



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: 1669/81

(51) Int.Cl.⁴: C 07 D 275/06

(22) Indleveringsdag: 13 apr 1981

A 23 L 1/236

(41) Alm. tilgængelig: 20 okt 1981

(44) Fremlagt: 06 apr 1987

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 19 apr 1980 DE 3015113

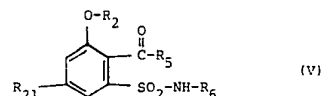
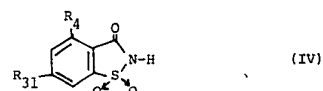
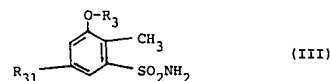
(71) Ansøger: DR. KARL *THOMAE GESELLSCHAFT MIT BESCHRAENKTER HAFTUNG; Biberach an der Riss, DE.

(72) Opfinder: Guenter *Trummlitz; DE, Wolfgang *Eberlein; DE, Wolfhard *Engel; DE, Guenther *Schmidt; DE.

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

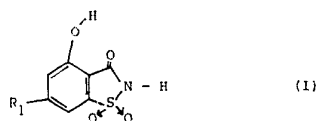
(54) 4-Hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxider og salte deraf og sødestofkompositioner indeholdende disse forbindelser

(57) Sammendrag:



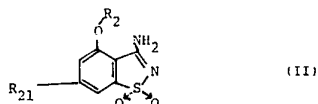
1669-81

4-Hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxider med formel I:



hvor R₁ er H eller OH, og salte deraf med baser.

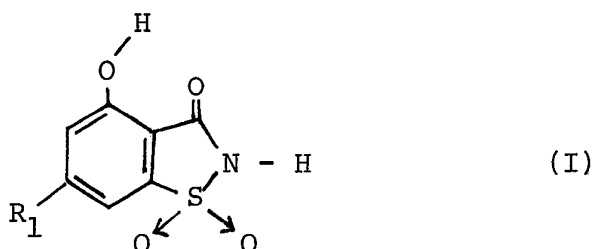
Forbindelserne (I) kan fremstilles på forskellige måder, såsom ud fra mellemprodukter med formel II, III, IV eller V:



hvor R₂ er H, alkyl eller aralkyl, R₂₁ er H, OH, alkoxy eller aralkoxy, R₃ er alkyl eller aralkyl, R₃₁ er H, alkoxy eller aralkoxy, R₄ er en nucleofilt udvekslelig gruppe, R₅ er OH, alkoxy, aryloxy, phenyl- eller naphthylalkoxy, halogen eller anden nucleofilt udvekslelig gruppe, og R₆ er H eller tert.alkyl.

Forbindelserne (I) og deres salte har gode sødeegenskaber, er fri for farmakologiske virkninger og er utoxiske. Forbindelserne kan anvendes i sødestofkompositioner, såsom tabletter eller opløsninger.

Den foreliggende opfindelse angår som hidtil ukendte forbindelser 4-hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxider med den almene formel I:



- 5 hvor R_1 er et hydrogenatom eller en hydroxygruppe, deres fysiologisk acceptable salte med uorganiske eller organiske baser og sødestofkompositioner indeholdende disse forbindelser eller nævnte salte deraf samt sædvanlige bære- og/eller hjælpestoffer.
- 10 Som salte af 4-hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxiderne kommer alle fysiologisk acceptable salte i betragtning. Det drejer sig i første række om alkalimetalsaltene, såsom natrium-, kalium- eller ammoniumsaltet, men navnlig natriumsaltet, om jordalkalimetalsaltene, såsom calciumsaltet, men også om andre salte, der er vand-
- 15 opløselige og ugiftige.

Til sødestoffer stilles i almindelighed følgende krav:

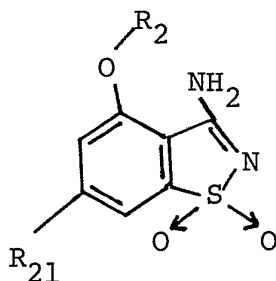
- a) Sødestoffet skal som tilsætning til næringsmidler være absolut sikkert og må ikke vise nogen toksiske eller farmakologiske virkninger.
- 20 b) Sødestoffet skal have upåklagelige smagskvaliteter, idet egenskaberne i så henseende af saccharose tjener som forbillede. Sødestoffet må således ikke vise nogen bismag eller eftersmag, og dets søde smag skal straks
- 25 komme frem og forsvinde hurtigt igen.
- c) Sødestoffet skal for sin anvendelse være tilstrækkeligt opløseligt i vand, være termostabilt i varme drikke og syrestabilt i frugtsaftdrikke.

Ingen af de hidtil kendte sødestoffer opfylder de ovennævnte krav til fuldkommenhed. Anvendelsen af cyclamat og saccharin som sødestof er således ikke ufarlig, som nogle toksikologiske resultater ved højere doseringer af disse sødestoffer har vist. Sødestoffer med dipeptidstruktur er ikke tilstrækkeligt temperatur- og syrestabile, mens oxathiazinonderivater smagsmæssigt ikke er fuldt tilfredsstillende. Højere molekulære naturstoffer mangler tilstrækkelig stabilitet, og de har endvidere som følge af deres vedvarende eftersmag kun begrænset anvendelighed.

Det har nu vist sig, at 4-hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxiderne med den almene formel I og deres fysiologisk acceptable salte med uorganiske eller organiske baser har mindst lige så god sødestyrke som de hidtil anvendte sødestoffer, har en upåklagelig smagskvalitet uden bi- og eftersmag, er udmærket opløselige i vand og endvidere er temperatur- og syre-stabile. Endvidere er disse forbindelser fri for enhver toksisk og farmakologisk virkning, således at de er absolut sikre i brug.

De omhandlede forbindelser med den almene formel I kan fremstilles på følgende måder:

1) Ved alkalisk forsæbning af 3-amino-1,2-benzisothiazol-1,1-dioxider med den almene formel II



(II)

hvor R_2 er et hydrogenatom, en alkyl- eller aralkylgruppe, fortrinsvis en alkylgruppe med 1-6 C-atomer, eller en benzyl- eller phenylethylgruppe, og R_{21} er et hydrogenatom, en hydroxy-, alkoxy- eller aralkoxygruppe, idet alkoxygruppen fortrinsvis har 1-6 C-atomer, og aralkoxy-

gruppen fortrinsvis er en benzyloxy- eller phenylethyl-oxygruppe.

Når R_2 er et hydrogenatom, og R_{21} er et hydrogenatom eller en hydroxygruppe, opstår ved forsæbningen af
5 denne 3-aminoforbindelse straks slutproduktet med den almene formel I eller dets salt. Hvis derimod R_2 er en alkyl- eller aralkylgruppe, og/eller R_{21} er en alkoxy- eller aralkoxygruppe, bliver disse alkyl- eller aralkylgrupper bagefter fraskilt ved en etherspaltning.

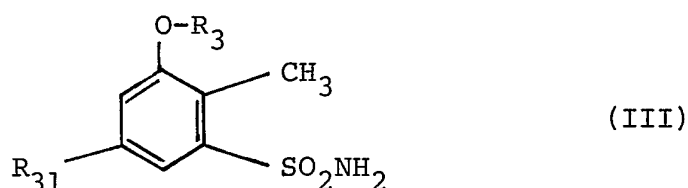
10 Forsæbningen af en forbindelse med den almene formel II gennemføres med baser. Således behandles en vandig opløsning af en forbindelse med den almene formel II med en uorganisk base, for eksempel med et alkalimetahydroxid, såsom natrium- eller kaliumhydroxid, ved temperaturer
15 mellem 50°C og opløsningens kogepunkt. Hvis R_2 i forbindelsen med den almene formel II er et hydrogenatom, eller R_{21} er en hydroxygruppe, er det nødvendigt med mindst to ækvivalenter base, men hvis R_2 er et hydrogenatom, og R_{21} er en hydroxygruppe, kræves mindst tre ækvivalenter base,
20 og ellers er det tilstrækkeligt med ét ækvivalent base eller et lille overskud deraf. Efter forsæbningen syrnes, og hvis produktet ikke udfælder af sig selv, udrystes det vandige medium med et ekstraktionsmiddel, såsom ethylacetat.

25 Den påfølgende etherspaltning hos en således vundet forbindelse, der i 4- og/eller 6-stillingen endnu indeholder en alkoxy- eller aralkoxygruppe, foregår ved sure eller alkaliske metoder. Den sure metode omfatter anvendelse af Lewis-syrer, såsom borhalogenider, aluminiumhalogenider eller pyridinhydrochlorid. Hvis der anvendes borhalogenider, for eksempel bortribromid eller bortrichlorid, arbejdes i aprotiske opløsningsmidler, f.eks. i halogencarbonhydrider, ved temperaturer op til kogepunktet for reaktionsblandingen. Borhalogenidet benyttes fortrinsvis i et molært overskud. Hvis der benyttes aluminiumhalogenider, f.eks. vandfrit aluminiumchlorid, benyttes som
35 aprotisk opløsningsmiddel med fordel carbondisulfid, nitrobenzen eller toluen. Etherspaltningen med pyridinhy-

drochlorid gennemføres fortrinsvis uden opløsningsmiddel i smelte.

Den alkaliske metode gør brug af polært aprotisk opløsningsmiddel, idet navnlig dimethylsulfoxid er egnet, hvorhos denne metode omfatter anvendelse af halogenider eller pseudohalogenider, der anvendes i molære mængder eller i molære overskud på 5 til 10 gange. De nødvendige reaktionstemperaturer ligger inden for området fra 120° til 200°C, fortrinsvis mellem 150° og 180°C. Som halogenider tjener fortrinsvis alkalimetahalogenider, såsom lithiumiodid, -bromid, -chlorid, natriumchlorid, -bromid, -iodid, kaliumchlorid, -bromid, -iodid, men navnlig kaliumbromid, og som alkalimetapseudohalogenider benyttes de tilsvarende cyanider eller rhodanider, men navnlig natrium- og kaliumcyanid eller kaliumrhodanid.

2) Ved oxidation af o-sulfamoyl-toluener med den almene formel III:



hvor R_3 er en alkyl- eller aralkylgruppe, fortrinsvis en alkylgruppe med 1-6 C-atomer eller en benzyl- eller phenylethylgruppe, og R_{31} er et hydrogenatom eller en alkoxy- eller aralkoxygruppe, idet alkoxygruppen fortrinsvis har 1-6 C-atomer, og aralkoxygruppen fortrinsvis er en benzyloxy- eller phenylethyloxygruppe, og påfølgende phenol-etherspaltning.

Som oxidationsmiddel egner sig sædvanlige uorganiske oxidationsmidler, såsom kaliumpermanganat, kaliumchromat eller kaliumdichromat. For eksempel benyttes en alkalisk permanganat-opløsning, såsom en opløsning af kaliumpermanganat og natriumbicarbonat i vand, eller en opløsning af kaliumdichromat i en vandig syre, f.eks. i svovlsyre.

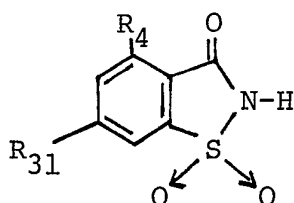
Oxidationen foregår ved temperaturer mellem stuetemperatur og kogepunktet for reaktionsblandingen, og ved

anvendelse af kaliumpermanganat for eksempel mellem 60° og 90°C.

Den påfølgende etherspaltning, dvs. fraspaltningen af gruppen R_3 , og spaltningen af gruppen R_{31} , hvis denne er en alkoxy- eller aralkoxygruppe, foregår ved de under Fremgangsmåde 1 nævnte metoder. Herved dannes en forbindelse med den almene formel I.

