

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.

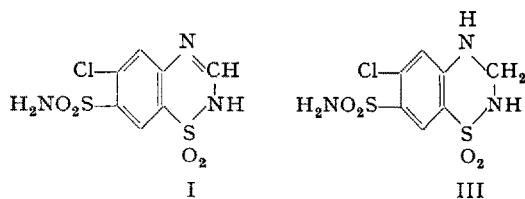
Extensive clinical trials of this compound have substantiated the high activity and low toxicity found in our Laboratories.

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

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

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 $\text{C}_7\text{H}_8\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}_2$; 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.

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 Alkalioide 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 Spektrophotometertest eigne und ob sich die einzelnen Indolkörper durch spezifische, eventuell für bestimmte Gruppen charakteristisch von einander 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 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).

Auf diese Weise konnte zunächst an Tryptaminlösungen festgestellt werden, dass eine konstante, stets reproduzierbare und über lange Zeit haltbare Färbung zu stande kommt, deren Absorptionskurve zwei Maxima, ein höheres um 560 und ein kleineres um 370 $\mu\mu$ aufweist. Gleichzeitig ergab sich, dass die Farbintensität stark von Variationen im zugesetzten FeCl_3 -Gehalt abhängig war, wie Tabelle I veranschaulicht.

Tabelle I

Tryptaminbestimmung bei Zusatz verschiedener Mengen von Eisen-III-chlorid

Extinktion bei 555 $\mu\mu$	mg% FeCl_3		
	17,5	35	70
In Eisessig purum	0,197	0,254	0,290
In Eisessig purissimum pro analysi	—	0,015	0,003

Bedeutungsvoller war jedoch der Umstand, dass bei sonst gleichbleibenden Bedingungen die Reaktion weitgehend versagte, wenn anstatt des gewöhnlichen «Eisessig purum» eine andere Lieferung von «Eisessig puriss. pro analysi, indifferent gegen Chromsäure» verwendet wurde. Es schien dies daraufhin zu deuten, dass nicht in erster Linie dem Eisessig selbst und dem darin enthaltenen FeCl_3 , sondern einer weiteren, offenbar als Verunreinigung im Eisessig enthaltenen Substanz eine wichtige Rolle im Reaktionsmechanismus zukommt. Aus verschiedenen Gründen war es naheliegend, die Glyoxylsäure zu verdächtigen.

In einer anschliessenden Versuchsreihe mit Tryptamin wurde darum zusätzlich zu den je 70 mg% FeCl_3 in Eisessig puriss. p. a., welcher gemäss Tabelle I praktisch inaktiv ist, Glyoxylsäure in verschiedenen Mengen zugegeben. In der Tat trat nun ein mit steigender Konzentration von Glyoxylsäure stets deutlicher werdender rotvioletter Ring in der Schichtengrenze auf, begleitet von einer entsprechend gesteigerten Extinktion der Endfärbung, wie aus Tabelle II zu ersehen ist. Gleichzeitig war aber auch

Tabelle II

Tryptaminbestimmung bei Zusatz von FeCl_3 und verschiedener Mengen Glyoxylsäure

Extinktion bei 555 $\mu\mu$	mg% Glyoxylsäure		
	25	50	100
Eisessig purissimum pro analysi	0,050	0,089	0,147
+ FeCl_3 70 mg%	0,128	0,217	0,276

die Feststellung zu machen, dass zur Erzielung maximaler Extinktionswerte bei Zusatz von Glyoxylsäure nun nicht mehr eine weitere Steigerung, sondern im Gegenteil wieder eine Verminderung der FeCl_3 -Konzentration notwendig war. Unsere nächste Aufgabe bestand demnach darin, vorerst die optimalen Mischungsverhältnisse der

