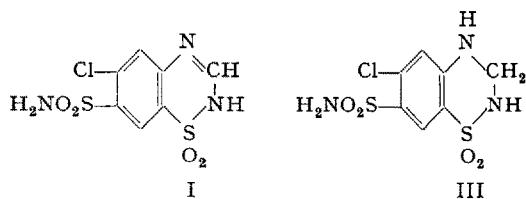
¹ A. HOFMANN, Helv. chim. Acta **37**, 317 (1954).

² C. C. KELLER, Schweiz. Wschr. Chem. Pharm. **34**, 65 (1896).

³ A. HOFMANN, R. HEIM, A. BRACK und H. KOBEL, Exper. **14**, 107 (1958).

Dihydrobenzothiadiazine Dioxides with Potent Diuretic Effect

The chemistry of the heterocyclic system, 1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide, has recently received significant attention due to the report of the effective diuretic action of 6-chloro-7-sulfamyl-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide (I) in man.¹ This compound is formed by reaction of 4-amino-6-chloro-m-benzenedisulfonamide (II) with formic acid. We have now condensed II with formaldehyde and have obtained a monomeric crystalline product, although the reaction might have been expected to result in a polymeric product.



The reaction is advantageously carried out in anhydrous diethyleneglycol dimethyl ether containing a catalytic amount of hydrogen chloride and using approximately equimolecular quantities of the reactants. We have designated the new compound as Su-5879². It proved to be 6-chloro-7-sulfamyl-3,4-dihydro-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide (III), m. p. 273–275°.

Anal. Calculated for $C_7\text{H}_8\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}_2$: C, 28.24; H, 2.71; N, 14.11. Found C, 28.18; H, 3.00; N, 13.96.

The structure of III was confirmed by sodium borohydride reduction of I.

4-Amino-6-chloro-m-benzenedisulfonamide also reacted with other aliphatic, aromatic and heterocyclic aldehydes to afford the corresponding 3-substituted derivatives of III. This reaction was also found to be applicable to N-alkylated 4-amino-m-benzenedisulfonamides.

Su-5879 was tested in experimental animals for its diuretic and natriuretic effects and was found to be ten to twenty times as active as chlorothiazide and to have a low order of toxicity. A significant diuretic response was obtained with dosages as low as 0.04 mg/kg in dogs. The increased renal excretion of water and sodium was accompanied by a very pronounced increase in chloride excretion, suggesting that the compound does not act as a carbonic anhydrase inhibitor. This was confirmed by the fact that it is considerably weaker as a carbonic anhydrase inhibitor than chlorothiazide³.

¹ F. C. NOVELLO and J. M. SPRAGUE, J. Amer. chem. Soc. **79**, 2028 (1957). This compound has been assigned the generic name of chlorothiazide.

² Generic name: Hydro-chlorothiazide, trademark 'ESIDREX'.

³ We are indebted to Drs. J. J. CHART, W. BARRETT, A. RENZI, and H. SHEPPARD for the biological data.