3) Ved nucleofil substitution af gruppen R_4 i et 1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid med den almene formel IV:

10



(IV)

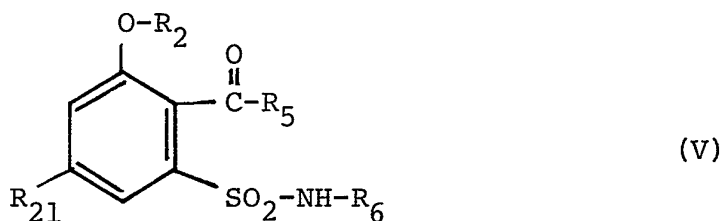
hvor R_{31} er som ovenfor defineret, og R_4 er en nucleofilt udvekslelig gruppe, og derefter, hvis R_{31} er en alkoxy- eller aralkoxygruppe, ved spaltning af phenoethergruppelingen R_{31} . Som nucleofilt udvekslelig gruppe kommer navnlig halogen, pseudohalogen eller en diazoniumkation i betragtning.

Mens der ud fra diazoniumforbindelserne med den almene formel IV på simpel måde kan fremstilles forbindelserne med den almene formel I ved opvarmning til kogepunktet i vandig eller i sur, vandig opløsning, f.eks. i fortyndet svovlsyre, lykkes udvekslingen af et halogenatom eller et pseudohalogen i 4-stilling af formelen IV i nærværelse af katalysatorer. Som katalysatorer egner sig navnlig kobberpulver, kobber(I)- eller kobber(II)-salte i nærværelse af alkalier, f.eks. i nærværelse af natrium- eller kaliumcarbonat. Der anvendes fortrinsvis blandinger af kobberpulver med kobbersalte, f.eks. af kobberpulver med kobber(II)chlorid. Udskiftningen af et halogenatom eller et pseudohalogen, såsom en cyan- eller rhodanidgruppe, foregår i nærværelse af vand ved temperaturer mellem 120° og 160°C. Reaktionen gennemføres i en trykautoklav. Efter reaktionen frafiltreres katalysatoren,

filtratet inddampes, syrnes og ekstraheres, f.eks. med ether.

Hvis der skal vindes forbindelser med den almene formel I, hvor R er en hydroxygruppe, skal der endnu gennemføres en phenoleterspaltning analog med de under Fremgangsmåde 1 nævnte metoder.

4) Et 2-sulfamoyl-3-carboxylsyrederivat med den almene formel V:



- 10 hvor R_2 og R_{21} er som ovenfor defineret, R_6 er et hydrogenatom eller en tert.-alkylgruppe med 4-19 C-atomer, og R_5 er en nucleofilt udvekslelig gruppe, såsom en hydroxygruppe, en alkoxygruppe med 1-10 C-atomer, en aryloxygruppe, hvis aryldel er en phenyl- eller naphthylgruppe,
- 15 en phenyl- eller naphthylalkoxygruppe med 1-3 C-atomer i alkylendelen eller et halogenatom, bliver ved temperaturer mellem 0° og 100°C , fortrinsvis fra 50° til 70°C , behandlet med syrer, såsom phosphorsyre, polyphosphorsyre, svovlsyre eller med blandinger af sådanne syrer, hvorved
- 20 der indtræder en ringslutning. Det herved dannede slutprodukt isoleres på sædvanlig måde, f.eks. ved tilsætning af is og rensning af det herved dannede bundfald. Reaktionen kan også gennemføres i fravær af en mineralsyre, ved blot opvarmning til temperaturer mellem 100° og 250°C , f.eks.
- 25 også i nærværelse af et opløsningsmiddel, såsom o-dichlorbenzen eller toluen. Også basiske reaktionsbetingelser, f.eks. omsætning i nærværelse af natriummethylat, har vist sig lige så egnede. Hvis R_2 i udgangsforbindelsen er en alkyl- eller aralkylgruppe, eller R_{21} er en alkoxy- eller aralkoxygruppe, bliver den herved vundne forbindelse
- 30 yderligere underkastet en etherspaltning for at vinde et produkt med den almene formel I. Etherspaltningen foregår ved de under Fremgangsmåde 1 nævnte betingelser.

Udgangsforbindelserne med den almene formel II vindes ved, at en eventuelt i 4-stillingen med en alkoxy- eller aralkoxygruppe substitueret 2-nitro-6-alkoxy- (eller 6-aralkoxy-)benzonitril ved hjælp af tin og saltsyre i nærværelse af tin(II)chlorid og opvarmning under tilba-
gesvaling reduceres til den tilsvarende, eventuelt i 4-stillingen med en alkoxy- eller aralkoxygruppe substitueret 2-amino-6-alkoxy- (eller 6-aralkoxy)benzonitril, hvorefter denne i nærværelse af iseddike og saltsyre diazoteres med natriumnitrit. Reaktionsblandingen indføres derefter i en opløsning af svovldioxid i iseddike ved 20°C, og der tildryppes langsomt en vandig opløsning af kobber(II)chlorid. Der udskilles et sulfochlorid, der opløses i dioxan, og hvortil der sættes ethanol og vandig, koncentreret ammoniak. Ringslutningen til det eventuelt i 4-stilling med en alkoxy- eller aralkoxygruppe substituerede 3-amino-4-alkoxy- (eller 4-aralkoxy-)1,2-benzisothiazol-1,1-dioxid afsluttes ved opvarmning ved 40°C. Hvis der efter det sidste trin tilsættes et alkalimetahalogenid eller -pseudohalogenid f.eks. i dimethylsulfoxid, såsom kaliumcyanid, vindes direkte 3-amino-4-hydroxy-1,2-benzisothiazol-1,1-dioxidet eller 3-amino-4,6-dihydroxy-1,2-benzisothiazol-1,1-dioxidet.

Udgangsforbindelsen med den almene formel III, hvor R_{31} er et hydrogenatom, kan vindes ud fra den tilsvarende o-alkoxy- (eller o-aralkoxy-)o'-nitro-toluen, idet denne forbindelse, opløst i en alkohol, f.eks. ethanol, hydrogeneres med Raney-nikkel, ved 100 bar, indtil der er optaget den teoretiske hydrogenmængde, hvorved der dannes den tilsvarende 3-alkoxy- (eller 3-aralkoxy-)2-methylanilin. Sidstnævnte forbindelse opløses derefter i en med luftformig hydrogenchlorid mættet, 50%'s eddikesyre og diazoteres med natriumnitrit. Til den resulterende diazoniumsaltopløsning sættes magnesiumsulfat, og den hældes derefter på en med svovldioxid mættet iseddike, hvortil der forud er sat noget kobber(I)chlorid. Efter 4 timers omrøring ved stuetemperatur tilsættes vand, og der ekstraheres med methylenchlorid. Ekstrakten bliver efter

fjernelse af ekstraktionsmidlet destilleret i vakuum, og til det herved vundne rene sulfonsyrechlorid, opløst i ethanol, sættes koncentreret, vandig ammoniak. Herved dannes det tilsvarende 3-alkoxy- eller 3-aralkoxy-2-methyl-benzensulfonamid med den almene formel III. Fremstillingen af udgangsforbindelserne med den almene formel III, hvor R_{31} er en alkoxy- eller aralkoxygruppe, gennemføres analogt ud fra de tilsvarende p-alkoxy-(eller p-aralkoxy)-o'-nitro-toluener.

10 Udgangsforbindelserne med den almene formel IV vindes for eksempel ud fra den i 6-stilling med en nucleofilt udvekslelig gruppe (f.eks. med et chloratom) substituerede 2-nitro-toluen ved hydrogenering af denne med Raney-nikkel i nærværelse af et opløsningsmiddel, såsom alkohol.

15 Herved dannes den tilsvarende, i 3-stilling substituerede 2-methyl-anilin, der derefter diazoteres i koncentreret saltsyre med natriumnitrit ved fra -7° til -3°C . Filtratet bliver i en tynd stråle hældt til en suspension af kobber(II)chlorid i en 30%'s opløsning af svovldioxid i iseddike. Der indtræder en opvarmning til ca. 40°C under stærk luftartudvikling. Der omrøres i yderligere ca. 1 time ved 20°C og yderligere en time ved 35°C og tilsættes is under omrøring. Det vundne, i 3-stilling tilsvarende substituerede 2-methylbenzensulfonsyrechlorid opløses

25 derefter i dioxan og omsættes med en ethanolisk ammoniakopløsning ved temperaturer mellem 50° og 80°C til det tilsvarende i 3-stilling substituerede 2-methyl-benzensulfonamid. Dette sulfonamid bliver sammen med kaliumcarbonat og kaliumpermanganat i vand opvarmet 1 time under

30 tilbagesvaling. Reaktionsblandingen filtreres varmt, og filterresten vaskes med varmt vand. De samlede filtrater syrnes med saltsyre og afkøles. Der vindes det tilsvarende i 4-stilling substituerede 1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid med den almene formel IV.

35 Udgangsforbindelserne med den almene formel V kan for eksempel fremstilles på følgende måde: En m-alkoxy-(eller aralkoxy-)anilin, opløst i et polært opløsningsmiddel, f.eks. iseddike, diazoteres ved tilsætning af

saltsyre og natriumnitrit, og reaktionsblandingen hældes langsomt i en blanding af kobber(II)chlorid og kobber(I)-chlorid i en 30%'s opløsning af svovldioxid i iseddike. Reaktionstemperaturen stiger under luftartudvikling til

5 ca. 40°C, der opvarmes endnu 1 time ved denne temperatur og fortyndes derefter med isvand. Fra den organiske fase isoleres det i 3-stilling tilsvarende substituerede benzensulfonsyrechlorid, der opløses i tetrahydrofuran og omsættes med tert.butylamin (ca. 7 timer ved 60°C). Fra

10 reaktionsblandingen isoleres N-tert.-butyl-3-alkoxy-(eller 3-aralkoxy-)bensulfonamidet. Andre grupper R_6 kan fremstilles analogt ved omsætning med andre aminer med formelen R_6-NH_2 . De således vundne bensulfonamider opløses derefter i vandfri tetrahydrofuran og omsættes ved

15 fra -80° til -50°C med lithiumdiisopropylamid eller n-butyllithium. Derefter omrøres reaktionsblandingen ved 0°C i endnu ca. 1 time, afkøles til fra -70° til -50°C og behandles med luftformigt carbondioxid. Reaktionen får lov at løbe til ende ved stuetemperatur, og fra re-

20 aktionsblandingen isoleres 2-(N-tert.butyl)-sulfamoyl-6-alkoxy-(eller aralkoxy-)benzoesyren med den almene formel V, idet R_5 i dette tilfælde betyder en hydroxygruppe og R_6 en tert.butylgruppe. Ved anvendelse af andre aminer med formelen R_6-NH_2 vindes de tilsvarende, i 2-stilling

25 substituerede sulfamoylbenzoesyrer. Disse benzoesyrer kan derefter forestres på i og for sig kendt måde.

Som ovenfor omtalt har forbindelserne med den almene formel I og deres fysiologisk acceptable salte sødestofegenskaber.

30 For eksempel er forbindelserne:

4-hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid =A

4-hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid-natriumsalt =B

4,6-dihydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid =C

35 undersøgt ved sammenligning med de kendte støddestoffer:

cyclamat =X

saccharin =Y

og ved sammenligning med den fra litteraturen, jf. C.Finzi et al.: "Chemical constitution and sweet taste" [Chemical Abstracts, vol.32 (1938), side 3761-3762], kendte forbindelse:

5 6-hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid =Z

A. Bestemmelse af sødestofegenskaberne.

1) Bestemmelse af grænsekonzentrationen (threshold concentration).