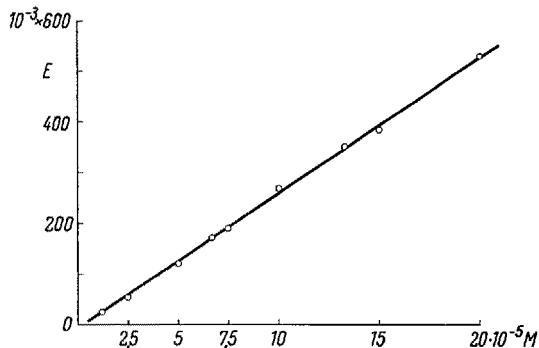
Reagenszusätze abzuklären. Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengestellt; es ist daraus ersichtlich, dass das Optimum an FeCl_3 im Gebiet um 8–10 mg% liegt, dasjenige von Glyoxylsäure zwischen 300–500 mg%. In Anbetracht des nicht ganz unweisen Kostenpunktes wurde für die weitere routinemässige Anwendung dieses Testes die untere Grenze von 300 mg% Glyoxylsäure nebst 10 mg% FeCl_3 als Standardkonzentration gewählt. Im übrigen wurde festgestellt, dass die Anwesenheit von Eisessig für den Ausfall der Reaktion ohne Belang ist; mit Glyoxylsäure in Wasser gelöst werden die gleichen Resultate erzielt. Unter dieser Bedingung ist es aber auch möglich, an Stelle des teureren Glyoxylsäure puriss.-Präparates das billigere Na-Salz zu verwenden (vgl. Tab. IV), welches in Eisessig nicht in der nötigen Konzentrierung löslich wäre.

Tabelle IV

Tryptaminbestimmung mit glyoxylsäurem Na und 10 mg% FeCl_3 ohne Eisessig

Glyoxylsäure Na; %	0,4	0,8	0,2
E_{555}	0,519	0,537	0,512

Schliesslich vergewisserten wir uns noch, dass auch unter diesen neuen Bedingungen die Extinktion über längere Zeit konstant bleibt; es tritt während 17–20 h keine nennenswerte Veränderung ein. Wie die Abbildung zeigt,



Prüfung der linearen Abhängigkeit von Extinktion und Konzentration
Tryptamin – 0,3% Glyoxylsäure – 10 mg% FeCl_3 puriss.

wird auch das Lambert-Beer'sche Gesetz im geprüften Bereich zwischen 0,0125–0,200 mM Tryptamin (das sind 1,25 bis 20 μ in den 0,5 ml zur Reaktion benötigter Testflüssigkeit) vollkommen erfüllt.

Auf Grund dieser Befunde halten wir die Voraussetzungen für gegeben, um diesen spektrophotometrischen Test als neue quantitative Methode zur Bestimmung von Indolen empfehlen zu können. Ausserdem glauben wir, noch eine weitere Feststellung machen zu dürfen. Wir haben gesehen, dass bei Verwendung von Eisessig mit zunehmenden Mengen von FeCl_3 die Empfindlichkeit der Reaktion gesteigert werden kann. Wird anstatt Eisessig Glyoxylsäure angewandt, so bleiben Ringbildung und

Tabelle III. Tryptamin- und Tryptophanbestimmung bei variierter Menge von FeCl_3 und Glyoxylsäure

FeCl ₃ mg% : Glyoxylsäure mg% :	70 100	70 200	35 100	35 200	17,5 200	17,5 400	8,75 400	4,35 400	0 400	10 300	10 400	10 500
E_{555} Tryptamin	0,197	0,257	0,276	0,370	0,461	0,494	0,548	0,518	0,224	0,530	0,553	0,529
Tryptophan	—	—	—	—	—	0,257	0,291	—	0,194	0,304	—	—

Farbtönung unverändert; zur Erzielung optimaler Extinktionen muss hingegen mit dem FeCl_3 -Zusatz wieder auf sehr kleine Mengen zurückgegangen werden. Dies lässt vermuten, dass dem Eisen neben seiner Funktion der Farbsteigerung noch eine solche als Katalysator zur Bildung von Glyoxylsäure aus Eisessig zukommt, dass also die *Glyoxylsäure* im eigentlichen Zentrum des Reaktionsgeschehens steht. Ist diese bereits in genügender Menge vorgelegt, so wirken – wie Tabelle III beweist – grössere Eisenkonzentrationen nur wieder störend. Die «Keller-Reaktion» wäre demnach als eine Abart der «Hopkins-Cole-Reaktion»⁴ aufzufassen. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass die optimale Extinktionssteigerung der Endfärbung bei Verwendung von Glyoxylsäure in gleicher Weise auch mit CuSO_4 an Stelle von FeCl_3 gelingt, dies allerdings nur mit sehr grossen Mengen (2%) im Vergleich zu den kleinen Mengen (10 mg%) FeCl_3 . Eine solche Verwendung von Kupfersalzen als Intensitätssteigerer ist aber auch von der «Hopkins-Cole-Reaktion» her bereits bekannt⁵.