10 Af forbindelserne A, B og C og af sammenligningsforbindelserne X, Y og Z blev der fremstillet vandige opløsninger i koncentrationerne 1:12500, 1:25000, 1:50000, 1:100000 og 1:200000, og opløsningerne blev af hver gang 5 prøvesmagere vurderet efter følgende kriterier: meget
15 sød (= 3 point), middelsød (= 2 point), svagt sød (= 1 point) og ikke sød (= 0 point). Den videre gennemførelse af prøven foregik efter angivelserne ifølge H.G. Schutz og F.J. Pilgrim [Food Research 22, 206 (1957)]. Den som sød fornemmede fortynding er defineret som den koncen-
20 tation, ved hvilken middelværdien for vurderingspointene når 1,0 eller mere.

I følgende Tabel I er samlet de opnåede resultater:

Tabel I

25

Forbindelse	Konzentration	Middelværdi af vurderingspoint	Som sød fornemmet fortynding
30 A	1:25 000	2,4	1:50 000
	1:50 000	1,0	
	1:100 000	0,2	
35 B	1:25 000	2,6	1:50 000
	1:50 000	1,2	
	1:100 000	0,0	
C	1:25 000	1,8	1:50 000
	1:50 000	1,0	
	1:100 000	0,0	(fortsættes)

	Sammenlig- ningsfor- bindelser	Koncentration	Middelværdi af vurde- ringspoint	Som sød fornemmet fortynding
5	X	1:12 500	0,6	> 1:12 500
		1:25 000	0,2	
		1:50 000	0,0	
	Y	1:25 000	2,4	1:50 000
		1:50 000	1,2	
		1:100 000	0,4	
10	Z	1:25 000	1,4	1:25 000
		1:50 000	0,6	
		1:100 000	0,0	

2) Bestemmelse af relativ sødestyrke sammenlignet med saccharose.

15 Den relative sødestyrke (ofte defineret som sød-
ningsgrad) af sødestoffer sammenlignet med saccharose
(rørsukker) ændrer sig inden for vide grænser med koncen-
trationerne. Således svinger inden for de sædvanlige kon-
centrationer (svarende til en 2-10%'s saccharoseopløsning)
20 den relative sødestyrke af saccharin mellem 200 og 700.
Ved bestemmelse af den relative sødestyrke af de oven-
nævnte forbindelser blev der derfor altid anvendt en 3%'s
vandig saccharoseopløsning som sammenligning.

Den videre gennemførelse af bestemmelsen af den re-
25 lative sødestyrke foregik vidtgående efter angivelserne
af R. Pauli [Chemiker-Zeitung 44, 744 (1920)] og T. Paul
[Chemiker-Zeitung 45, 38 (1921)]. Hver undersøgelsesrække
blev undersøgt af 5 prøvesmagere.

De med forbindelserne A, B og C og med sammenlig-
30 ningsforbindelserne X og Z opnåede resultater er samlet
i følgende Tabel II.

Tabel II

	Forbindelse	Relativ sødestyrke Saccharose = 1
5	A	210
	B	210
	C	180
	Sammenlignings- forbindelse	
	X	45
10	Z	140

3) Bestemmelse af smagskvalitet.

Foruden den absolutte sødestyrke er smagskvaliteten af et sødestof af stor betydning.

For eksempel overtræffer saccharin og cyclamat
 15 saccharose flere gange med hensyn til deres absolutte sødestyrke, men de har langt fra saccharosens smagskvaliteter. Således lader den kendte metallisk-bitre eftersmag og den bitre bismag af saccharin sig klart demonstrere ved smagsprøvninger. Da et af hovedkravene til et sødestof er en med saccharose sammenlignelig smag, gennem-
 20 førtes en bestemmelse af smagskvaliteterne.

Prøven foregik ved metoden ifølge DuBois, G.A.Crosby, R.A. Stephanson og R.E. Wingard Jr., [J.Agric. Food Chem. 25, 763 (1977)]. Stofprøverne anvendtes som vandige
 25 opløsninger i en koncentration, der svarede til ca. en 5%'s saccharoseopløsning. Som sammenligning tjente saccharose. Forsøgene blev gennemført under identiske ydre betingelser. Der blev kun vurderet Karakterisering af smagen, da intensiteten allerede var bestemt i forudgående
 30 forsøg. Af hver prøvesmager bestemtes følgende kriterier: procentsats sød til procentsats bitter til procentsats anden smagskvalitet og tilstedeværelse eller fraværelse af en eftersmag hos de enkelte prøver. For hvert stof gennemførtes to gange fem bestemmelser, og resultaterne

er anført i følgende Tabel III.

Tabel III

5	Forbin- delse	Koncen- tration	Antal bestem- melser	Procentsats for andel			Efter- smag
				sød	bitter	anden	
10	A	1:10 000	10	94	2	4	3
	B	1:10 000	10	96	2	2	5
	C	1:10 000	10	86	3	11	8
	Sammenlig- ningsfor- bindelser						
	Y	1:10 000	10	72	21	7	80
	Z	1:10 000	10	81	7	12	29
	Saccharose	1:20	10	98	0	2	4

15 Af tabellen fremgår: Idealprofilen for saccharose opnås langt fra af sammenligningsforbindelserne Y og Z. Derimod viser forbindelserne A til C en vidtgående frihed for eftersmag, hvilket er overraskende for sødestoffer. Ligeledes er smagsrenheden (94-96%) for forbindelserne A og B og 86% for forbindelsen C usædvanlig god for sødestoffer.

4) Bestemmelse af opløselighed og syrestabilitet.

25 Et yderligere krav til et sødestof er god vandopløselighed og stabilitet i surt medium. Orienterende blev det fastslået, at forbindelsen B er let opløselig i vand (opløselighed » 1 g/10 ml vand).

30 Ved en orienterende stabilitetsundersøgelse blev forbindelsen B opløst i 0,1N saltsyre i en koncentration på 1% og henstillet 27 dage ved stuetemperatur. Der indtrådte ingen ændring. Endvidere blev det faste stof prøvet i dagslys og ved 60°C med og uden lysudelukkelse over 4 uger. Der indtrådte heller ikke her nogen forandring.

B. Undersøgelse af eventuelle farmakologiske virkninger.

Forbindelsen B blev undersøgt indgående for eventuelle farmakologiske og toksiske virkninger. I det følgende er de enkelte undersøgelser og deres resultater beskrevet

5 kort:

1. Beroligende eller stimulerende virkning:

Indvirkning på motilitet af mus.

Metode:

Otte hunmus Chbb:NMRI (SPF) med en vægt på 20-26 g
 10 blev efter oral stofindgift i suspension i 1%'s tylose enkeltvis sat i lysstakitaktivitetsbure, og deres motilitet målt 30, 90 og 150 minutter efter stofindgift i hver gang 5 minutter og blev vurderet som procent af motiliteten af en suspensionsmiddel-kontrolgruppe (tylose:
 15 carboxymethylcellulose).

Resultater:

Tabel 1: Motilitet af mus, kontakter/dyr $\pm$ SD

Behandling	N	min. efter indgift		
		30-35	90-95	150-155
20 Kontrol	8	90 $\pm$ 35	83 $\pm$ 22	68 $\pm$ 23
Forbindelse B 200 mg/kg p.o.	8	92 $\pm$ 21	84 $\pm$ 28	49 $\pm$ 17
Forbindelse B % motilitet		102	101	72

25 N = Antal dyr.

Forbindelsen B påvirkede i den store dosis på 200 mg/kg p.o. ikke motiliteten af mus.

2. Beroligende eller stimulerende virkning:

Påvirkning af motiliteten af rotter.

30 Metode:

Ifølge Führer og Feldhofen (Arzneum.-Forsch. 11, 1027, 1961) blev forbindelsen B i en mængde på 100 mg/kg p.o. i suspension i 1%'s tylose indgivet hunrotter Chbb: THOM (SPF) med en vægt på 160-190 g, og motiliteten af de
 35 enkelte dyr, der befandt sig i forsøgsbure, bestemtes fra

15

1 time efter stofindgift over en periode på 30 minutter og blev vurderet i procent af motiliteten af en tylose-kontrolgruppe.

Resultater:

5 Tabel 2: Motilitet af rotter, kontakter/dyr $\pm$ SD

10

Behandling	N	min. efter indgift 60-90
Kontrol	6	208 $\pm$ 49
Forbindelse B 100 mg/kg p.o.	6	235 $\pm$ 58
Forbindelse B % motilitet		113

N = Antal dyr.

15 Forbindelsen B påvirkede i en dosis på 100 mg/kg p.o. ikke motiliteten af rotter.

3. Muskelafslappende virkning og/eller ataxi-virkning.

Påvirkning af holdeevnen hos mus i roterende metaltråds-cylindre.

Metode:

20 Ifølge YOUNG og LEWIS (Science 105, 368, 1947) blev
10 hunmus Chbb:NMRI (SPF) med en vægt på 20-26 g, efter
oral indgift af 400 mg/kg forbindelse i opløsning i de-
stilleret vand, undersøgt for deres holdeevne i langsomt
roterende, skråtstillede metaltråds-cylindre inden for
25 tidsrummene 30-60, 90-120, 210-240 og 270-300 minutter.

Resultat:

Tabel 3: Indvirkning på holdeevnen hos mus

30

Behandling	N	udfaldne dyr, min. efter indgift			
		30-60	90-120	210-240	270-300
Forbindelse B 400 mg/kg p.o.	10	2	2	1	0

N = Antal dyr.

Forbindelsen B havde selv i den meget store dosis på 400 mg/kg p.o. praktisk taget ingen indvirkning på mu-

senes fastholdelsesevne. Forbindelsen virkede ikke muskel-afslappende og/eller koordinationshæmmende.

4. Barbitursyreforstærkende virkning.

Indvirkning på varigheden af hexobarbitalnarkose hos mus.

5 Metode:

- Ifølge WINTER (J.Pharmacol.exp.Ther. 94, 7, 1948) fik 10 hanmus Chbb:NMRI (SPF) med en vægt på 20-26 g 100 mg/kg p.o. af forsøgsforbindelsen B i suspension i 1%'s tylose. En kontrolgruppe fik suspensionsmidlet.
- 10 1 Time senere fik alle dyrene en i.p.-injektion på 80 mg/kg af hexobarbital. Musene blev lagt på en 37°C varm metalplade, og tidsrummet fra indtrædende stillingsreflektab til stillingsrefleks-genoptræden målt som narkosevarighed. Denne blev vurderet i procent af suspensions-
- 15 middelkontroldyr.

Resultat:

Tabel 4: Indvirkning på varighed af hexobarbitalnarkose hos mus.

Behandling	Narkosevarighed	
	min. $\pm$ SD	%
Forbindelse B 100 mg/kg p.o.	15,65 $\pm$ 6,32	106
Kontrol	14,70 $\pm$ 3,62	100

- Forbindelsen B havde i en dosis på 100 mg/kg p.o. på mus ingen indvirkning på varigheden af hexobarbitalnarkose.

5. Antikonvulsiv virkning.

Indvirkning på maksimal elektrokrampe hos mus.

Metode:

- Ifølge SWINYARD, BROWN og GOODMAN (J.Pharmacol.exp. Ther. 106, 319, 1952) fik 10 hanmus Chbb:NMRI (SPF) med en vægt på 20-26 g indgivet forbindelsen B i opløsning i destilleret vand i en dosis på 200 mg/kg p.o. Hos dyrene blev der 30, 150 og 300 minutter senere udløst toniske
- 35 extensorkramper over kobberelektroder med vekselstrøm (50 mA, 50 Hz, 2 sekunders varighed). Antikonvulsivt vir-

kende forbindelser lader ikke de toniske extensorkramper i ekstremiteterne optræde.

Resultat:

Tabel 5: Indvirkning på maksimal elektrokrampe hos mus.

5	Behandling	N	Antal beskyttede dyr		
			30	150	300 min. efter stofindgift
	Forbindelse B 200 mg/kg p.o.	10	0	0	0

N = Antal dyr.

- 10 Forbindelsen B havde i en dosis på 200 mg/kg p.o. på mus ingen antikonvulsiv virkning.

6. Antidepressiv virkning.

Indvirkning på reserpin-hypotermi hos mus.

Metode:

- 15 Ifølge ASKEW (Life Sci. 2, 275, 1963) blev der hos hanmus Chbb:NMRI (SPF) med en vægt på 20-26 g fremkaldt hypotermi med 3 mg/kg reserpin s.c. 17 Timer senere målt hos alle dyr den sænkede legemstemperatur, og derefter blev forbindelsen B i opløsning i destilleret vand
- 20 indgivet oralt i en dosis på 40 og 100 mg/kg på 10 dyr/dosis. En kontrolgruppe fik opløsningsmidlet p.o. 1-4 Timer efter stofindgift målt temperaturen hver time. De i tabellen anførte værdier er temperatur-gennemsnitsværdier $\pm$ SD.

25 Resultat:

Tabel 6: Opførsel af legemstemperatur sammenlignet med kontroldyr, °C $\pm$ SD

30	Behandling	N	Før stofindgift	Timer efter stofindgift			
				1	2	3	4
	Kontrol	10	22,6 $\pm 0,2$	24,6 $\pm 1,3$	25,7 $\pm 1,9$	26,2 $\pm 2,1$	26,5 $\pm 1,9$
	Forbindelse B 40 mg/kg p.o.	10	22,7 $\pm 0,3$	24,0 $\pm 1,4$	24,7 $\pm 1,7$	25,3 $\pm 1,7$	25,9 $\pm 1,4$
35	Forbindelse B 100 mg/kg p.o.	10	23,3 $\pm 0,5$	26,0 $\pm 1,7$	26,7 $\pm 1,4$	26,6 $\pm 1,2$	26,8 $\pm 1,4$

N = Antal dyr.

Forbindelsen B havde i en dosis på 40 og 100 mg/kg p.o. praktisk taget ingen indvirkning på reserpin-hypotermien hos mus.

7. Antiexsudativ virkning.

5 Indvirkning på kaolinødem hos rotter.

Metode:

Ifølge HILLEBRECHT (Arzneim.-Forsch. 4, 607, 1954) blev der hos Chbb:THOM-rotter (SPF) af begge køn og med en vægt på 125-150 g ved subplantar injektion af 0,05 ml af en 10%'s kaolinsuspension i en bagpote udløst et ødem. 30 Minutter tidligere blev forbindelsen B i opløsning i destilleret vand indgivet oralt på 10 forsøgsdyr i en dosis på 100 mg/kg. 10 Kontrol dyr fik opløsningsmidlet. Forud for stofindgift og 5 timer senere måltet potetyk- kelsen. Den ødem-forandrende virkning blev vurderet i procent af den gennemsnitlige opsvulmningsgrad for kontroldyrene.

Resultat:

Tabel 7: Virkning over for kaolinødem hos rotter.

20	Behandling	N	Gennemsnitlig opsvulmnings- værdi	Hæmning i %
	Forbindelse B 100 mg/kg p.o.	10	239,0	13,7
25	Kontrol	10	277,0	

N = Antal dyr.

Forbindelsen B havde i en dosis på 100 mg/kg p.o. på rotter praktisk taget ingen antiexsudativ virkning.

8. Ulcerogen virkning hos rotter.

30 Metode:

Ti hun- og han-rotter (1:1) Chbb:THOM (SPF) med en vægt på ca. 200 g fik oralt forbindelsen B i 1%'s tylosesuspension i en dosis på 200 mg/kg. En kontrolgruppe fik suspensionsmidlet. 4 Timer senere blev alle dyr dræbt, maven blev fripræpareret og undersøgt for slimhudslæsio-
ner.

Resultat:

Tabel 8: Ulcerogen virkning hos rotter.

	Behandling	N	Dyr med mavelæsioner
	Forbindelse B 200 mg/kg p.o.	10	0
5	Kontrol	10	0

N = Antal dyr.

Forbindelsen B havde i en dosis på 200 mg/kg p.o. på rotter ingen ulcerogen virkning.

9. Indvirkning på cholerease hos rotter.

10 Metode:

Hos fastende hanrotter Chbb:THOM (SPF) med en vægt på 180-220 g blev under urethannarkose en kanyle bundet ind i Ductus choledochus, og galdevæsken blev registreret over dråbetæller. Hver gang 10 dyr fik intraduodenalt forbindelsen B i opløsning i destilleret vand i en dosis på 100 eller 200 mg/kg. En kontrolgruppe fik opløsningsmidlet. Antallet af dråber i løbet af 1 time før behandling blev sammenlignet med antallet 1-5 timer efter behandling.

20 Resultat:

Tabel 9: Cholerease hos rotter, gennemsnitligt dråbeantal /time $\pm$ SD

	Behandling	N	Forværdi	Timer efter behandling				
				1	2	3	4	5
25	Kontrol	10	62,6 $\pm 4,8$	57,1 $\pm 4,8$	55,8 $\pm 5,1$	56,3 $\pm 6,0$	56,6 $\pm 6,9$	58,1 $\pm 10,0$
	Forbindelse B 100 mg/kg i.d.	10	55,1 $\pm 9,1$	53,3 $\pm 10,1$	51,7 $\pm 9,2$	50,7 $\pm 9,3$	49,9 $\pm 9,2$	49,5 $\pm 9,1$
30	Forbindelse B 200 mg/kg i.d.	10	47,1 $\pm 11,5$	44,1 $\pm 9,8$	43,1 $\pm 10,3$	43,1 $\pm 8,2$	43,5 $\pm 8,2$	44,4 $\pm 8,0$

N = Antal dyr.

I Tabel 10 er anført det gennemsnitlige dråbetal 1-5 timer efter behandling som procent af den tilsvarende forværdi.

Tabel 10: Cholerese hos rotter i procent af værdien før behandling.

	Behandling	N	For-værdi	Timer efter behandling				
				1	2	3	4	5
5	Kontrol	10	100	91	89	90	90	93
	Forbindelse B 100 mg/kg i.d.	10	100	97	94	92	91	90
	Forbindelse B 200 mg/kg i.d.	10	100	94	92	92	92	94

10 N = Antal dyr.

Som det fremgår af Tabel 9 og 10, havde forbindelsen B i en dosis på 100 og 200 mg/kg intraduodenalt ingen indvirkning på cholerese hos rotter.

10. Kredsløbsvirkning.

15 Indvirkning på kredsløbet hos narkotiserede katte.

Metode:

På 3 voksne katte i nembutalnarkose målttes følgende parametre:

Arterielt blodtryk i Arteria carotis med Statham-tryk-
20 omveksler.

Hjertefrekvens med en Grass-tachograf.

Åndingsfrekvens med en Fleisch pneumotachograf.

Forbindelsen B blev i opløsning i destilleret vand indgivet i.v. i en dosis på 10 mg/kg.

25 Resultat:

Tabel 11: Blodtryk, hjertefrekvens og åndingsfrekvens hos narkotiserede katte, procentvis forandring i forhold til værdier før stofindgift.

	Behandling	N	Procentvise forandringer		
			Blod-tryk	Hjerte-frekvens	Åndings-frekvens
30	Forbindelse B 10 mg/kg i.v.	3	+1	-1	-2

35 N = Antal dyr.

Forbindelsen B havde i en dosis på 10 mg/kg i.v. ingen indvirkning på det arterielle blodtryk, hjerterefrekvensen og åndingsfrekvensen hos narkotiserede katte.

11. Indvirkning på thrombocytaggregation.

5 Metode:

Thrombocytaggregationen målt ifølge BORN og CROSS (J.Physiol. 170, 397, 1964) i ved centrifugering af menneske-citratblod vundet pladerig plasma. Parametre var den procentvise forandring af den maksimale aggregationshastighed sammenlignet med en kontrol og den procentvise forandring af "optical density".

Aggregationen udløstes med collagen.

Resultat:

Tabel 12: Virkning på collagen-betinget thrombocytaggregation.

Behandling	Forandring i %:	
	maks.aggregationshastighed	"optical density"
Forbindelse B 10^{-4} mol/l	± 0	± 0

Forbindelsen B havde i en dosis på 1×10^{-4} mol/l ingen indvirkning på collagen-betinget thrombocytaggregation.

12. Bakteriostase og fungistase.

25 Metoder:

Forbindelsen B blev ved rækkefortyndingsprøve og ved agar-diffusionsprøve undersøgt for bakterie- og fungihæmmende virkning.

Resultat:

30 Ved rækkefortyndingsprøven havde forbindelsen B i en dosis på 320 µg/ml ingen virkning på Staphylococcus aureus SG 511, Streptococcus Aronson, Sc.pyogenes ATCC 8668, Escherichia coli ATCC 9637, Pseudomonas aeruginosa Hbg., Serratia marcescens ATCC 13880, Candida albicans
35 ATCC 10231, Trychophyton mentagrophytes ATCC 9129 og Aspergillus niger.

Også ved agardiffusionsprøven var forbindelsen B i en dosis på 16.000 µg/ml uvirksom over for de samme kim.

13. Diuretisk virkning.

Indvirkning på diurese hos rotter.

5 Metode:

Hanrotter Chbb:THOM (SPF) med en vægt på 180-210 g blev, under adgang til vand, berøvet næring 24 timer før forsøget. Forbindelsen B i opløsning i destilleret vand blev med 6 dyr/dosis indgivet oralt i doseringer på 50, 100 og 200 mg/kg, idet der anvendtes 1 ml/100 g legemsvægt. Yderligere blev der indgivet vand oralt i en mængde på 4 ml/100 g legemsvægt. En kontrolgruppe fik opløsningsmidlet og vandmængden oralt.

5 Timer efter behandling blev for hver behandlingsgruppe urinvolumenet og koncentrationen af Na^+ , K^+ og Cl^- bestemt fotometrisk og kompleksometrisk.

Resultat:

Tabel 13: Diurese hos vandbelastede rotter.

Behandling	N	Mikroval./kg			Urin ml/kg
		Na^+	K^+	Cl^-	
Forbindelse B 50 mg/kg p.o.	6	456,6	456,6	616,4	45,7
100 "	6	401,9	321,5	325,5	40,2
200 "	6	467,6	425,1	535,7	42,5
Kontrol	6	274,9	471,2	353,4	39,3

N = Antal dyr

Forbindelsen B havde i doser på 50, 100 og 200 mg/kg p.o. ingen indvirkning på diurese hos rotter. Alle fundne udskillelsværdier lå inden for usikkerhedsområdet ($p \leq 0,05$) for 50 kontrolgennemsnitsværdier:

Na^+ : 154,3 - 660,9 µval./kg

K^+ : 146,3 - 550,0 µval./kg

Cl^- : 189,9 - 673,1 µval./kg

Volumen: 37,1-49,3 ml/kg

14. Slimhuds-tolerance.

Lokal tolerance på kaninungeøje.