Die endgültige *Methodik* zur quantitativen Anwendung des Testes ist die folgende:

Es werden sukzessive in ein Reagensglas pipettiert:
0,5 ml indolhaltige Lösung;
1,0 ml glyoxylsaures Na, enthaltend 10 mg% FeCl_3 .

Zur Vermeidung unterschiedlichen Erhitzens durch individuell verschiedene rasches Arbeiten (Schütteln, Abkühlen usw.) wird auf die Beobachtung des Farbringes verzichtet. Man mischt nun unter Schütteln die 2,0 ml ganz langsam (in nicht rascher als 45 s!) einfließende H_2SO_4 fortwährend durch, stellt darauf die Reagensgläser während 3 min ins kochende Wasserbad und kühlzt zur Messung wieder auf Zimmertemperatur ab. Im Blindwert ist die Indollösung durch Wasser ersetzt.

Über Unterschiede in den Absorptionsspektren verschiedener Indolkörper und über die Spezifität der Reaktion für Indole wird in einer folgenden Publikation berichtet.

Die vorliegende Arbeit wurde dank der Unterstützung durch den Emil Barell-Fonds ermöglicht.

H. P. RIEDER und M. BÖHMER

Forschungslaboratorium der Psychiatrischen Universitätsklinik und der Neurologischen Universitäts-Poliklinik Basel, 9. Oktober 1958.

Summary

A spectrophotometric method suitable for quantitative estimation of indole compounds is described. The correlation is discussed between this colour test, derived from the «Keller-reaction», and the «Hopkins-Cole-reaction».

⁴ L. M. RIEGELHAUPT, J. nerv. ment. Disease 123, 383 (1956).
⁵ R. G. GOODALL, Diss. Vancouver (Univ. Brit. Columbia) (1958).

PRO EXPERIMENTIS

Milieu de culture pour *Agrobacterium tumefaciens*

Le microorganisme *Agrobacterium tumefaciens*, pathogène pour les végétaux, doit être cultivé dans des condi-

tions se rapprochant le plus possible du milieu naturel, dans lequel il vit et se propage. Pour cette raison les milieux solides habituels employés en bactériologie, sont généralement peu favorables à sa croissance. Nous avons trouvé un milieu de culture, dont la composition est la suivante:

Eau	1000 ml
KH_2PO_4	0,5 g
K_2HPO_4	0,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ aq}$	0,25
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,2
Glucose	10,0
Gélose Bacto	23,0
Solution oligodynamique ¹	0,5 ml

On ajuste à un pH de 7 à 7,5; on stérilise le milieu à 115° C pendant 15 min. La Gélose est une gélose nutritive Bacto (Difco). On peut utiliser de l'eau de fontaine, à condition qu'elle ne contienne aucun élément bactériotoxique, tel que par exemple du chlore, provenant d'une verdunisation. Il est plus simple d'utiliser de l'eau bidistillée, redistillée dans un appareil entièrement en verre (Pyrex). Dans ce cas, il convient d'ajouter au milieu du jus de carottes râpées, filtré, obtenu par compression des carottes dans une presse de laboratoire. On ajoute environ 1% de jus de carottes au mélange ci-dessus.

Nous avons essayé différentes souches d'*Agrobacterium* sur ce milieu. Nous avons constaté que la croissance des bactéries est de beaucoup supérieure à celle sur les milieux habituels, utilisés jusqu'ici dans ce but.

A. RIEGERT

*Institut de Pharmacologie et de Médecine expérimentale,
Faculté de Médecine de Strasbourg, 3 juillet 1958.*

Summary

The composition of a solid culture medium specially adapted for the culture of *Agrobacterium tumefaciens* is given. The bacterium grows better on this medium than on those previously described.

¹ Solution oligodynamique de BERTHELOT, modifiée par GAUTHERET et par BITANCOURT. – A. BITANCOURT, Rev. gén. Bot. Paris 62, 499 (1955).

INFORMATIONES

Congressus

Deuxième Congrès International de Catalyse

Paris, 4-9 juillet 1960

Président: M. PRETTRE. Toute la correspondance relative au deuxième Congrès International de Catalyse doit être adressée au Secrétaire Général du Congrès, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie, 10, rue Vauquelin, Paris 5^e (France).