Metode:

Hver gang 4 kaninunger (begge køn) fik i conjunktiv-
 5 valsækken af et øje inddryppet 1 dråbe af en 1%'s opløs-
 ning af forbindelsen B i dest.vand, og øjnene blev obser-
 veret 15, 30, 60, 90, 120 minutter samt 24 timer senere
 for conjunktivapirring (rødmen, slimafsondring, osv.)
 samt for pupilændring. Dyrets andet øje tjente som kon-
 10 trol.

Resultat:

Tabel 14: Lokal tolerance, kaninungeøje.

Behandling	N	Observation
Forbindelse B		
1 %'s	4	ingen conjunktivapirring, ingen pupilforandring
10 %'s	4	ingen conjunktivapirring, ingen pupilforandring

N = Antal dyr.

20 Forbindelsen B tålttes godt af kaninunger ved ind-
 drypning af forbindelsesopløsning i øjet.

C. Undersøgelse af eventuelle akutte, subakutte, toksiske
 og mutagene virkninger.

1. Undersøgelse af akut toxicitet.

25 Den akutte toxicitet af forbindelsen B bestemtes
 efter oral indgift på mus, rotter og hunde af begge køn.
 Forbindelsen blev indgivet som suspension i tylose i til-
 fælde af mus og rotter og som opløsning i vand i tilfælde
 af hunde. I nedenstående tabel er anført de efter de an-
 30 givne doseringer inden for 1, 7 og 14 dage døde dyr.

Dyreart	Dosis	Antal dyr	Døde dyr inden for observationstiden		
			1 dag	7 dage	14 dage
Mus	10 g/kg	10	0	0	0
Rotte	10 g/kg	6	0	0	0
35 Hund	.5 g/kg	2	0	0	0

Inden for observationstiden er ikke blot ingen dyr døde, men der kunne hos dyrene ikke observeres nogen toksiske symptomer. Alle dyr overlevede i fuldt normal tilstand den meget høje dosering på 10 g/kg.

5 2. Undersøgelse af subakut toxicitet.

Den subakutte toxicitet af forbindelsen B undersøges på rotter og hunde.

Undersøgelse på rotter:

Der anvendtes til forsøget 10 hanrotter og 10 hun-
10 rotter af stammen Chbb:THOM. Over et tidsrum på 5 uger fik dyrene daglig 750 mg/kg af forbindelsen B. Under det fastsatte forsøgstidsrum forholdt dyrene sig upåfaldende. Spontandødsfald optrådte ikke. Efter forløbet af de 5 behandlingsuger blev dyrene dræbt, og følgende organer blev
15 præpareret for en histologisk undersøgelse: hjerte, lunge, lever, milt, binyre, hjerne, nyre og bugspytkirtel.

Den histologiske undersøgelse af disse organer viste ingen patologiske fund, der kunne bringes i forbindelse med stofindgiften.

20 Undersøgelse på hunde:

Af denne dyreart blev der til forsøget udtaget 3 han- og hun-Beaglehunde. Disse dyr fik ligeledes over et tidsrum på 5 uger forbindelsen B i en dosering på 750 mg/kg i oral form.

25 Der blev ikke observeret nogen forstyrrelser i almenbefinden. Spontandødsfald optrådte ikke.

Efter forløbet af den fastsatte forsøgstid på 5 uger blev dyrene dræbt, og de samme organer som for rotte blev opbevaret og præpareret.

30 På de nævnte organer kunne der ikke vises fund, der kunne sættes i forbindelse med stofindgiften.

3. Undersøgelse af mutagen virkning.

Det vigtigste krav til et sødestof er, at det er sundhedsmæssigt uskadeligt. Dette krav opfylder de fleste
35 sødestoffer imidlertid ikke. Således viser for eksempel saccharin en mutagen virkning [R.P.Batzinger, S.-Y.L. On og E.Bueding, Science 198, 944 (1977)], der gør dets anvendelse som sødestof betænkelig.

Forbindelsen B blev i AMES-system [Mutation Research 31, 347-364 (1975)] undersøgt for sine mutagene egenskaber. For at kunne påvise det totale spektrum af inducerede molekulære DNA-skader (basesubstitutioner, raserforskydningsmutationer, deletioner) anvendtes som genetiske indikatorer de auxotrofe bakteriestammer *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 og TA 1538.

For alle kim var prøven opbygget således, at ind-
10 virkningen af et mikrosomalt enzymsystem med de tilsvarende cofaktorer på forsøgsforbindelsen og forskelle i enzyminduktionen kunne undersøges. Undersøgelsen foregik uden og med tilsætning af et aktiveringssystem. Til in vitro-aktiveringen anvendtes S-9-"Überstände" (brudstykker af endoplasmatisk reticulum) fra normale, dvs. ikke forbehandlede rotter og fra med Arochlor 1254 (500 mg/kg) inducerede rotter. Af den inducerede S-9-Fraktion blev der prøvet 3 forskellige koncentrationstrin.

Stofkoncentrationerne lå ved 0,25, 2,5, 5 og 10 mg/
20 plade. I en forudgående rækkefortyndingsprøve viste den højeste dosering endnu ingen hæmning af kimvæksten.

Hos ingen af de undersøgte stammer førte forbindelsen B til en stigning i den spontane mutationsrate. En indvirkning af enzyminduktionen og af aktiveringsfraktionen på remutationsfænomener kunne ikke påvises. De talte
25 kolonier på forbindelsespladerne lå inden for spontanområdet for de pågældende forsøgsstammer.

Forsøgene viste, at forbindelsen B ikke udløser nogen basesubstitutioner [*S.typhimurium* TA 1535, TA 100] og
30 ingen "frameshift"-mutationer [*S.typhimurium* TA 1537, TA 1538, TA 98], og der foreligger således ingen tegn på mutagen potent hos forbindelsen B.

Opfindelsen beskrives nærmere gennem følgende eksempler.

Eksempel 1

4-Hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid.

5 g (25,2 mmol) 3-Amino-4-hydroxy-1,2-benzisothiazol-1,1-dioxid og 2,02 g (50,5 mmol) natriumhydroxid blev
 5 i 15 ml vand opvarmet under tilbagesvaling i 6,5 timer. Derefter blev opløsningen ved 60°C behandlet med aktivt kul og filtreret. Filtratet blev ved 60°C syrnede med konc., vandig saltsyre (ca. 5 ml, ca. 0,06 mol). Det dannede bundfald blev frafiltreret, tørret og omkrystalliseret af vand. Der vandtes 4,62 g (92% af det teoretiske)
 10 4-hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid, smp. 228°C.

IR(CH₂Cl₂): 3320 (NH, OH assoc.), 1720 (CO), 1335 og 1140 cm⁻¹ (SO₂)

15 MS: 199 (M⁺), 136, 119 og 108 m/e.

C₇H₅NO₄S (199,19)

Beregnet: C: 42,20 H: 2,53 N: 7,03 S: 16,10

Fundet: 42,23 2,60 6,97 16,10

Udgangsforbindelsen 3-amino-4-hydroxy-1,2-benzisothiazol-1,1-dioxid blev fremstillet på følgende måde ud
 20 fra 2-nitro-6-methoxy-benzonitril (A.Russel og W.G.Tebbens, Org.Synthesis, Coll. bind III, side 293):

2-Amino-6-methoxy-benzonitril.

10 g (56,1 mmol) 2-Nitro-6-methoxy-benzonitril,
 25 26,6 g (220 mmol) tin og 12,7 g (56,1 mmol) tin(II)chlorid blev opvarmet i 160 ml halvkonsentreret saltsyre i 1,5 timer under tilbagesvaling. Derefter blev reaktionsblandingen afkølet til 60°C, og ved denne temperatur blev der tildryppet en opløsning af 40 g natriumhydroxid i 10
 30 ml vand. Efter fuldstændig natriumhydroxidtilsætning (pH: ca. 4) blev pH indstillet på pH 9 ved tilsætning af natriumcarbonat, og det dannede bundfald blev frasuget. Filterresten blev opvarmet med 0,2 liter ethanol i 20 minutter under tilbagesvaling og filtreret. Filtratet blev inddampet og gav 9 g råmateriale. Ekstraktionen af tinhydroxidproduktblandingen blev gentaget og gav yderligere ca. 0,5
 35 g råmateriale.

Råproduktet fra ethanol blev omkrystalliseret under anvendelse af aktivt kul. Den inddampede moderlud gav en anden fraktion af samme renhed. Der vandtes 7,5 g (90% af det teoretiske) 2-amino-6-methoxy-benzonitril med smp. 145°C.

3-Amino-4-methoxy-1,2-benzisothiazol-1,1-dioxid.

10 g (67,5 mmol) 2-Amino-6-methoxy-benzonitril blev ved 60°C opløst i 80 ml iseddike, og der blev på én gang tilsat 80 ml konc., vandig saltsyre. Derefter blev reaktionsblandingen afkølet til -5°C og ved denne temperatur diazoteret ved tildrypning af en opløsning af 4 g natriumnitrit i 18,5 ml vand. Reaktionsblandingen blev efterrørt $\frac{1}{2}$ time (temperaturstigning til ca. 0°C) og indført forsigtigt portionsvis i en forud fremstillet blanding af 94 ml af en 30%'s svovldioxidopløsning i iseddike og en opløsning af 1,7 g kobber(II)chlorid i 4 ml vand. Temperaturen af den forud fremstillede blanding var 20°C, og denne temperatur blev også bibeholdt under indføringen af diazoniumsaltopløsningen.

20 Derefter blev reaktionsblandingen efterrørt i 3 timer, hvorved farven slog om fra rød til gulgrøn, og en del af sulfochloridet udskiltes. Sulfochloridet blev frafiltreret, vasket grundigt med isvand og tørret (sulfochlorid: 1.Fraktion). Filtratet blev inddampet til $\frac{1}{4}$ volumen, og der blev tilsat en fem gange så stor mængde isvand. Det udkrystalliserede sulfochlorid blev frafiltreret, vasket med isvand og tørret (2.Fraktion). De to sulfochlorid-fraktioner blev opløst i 40 ml dioxan og opvarmet til 40°C, og ved denne temperatur blev der dråbevis tilsat en blanding af 20 ml ethanol og 20 ml konc., vandig ammoniak. Efter endt tilsætning blev der omrørt i 1 time ved 40°C og derefter kogt 2 timer under tilbagesvaling. Efter afkøling blev der filtreret fra delprodukt (1.Fraktion), og dette blev vasket med vand, og filtratet blev inddampet til tørhed i vakuum. Inddampningsresten blev suspenderet i vand, frafiltreret og vasket med vand og med lidt kold ethanol (2.Fraktion). Efter påfølgende tørring vandtes ialt 10 g (70% af det teoretiske) 3-amino-

4-methoxy-1,2-benzisothiazol-1,1-dioxid, smp. 273-276°C.
3-Amino-4-hydroxy-1,2-benzisothiazol-1,1-dioxid.

5 g 3-Amino-4-methoxy-1,2-benzisothiazol-1,1-dioxid
 og 1,63 g kaliumcyanid blev i 15 ml dimethylsulfoxid un-
 5 der omrøring opvarmet til en temperatur på 130-140°C
 (badtemperatur 160°C) og holdt 1,5 timer ved denne tem-
 peratur. Den afkølede reaktionsblanding blev indrørt i
 250 ml methylenchlorid, og det udfældede bundfald blev
 frafiltreret, tørret og opløst i 30 ml vand. Opløsningen
 10 blev ved 60°C behandlet med aktivt kul og filtreret varmt.
 Det varme filtrat blev med konc., vandig saltsyre bragt
 til pH 1. Efter afkøling blev det udkrystalliserede pro-
 dukt frasuget, vasket med lidt isvand og tørret i vakuum.
 Der vandtes 43 g (92% af det teoretiske) 3-amino-4-hydro-
 15 xy-1,2-benzisothiazol-1,1-dioxid, smp. 305°C (dek.).

Eksempel 2

4-Hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid-natrium-
 salt.

10 g 4-Hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dio-
 20 xid blev opløst i isopropanol ved en temperatur på 60°C,
 og ved denne temperatur blev der tilsat en støkiometrisk
 mængde natriumhydroxidopløsning (2,0 g i 6 ml vand). Ef-
 ter afkøling blev natriumsaltet af 4-hydroxy-1,2-benziso-
 thiazol-3(2H)-on-1,1-dioxidet frafiltreret, vasket med
 25 isopropanol og ether og tørret. Der vandtes 10,8 g (96%
 af det teoretiske), smp. > 350°C.

IR(KBr): 3320 (NH og OH assoc.), 1730 (CO), 1330 og 1140
 cm^{-1} (SO_2).

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO}-d_6)$: $\delta = 10,6$ (s, 1, OH, udvekslelig med CD_3OD),
 30 7,55 (dd, 1H, $J=4\text{Hz}$, 6-H), 7,20 og 7,05 (to d, hver 1H,
 $J = 4\text{ Hz}$, 5-H og 7-H).

$\text{C}_7\text{H}_4\text{NNaO}_4\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (239,19)

Beregnet: C: 35,15 H: 2,52 N: 5,85 S: 13,41

Fundet: 35,36 2,40 5,88 13,45

Eksempel 3

4,6-Dihydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid.

I 25 ml polyphosphorsyre opvarmet til 60°C blev der indført 1,5 g (4,7 mmol) 2-(N-tert.-butyl)-sulfamoyl-
 5 4,6-dimethoxy-benzoesyre og omrørt 1 time ved 80°C. Reaktionsblandingen blev hældt på is, og det dannede bundfald blev frafiltreret. Filtratet blev ekstraheret tre gange med ethylacetat, og den organiske fase blev tørret og inddampet. Sammen med det ovenfor vundne bundfald blev
 10 inddampningsresten omkrystalliseret af methanol og gav 0,74 g (65% af det teoretiske) 4,6-dimethoxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid, smp. 258°C.

$C_9H_9NO_5S$ (243,25)

Beregnet: C: 44,44 H: 3,93 N: 5,76 S: 13,18

15 Fundet: 44,70 3,75 5,97 13,32

Det vundne 4,6-dimethoxyderivat blev optaget i 25 ml ethylenchlorid, og der blev tilsat 3,05 g (12,2 mmol) bortribromid. Efter 3 timers kogning under tilbagesvaling blev der tilsat yderligere 3,05 g bortribromid og opvarmet yderligere 3 timer under tilbagesvaling. Reaktionsblandingen blev indført i methanol og inddampet flere gange til tørhed under fornyet methanoltilsætning. Inddampningsresten blev optaget i vandig natriumbicarbonatopløsning. Denne opløsning blev vasket med ethylacetat,
 25 indstillet surt med saltsyre og ekstraheret med ethylacetat. Ethylacetatekstrakten blev tørret og inddampet. Inddampningsresten gav, omkrystalliseret af ethylchlorid, 0,31 g (48% af det teoretiske) 4,6-dihydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid, smp. 286°C.

30 IR(KBr): 3420, 3260 (OH,NH), 1700 (CO), 1330 og 1145 cm^{-1} (SO_2).

1H -NMR($CDCl_3$ + CD_3OD): δ = 6,8(d, 1H, J=1,5Hz) og 6,57(d, hver 1H, J=1,5Hz, 3-H og 5-H).

$C_7H_5NO_5S$ (215,19)

35 Beregnet: C: 39,07 H: 2,34 N: 6,51 S: 14,90

Fundet: 39,15 2,60 6,58 14,95

Fremstillingen af udgangsforbindelsen 2-(N-tert.-butyl)-sulfamoyl-4,6-dimethoxy-1,2-benzoesyre foregik ud fra 3,5-dimethoxyanilin ved følgende metode:

3,5-Dimethoxybenzensulfonsyrechlorid.

- 5 Til en opløsning af 26,6 g (0,174 mol) 3,5-dimethoxyanilin i 100 ml iseddike blev der under afkøling (reaktionstemperatur maksimal +20°C) sat 50 ml konc., vandig saltsyre. Under afkøling og ved en temperatur på fra -8° til -3°C blev der i løbet af 35 minutter hertil dryppet
- 10 en opløsning af 12 g (0,174 mol) natriumnitrit i 25 ml vand. Efter at der var eftererrørt 1 time i kuldebad, blev der filtreret, og det mørkebrune filtrat blev ved en temperatur på 20-25°C hældt i en omrørt suspension af 10,2 g (60 mmol) kobber(II)chlorid og 2 g (20 mmol) kobber(I)-
- 15 chlorid i 120 ml af en 30%'s opløsning af svovldioxid i iseddike. Reaktionstemperaturen steg først til 40°C, og efter at den var sunket, blev der opvarmet yderligere 90 minutter ved 40°C. Derefter blev reaktionsblandingen indampet vidtgående og hældt i 2 liter isvand. Der blev
- 20 ekstraheret tre gange med ether, og den organiske ekstrakt blev vasket med vand, natriumbicarbonatopløsning og igen med vand.

- Etherfasen blev efter tørring og behandling med aktivt kul indampet og gav 19,8 g (48,5%) 3,5-dimethoxybenzensulfonsyrechlorid. En prøve blev renset ved omkrystallisation af cyclohexan, smp. 74°C.
- 25

N-tert.-Butyl-3,5-dimethoxy-benzensulfonamid.

- Til en opløsning af 10,0 g (42 mmol) 3,5-dimethoxybenzensulfonsyrechlorid i 100 ml dioxan blev der ved en
- 30 temperatur på 40°C i løbet af 15 minutter dryppet en opløsning af 7,3 g (0,1 mol) tert.butylamin i 20 ml dioxan. Så snart reaktionstemperaturen begyndte at synke, blev der opvarmet 1,5 timer ved 45°C og 2 timer ved 60°C. Efter afkøling blev der filtreret, og filtratet blev indampet
- 35 i vakuum. Inddampningsresten blev omkrystalliseret af cyclohexan og gav 7,5 g (64% af det teoretiske) N-tert.-butyl-3,5-dimethoxy-benzensulfonamid, smp. 140°C (af ethanol).

$C_{12}H_{19}NO_4S$ (273,36)

Beregnet: C: 52,73 H: 7,01 N: 5,12 S: 11,73

Fundet: 53,00 6,93 5,05 11,70

2-(N-tert.-Butyl)-sulfamoyl-4,6-dimethoxy-benzoesyre.

- 5 Af en 15%'s opløsning af n-butyllithium i hexan blev 15,3 ml (25 mmol) i løbet af 10 minutter ved en temperatur på fra -10° til $-3^{\circ}C$ dryppet til en opløsning af 2,5 g (25 mmol) frisk destilleret diisopropylamin i 40 ml vandfri tetrahydrofuran. Der blev efterrørt 20 minutter
- 10 og derefter afkølet til $-70^{\circ}C$, og ved denne temperatur blev der i løbet af 40 minutter tildryppet 1,7 g (6,2 mmol) N-tert.-butyl-3,5-dimethoxy-benzensulfonamid, der var opløst i 50 ml tetrahydrofuran. Efter endt tilsætning fik reaktionsblandingen lov at opvarme til stuetempera-
- 15 tur, og der blev omrørt i yderligere 1 time.

- Derefter blev der atter afkølet til $-70^{\circ}C$, og ved denne temperatur blev en carbondioxidstrøm ledt over reaktionsblandingen. Efter endt reaktion (varmetoning) fik reaktionsblandingen under fortsat carbondioxidstrøm lov
- 20 at opvarme i stuetemperatur. Reaktionsblandingen blev inddampet i vakuum, og den faste inddampningsrest blev fordelt mellem vand og ether. Den organiske fase gav efter vask med vand og inddampning 1,1 g udgangsforbindelse, der påny blev benyttet i reaktionen. Den vandige fase
- 25 blev syrnet med saltsyre. Det dannede bundfald blev omkrystalliseret af benzen og gav 0,5 g (86% af det teoretiske, beregnet på omsat udgangsmateriale) 2-(N-tert.-butyl)-sulfamoyl-4,6-dimethoxy-benzoesyre, smp. $209^{\circ}C$ (dek.).

- 30 IR(KBr): 1730, 1710 (CO), 1320 og 1140 cm^{-1} (SO_2).

1H -NMR ($DMSO-d_6 + CD_3OD$): $\delta = 7,15$ (d, 1H, $J=1,5\text{ Hz}$) og $6,90$ (d, 1H, $J = 1,5\text{ Hz}$, 3-H og 5-H), $4,05$ (s, 3H) og $4,08$ (s, 3H, 4- OCH_3 og 6- OCH_3), $1,18$ (s, 9H, $C(CH_3)_3$).

$C_{13}H_{19}NO_6S$ (317,37)

- 35 Beregnet: C: 49,20 H: 6,04 N: 4,41 S: 10,10

Fundet: 48,96 6,07 4,35 9,95

Eksempel 4

4-Hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid.

- 2,5 g (11,8 mmol) 3-Amino-4-methoxy-1,2-benzisothiazol-1,1-dioxid blev i en opløsning af 0,47 g (11,8 mmol) natriumhydroxid i 300 ml vand opvarmet 3 timer under tilbagesvaling. Reaktionsblandingen blev filtreret varmt og syrn timer med saltsyre. Det dannede bundfald blev frafiltreret, tørret og omkrystalliseret af benzen/ethylacetat. Der vandtes 2,0 g (9,4 mmol) 4-methoxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid (smp. 224°C), der blev opløst i 500 ml ethylenchlorid, hvorefter der ved 0°C blev tilsat 10 g (40 mmol) bortribromid. Reaktionsblandingen blev opvarmet langsomt og opvarmet 1 time under tilbagesvaling. Derefter blev der koncentreret i vakuum og inddampet flere gange i vakuum under tilsætning af ethanol. Det vundne produkt blev omkrystalliseret af vand og gav 1,6 g (68% af det teoretiske) 4-hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid, smp. 228°C.

$C_7H_5NO_4S$ (199,19)

- | | | | | |
|-----------|----------|---------|---------|----------|
| Beregnet: | C: 42,20 | H: 2,53 | N: 7,03 | S: 16,10 |
| Fundet: | 41,95 | 2,50 | 7,04 | 16,08 |

Eksempel 5

4-Hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid.

- 2,5 g (11,8 mmol) 3-Amino-4-methoxy-1,2-benzisothiazol-1,1-dioxid blev analogt med Eksempel 4 omsat med natriumhydroxid og ved påfølgende syrning overført i 4-methoxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid, der derefter blev opvarmet ved 200-205°C med 20 g pyridinhydrochlorid. Reaktionsblandingen blev efter afkøling udkogt flere gange med benzen, opløst i vand, og opløsningen blev ligeledes udkogt med benzen. De samlede benzenfaser blev tørret og inddampet i vakuum. Inddampningsresten blev omkrystalliseret af vand og gav 1,35 g (57,5% af det teoretiske) 4-hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid, smp. 228°C.

33

$C_7H_5NO_4S$ (199,19)

Beregnet: C: 42,20 H: 2,53 N: 7,03 S: 16,10

Fundet: 41,90 2,45 7,18 16,30

Eksempel 6

5 4-Hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid.

2,5 g (11,8 mmol) 3-Amino-4-methoxy-1,2-benzisothiazol-1,1-dioxid blev analogt med Eksempel 5 omsat med natriumhydroxid og ved påfølgende syrning overført i 4-methoxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid. Derefter
 10 blev denne forbindelse sammen med 650 mg (10 mmol) kaliumcyanid opvarmet i dimethylsulfoxid 3 timer ved 180°C. Ved tilsætning af petroleumsether blev kaliumsaltet af produktet udfældet, og dette blev opløst i vand. Ved syrning med vandig saltsyre, frafiltrering og omkrystallisation vandtes 1,46 g (62% af det teoretiske) 4-hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid, smp. 228°C (af vand).

$C_7H_5NO_4S$ (199,19)

Beregnet: C: 42,20 H: 2,53 N: 7,03 S: 16,10

20 Fundet: 42,18 2,58 7,06 16,18

Eksempel 7

4-Hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid.

2,5 g (11,8 mmol) 3-Amino-4-methoxy-1,2-benzisothiazol-1,1-dioxid blev omsat analogt med Eksempel 6. I
 25 stedet for kaliumcyanid anvendtes kaliumbromid. Der vandtes 1,05 g (45% af det teoretiske) 4-hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid, smp. 228°C (af vand).

$C_7H_5NO_4S$ (199,19)

Beregnet: C: 42,20 H: 2,53 N: 7,03 S: 16,10

30 Fundet: 42,00 2,61 7,09 16,21

Eksempel 8

4-Hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid.

Til 8,1 g (40 mmol) 3-methoxy-2-methyl-benzensulfonamid og 5,5 g (52 mmol) vandfrit natriumcarbonat blev der
 35 sat 300 ml vand og derefter dråbevis tilsat en opløsning

- af 15,9 g (500 mmol) kaliumpermanganat i 400 ml vand ved en temperatur på 70-80°C. Derefter blev reaktionsblandingen opvarmet under tilbagesvaling indtil affarvning (ca. 1-2 timer) og filtreret i endnu varm tilstand. Filtratet
- 5 blev i vakuum inddampet til det halve volumen og syrnede med konc., vandig saltsyre. Først udkrystalliserede en lille mængde udgangsforbindelse, og efter henstand natten over kunne der filtreres fra udkrystalliseret produkt. Ved ekstraktion af den vandige moderlud med ether kunne
- 10 der isoleres en yderligere portion produkt. Efter omkrystallisation af benzen/ethylacetat vandtes 4,8 g (56% af det teoretiske) 4-methoxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid (smp. 225°C), der blev opløst i 1000 ml ethylenchlorid, hvorefter der ved -10°C blev tilsat 11,3 g (45
- 15 mmol) borttribromid. Reaktionsblandingen blev derefter omrørt 30 minutter ved stuetemperatur og opvarmet 1 time under tilbagesvaling. Derefter blev der inddampet i vakuum, inddampningsresten blev opvarmet 15 minutter med 150 ml 70%'s ethanol, og der blev inddampet flere gange i vakuum under tilsætning af ethanol. Der vandtes 3,4 g (75%
- 20 af det teoretiske) 4-hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid, smp. 228°C (af vand).

$C_7H_5NO_4S$ (199,19)

Beregnet: C: 42,20 H: 2,53 N: 7,03 S: 16,10

25 Fundet: 42,10 2,59 7,06 16,20

Udgangsforbindelsen 4-methoxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid vandtes ud fra 2-methoxy-6-nitro-toluen på følgende måde:

3-Methoxy-2-methyl-anilin.

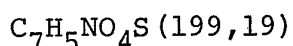
- 30 200 g (1,19 mol) 2-Methoxy-6-nitro-toluen blev i 2,5 liter ethanol hydrogenet i nærværelse af 25 g Raney-nikkel ved 100 bar, indtil der var optaget den teoretiske mængde hydrogen. Reaktionsblandingen blev filtreret og inddampet i vakuum. Den påfølgende destillation gav
- 35 158,3 g (97% af det teoretiske) 3-methoxy-2-methylanilin, kp. 126°C ved 16,25 mbar.

3-Methoxy-2-methyl-benzensulfonamid.

- 10,0 g (73 mmol) 3-Methoxy-2-methyl-anilin blev opløst i 50 ml 50%'s vandig eddikesyre, der var mættet med luftformigt hydrogenchlorid, og diazoteret med 5,5 g (80 mmol) natriumnitrit (opløst i 10 ml vand). Et ringe nitritoverskud blev fjernet med urinstof. Til diazoniumsaltopløsningen blev der yderligere sat 6 g magnesiumsulfat og derefter hældt på 60 ml svovldioxid-mættet iseddike, hvortil der forud var sat 3 g kobber(I)chlorid.
- 10 Reaktionsblandingen blev langsomt opvarmet til stuetemperatur og omrørt i 4 timer. Efter tilsætning af 500 ml vand blev råproduktet ekstraheret med methylenchlorid. De organiske faser blev vasket med vand, natriumbicarbonatopløsning og igen med vand, tørret og inddampet, og inddampningsresten blev destilleret i vakuum. Det ved et tryk på 19,5 mbar og ved et kogepunkt på 110-135°C vundne destillat (sulfonsyrechlorid) blev optaget i 50 ml ethanol, og der blev tilsat konc., vandig ammoniak. Reaktionsblandingen blev omrørt 15 minutter og inddampet i
- 15 vakuum. Inddampningsresten blev omkrystalliseret af methanol/vand, og der vandtes 4,6 g (31% af det teoretiske) 3-methoxy-2-methyl-benzensulfonamid, smp. 193°C.

Eksempel 9

- 4-Hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid.
- 25 6,6 g (30 mmol) 4-Chlor-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid, 12,3 g (90 mmol) kaliumcarbonat, 0,6 g kobberpulver og 1,5 g kobber(II)chlorid blev i 110 ml vand opvarmet 12 timer i en glasautoklav ved 150°C. Derefter blev reaktionsblandingen fortyndet med vand, opvarmet og filtreret varmt. Filtratet blev syrnede med saltsyre og ekstraheret med ether. Etherekstrakterne blev inddampet, og den vundne inddampningsrest blev omkrystalliseret af vand. Der vandtes 4,3 g (72% af det teoretiske) 4-hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid, smp.
- 30 228°C.



Beregnet: C: 42,20 H: 2,53 N: 7,03 S: 16,10

Fundet: C: 42,10 H: 2,59 N: 7,06 S: 16,20

Fremstillingen af udgangsforbindelsen 4-chlor-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid foregik ud fra 2-chlor-6-nitro-toluen ved følgende fremgangsmåde:

5 Metode A:

3-Chlor-2-methyl-anilin.

100 g (0,583 mol) 2-Chlor-6-nitro-toluen blev hydrogenet i en suspension af 10 g Raney-nikkel i 1 liter ethanol. Efter at den beregnede mængde hydrogen var optaget, blev reaktionsblandingen filtreret, og filtratet blev inddampet i vakuum.

Inddampningsresten blev destilleret i et vakuum på 14 mbar. Den ved 134-140°C overdestillerende forbindelse var 3-chlor-2-methyl-anilin. udbytte 72 g (87% af det teoretiske), kp. 140°C/14,3 mbar.

3-Chlor-2-methyl-benzensulfonsyrechlorid.

Til 30 g (0,212 mol) 3-Chlor-2-methyl-anilin blev der sat 50 ml konc., vandig saltsyre. Der blev afkølet til fra -7° til -3°C, og ved denne temperatur blev der i løbet af 1 time tildryppet en opløsning af 14,6 g (0,212 mol) natriumnitrit i 50 ml vand. Der blev omrørt endnu en time ved 0°C, derefter tilsat 20,3 g (0,1 mol) magnesiumchlorid-hexahydrat, omrørt 10 minutter, hvorefter reaktionsblandingen blev filtreret. Filtratet blev i en tynd stråle hældt i en suspension af 12 g (71 mmol) kobber(II)-chlorid i 250 ml af en 30%'s opløsning af svovldioxid i iseddike. Reaktionsblandingen opvarmede under denne tilsætning fra 20°C til 40°C under stærk luftartudvikling. Der blev omrørt i yderligere 60 minutter ved stuetemperatur og 60 minutter ved 35°C. Derefter blev der tilsat 500 g is, omrørt, indtil isen var tøet, og filtreret. Der vandtes 38,2 g (80% af det teoretiske) 3-chlor-2-methyl-benzensulfonsyrechlorid, der kunne anvendes direkte i den næste reaktion.

35 3-Chlor-2-methyl-benzensulfonamid.

38,2 g (0,17 mol) 3-Chlor-2-methyl-benzensulfonsyrechlorid blev opløst i 200 ml dioxan og opvarmet til 40°C. I løbet af 15 minutter blev der tildryppet en blanding

af 100 ml konc., vandig ammoniak og 100 ml ethanol, hvorved temperaturen af reaktionsblandingen steg til 55°C.

Derefter blev der opvarmet yderligere 2 timer ved 70°C og derefter afkølet og filtreret. (Inddampningsresten bestod af 3,3'-dichlor-2,2'-dimethyl-diphenyldisulfid.) Filtratet blev indampet i vakuum, og der blev tilsat isvand. Bundfaldet blev frasuget og vasket med isvand og gav efter omkrystallisation af ethanol/vand 24 g (69% af det teoretiske) 3-chlor-2-methyl-benzensulfonamid, smp. 179°C.

$C_7H_8ClNO_2S$ (205,67)

Beregnet: C: 40,88 H: 3,92 Cl: 17,24 N: 6,81 S: 15,59

Fundet: 40,90 3,85 17,33 6,71 15,63

Ved syrning med konc., vandig saltsyre vandtes fra filtratet 3-chlor-2-methyl-benzensulfinsyre, smp. 112°C, udbytte 7,0 g svarende til 22% af det teoretiske. Denne sulfinsyre kunne med kobber(II)chlorid i myresyre omdannes til 3-chlor-2-methyl-benzensulfonsyrechlorid i et udbytte på 88% (40°C, 1 time, oparbejdning ved tilsætning af konc., vandig saltsyre og is) og således ligeledes til 3-chlor-2-methyl-benzensulfonamid. Det totale udbytte steg herved til 85% af det teoretiske.

4-Chlor-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid.

16,4 g (80 mmol) 3-Chlor-2-methyl-benzensulfonamid blev sammen med 14 g (100 mmol) kaliumcarbonat og 33,2 g (210 mmol) kaliumpermanganat opvarmet i 350 ml vand 1 time under tilbagesvaling. Reaktionsblandingen blev filteret varmt, og filterresten blev vasket med varmt vand. De samlede filtrater blev syrnet med konc., vandig saltsyre og afkølet. Krystalliseret blev frasuget, vasket med vand og tørret og gav 12,6 g (72,5% af det teoretiske) 4-chlor-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid, smp. 210°C (af vand).

IR(KBr): 3420 (NH), 1730 (CO), 1330 og 1180 cm^{-1} (SO_2).

$C_7H_4ClNO_3S$ (217,64)

Beregnet: C: 38,63 H: 1,85 Cl: 16,29 N: 6,44 S: 14,74

Fundet: 38,70 1,80 15,90 6,70 14,85

Metode B:

2-Chlor-6-nitro-benzoesyre.

En blanding af 77,7 g (0,453 mol) 2-chlor-6-nitro-toluen, 190 g (1,2 mol) kaliumpermanganat, 500 ml 1N kaliumhydroxidopløsning og 4 liter vand blev opvarmet 8,5 timer ved 100°C. Efter henstand natten over blev der tilsat 25 g (0,16 mol) kaliumpermanganat, og reaktionsblandingen blev opvarmet i yderligere 2,5 timer ved 100°C. Derefter blev det ikke-omsatte udgangsmateriale afdestilleret med vanddamp. Den som inddampningsrest vundne reaktionsopløsning blev filtreret, filterresten blev vasket med varmt vand, og filtratet blev inddampet til ca. 750 ml. Efter syrning med saltsyre vandtes et bundfald, der blev frafiltreret og tørret. Der vandtes 45,9 g (50% af det teoretiske) 2-chlor-6-nitro-benzoesyre, smp. 166°C (af ethylenchlorid).

2-Chlor-6-nitro-benzoesyrechlorid.

Til en suspension af 20,1 g (0,1 mol) 2-chlor-6-nitro-benzoesyre i 150 ml vandfri benzen blev der sat 1 ml dimethylformamid og 17,9 g (0,15 mol) thionylchlorid. Efter 30 minutters omrøring blev der opvarmet til tilbagesvalingstemperatur, og efter 3 timer blev der tilsat yderligere 17,9 g (0,15 mol) thionylchlorid. Efter yderligere 3 timers kogning under tilbagesvaling blev der efter afkøling filtreret, og filtratet blev inddampet i vakuum. Der vandtes 18,9 g (85,9% af det teoretiske) 2-chlor-6-nitro-benzoesyrechlorid som olie.

2-Chlor-6-nitro-benzoesyremethylester.

I løbet af 10 minutter blev der tildryppet 18,9 g (86 mmol) 2-chlor-6-nitro-benzoesyrechlorid i 100 ml methanol. Efter 4 timers opvarmning under tilbagesvaling blev der inddampet i vakuum. Inddampningsresten blev behandlet med lidt iskold methanol og frafiltreret. Der vandtes 12,3 g (66% af det teoretiske) 2-chlor-6-nitro-benzoesyremethylester, smp. 98°C (af cyclohexan).

6-Chlor-anthranilsyremethylester.

4,5 g (0,0212 mol) 6-Chlor-2-nitro-benzoesyremethylester blev i 1,8 liter methanol hydrogenet med Raney-

nikkel, indtil der var optaget den beregnede mængde hydrogen. Den filtrerede reaktionsblanding blev inddampet i vakuum, og inddampningsresten blev destilleret i vakuum. Der vandtes 34,6 g (88% af det teoretiske) 6-chlor-an-

5 thranilsyremethylester, kp. 158°C ved 14,3 mbar.

6-Chlor-2-chlorsulfonyl-benzoesyremethylester.

34,6 g (0,186 mol) 6-Chloranthranilsyremethylester blev under afkøling indført i 70 ml konc., vandig saltsyre under omrøring og ved en temperatur på fra 0° til +10°C

10 diazoteret med en opløsning af 12,8 g (0,186 mol) natriumnitrit i 30 ml vand. Reaktionsblandingen blev omrørt 45 minutter ved 0°C og derefter hældt i en omrørt suspension af 2 g kobber(I)chlorid og 17 g kobber(II)chlorid i 160 ml af en 30%'s opløsning af svovldioxid i iseddike. Efter

15 endt nitrogenudvikling blev der omrørt endnu 2 timer ved stuetemperatur. Der blev ekstraheret med ether, og de organiske ekstrakter blev vasket, tørret og inddampet. Der vandtes 38,2 g (76% af det teoretiske) 6-chlor-2-chlor-sulfonyl-benzoesyremethylester.

20 4-Chlor-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid.

Til en opløsning af 38,2 g (0,141 mol) 6-chlor-2-chlorsulfonyl-benzoesyremethylester i 150 ml dioxan blev der i løbet af 20 minutter ved en temperatur på 30° til 50°C dryppet 150 ml ammoniak-mættet ethanol. Derefter

25 blev der opvarmet 2 timer ved 40°C og yderligere 2 timer ved 60°C. Efter afkøling blev der inddampet, behandlet med ether og filtreret. Filterresten blev kogt med vand. Der blev filtreret varmt, og filtratet blev syrnede med saltsyre. Der vandtes 19,8 g (64,5% af det teoretiske)

30 4-chlor-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid, smp. 210°C.

$C_7H_4ClNO_3S$ (217,64)

Beregnet: C: 38,63 H: 1,85 Cl: 16,29 N: 6,44 S: 14,73

Fundet: 38,65 1,98 16,20 6,41 14,75

Eksempel 10

35 4-Hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid.

I 50 g polyphosphorsyre opvarmet til 60°C blev der i løbet af 5 minutter indført 3,4 g (12 mmol) 2-(N-tert.-

butyl)-sulfamoyl-6-methoxybenzoesyre. Derefter blev der opvarmet yderligere 20 minutter ved 70°C, og til den endnu varme reaktionsblanding blev der sat is. Det dannede bundfald blev frafiltreret og omkrystalliseret af vand
 5 (1,6 g, smp. 224°C, $C_8H_7NO_4S$: 4-Methoxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid).

Krystalliseret blev omsat med 24 ml (25 mmol) bortribromid i 400 ml ethylenchlorid en time ved stuetemperatur og 2 timer ved tilbagesvalingstemperatur. Derefter
 10 blev reaktionsblandingen inddampet, og til inddampningsresten blev flere gange sat methanol og inddampet. Inddampningsresten blev omkrystalliseret af isopropanol, og der vandtes 1,4 g (58% af det teoretiske) 4-hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid, smp. 224°C.

15 $C_7H_5NO_4S$ (199,19)

Beregnet: C: 42,20 H: 2,53 N: 7,09 S: 16,10

Fundet: 42,16 2,57 6,99 16,01

Fremstillingen af udgangsforbindelsen 2-(N-tert.-butyl)-sulfamoyl-6-methoxy-benzoesyre foregik på følgende måde ud fra m-anisidin.
 20

3-Methoxy-benzensulfonsyrechlorid.

61,6 g (0,5 mol) m-Anisidin blev opløst i 50 ml iseddike, og der blev dråbevis tilsat 110 ml konc., vandig saltsyre. Blandingen blev afkølet til 0°C og diazoteret
 25 med en opløsning af 38 g (0,551 mol) natriumnitrit i 75 ml vand. Denne blanding blev omrørt yderligere 10-15 minutter og langsomt hældt i en blanding af 24 g (0,14 mol) kobber(II)chlorid og 5 g kobber(I)chlorid i 300 ml af en 30%'s opløsning af svovldioxid i iseddike og 450 ml benz-
 30 en, hvorved der blev observeret en stærk luftartudvikling og en temperaturstigning til 40°C. Såsnart reaktionstemperaturen faldt, blev der opvarmet endnu 1 time ved 40°C. Efter afkøling blev der fortyndet med 2,5 liter isvand, og efter filtrering blev den organiske fase fraskilt.
 35 Denne blev vasket med vand og natriumbicarbonatopløsning og inddampet. Der vandtes 84,5 g (82% af det teoretiske) 3-methoxy-benzensulfonsyrechlorid.

N-tert.-Butyl-3-methoxy-benzensulfonamid.

49,5 g (0,24 mol) 3-Methoxy-benzensulfonsyrechlorid blev opløst i 50 ml tetrahydrofuran og i løbet af 25 minutter dryppet til en opløsning af 40 g (0,55 mol) tert.-butylamin i 200 ml tetrahydrofuran. Der blev omrørt 1 time ved stuetemperatur og 7 timer ved 60°C. Reaktionsblandingen blev filtreret, og filtratet blev inddampet i vakuum. Inddampningsresten blev behandlet med cyclohexan og gav 54,1 g (92,6% af det teoretiske) N-tert.-butyl-3-methoxy-benzensulfonamid, smp. 100°C.

2-(N-tert.-Butyl)-sulfamoyl-6-methoxy-benzoesyre.

Til en opløsning af 3,3 g (14 mmol) N-tert.-butyl-3-methoxy-benzensulfonamid i 70 ml vandfri tetrahydrofuran blev der under nitrogen ved en temperatur på fra -60° til -50°C i løbet af 15 minutter dråbevis sat 19 ml af en 15%'s opløsning af n-butyllithium i hexan (31 mmol). Derefter blev reaktionsblandingen omrørt 1 time ved 0°C, og efter fornyet afkøling til fra -70° til -50°C blev der overledt en carbondioxidstrøm. Carbondioxidbehandlingen blev efter endt eksoterm reaktion videreført endnu 1 time ved stuetemperatur. Derefter blev reaktionsblandingen indampet i vakuum, og indampningsresten blev fordelt mellem isvand og ether. Det vandige lag blev vasket med ether og syrnet med saltsyre. Bundfaldet blev frafiltret og gav 3,5 g (87% af det teoretiske) 2-(N-tert.-butyl)-sulfamoyl-6-methoxy-benzoesyre.

Eksempel 11

4-Hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid.

Til en opløsning af 1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid-4-diazoniumchlorid, der blev fremstillet ved diazotering af 1,98 g (10 mmol) 4-amino-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid med natriumnitrit i fortyndet saltsyre, blev der sat 150 ml 10%'s vandig svovlsyre, og der blev opvarmet på vandbad indtil endt nitrogenudvikling. Efter afkøling blev der igen syrnet kraftigt med konc., vandig saltsyre og ekstraheret med ether. Den organiske fase blev inddampet, indampningsresten blev opløst i

lidt fortyndet natriumhydroxidopløsning, og efter filtrering blev der påny syret med saltsyre. De udskilte krystaller blev omkrystalliseret af vand og gav 98 g (40% af det teoretiske) 4-hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid, smp. 228°C.



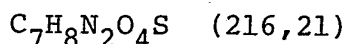
Beregnet: C: 42,20 H: 2,53 N: 7,03 S: 16,10

Fundet: 42,14 2,57 7,09 15,98

Udgangsforbindelsen 1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid blev fremstillet på følgende måde:

2-Methyl-3-nitro-benzensulfonamid.

7,5 g (49 mmol) 2-Amino-6-nitro-toluen blev opløst i en blanding af 27,5 g konc. svovlsyre og 250 ml vand og diazoteret med en opløsning af 3,75 g (54 mmol) natriumnitrit i 7,5 ml vand ved en temperatur på 0-5°C. Efter 2 timer blev reaktionsblandingen portionsvis indført i en forud fremstillet blanding af 90 ml af en 30% svovldioxidopløsning i iseddike og en opløsning af 1,5 g kobber(II)chlorid i 4 ml vand. Temperaturen under indføringen var 20°C, og den videre behandling og omsætning med ammoniak foregik analogt med beskrivelsen for 3-methoxy-2-methyl-benzensulfonamidet (Eksempel 8). Der vandtes 8,2 g (77% af det teoretiske) 2-methyl-3-nitro-benzensulfonamid.



Beregnet: C: 38,89 H: 3,73 N: 12,95 S: 14,83

Fundet: 38,67 3,79 12,72 14,81

4-Nitro-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid.

8,0 g (37 mmol) 2-Methyl-3-nitro-benzensulfonamid blev oxideret med kaliumpermanganat i vand analogt med Eksempel 8. Efter etherekstraktionen vandtes ved inddampning og omkrystallisation af vand 3,8 g (45% af det teoretiske) af nitroforbindelsen, smp. 239°C.

4-Amino-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid.

3,0 g (13 mmol) 4-Nitro-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid blev opløst i 100 ml ethanol og hydrogeneret over hydrogen under anvendelse af en palladium/dyrekulkatalysator. Efter filtrering, inddampning og omkrystallisation af ethanol vandtes 2,3 g (89,5% af det teoreti-

ske) af aminoforbindelsen, smp. 244-245°C.

$C_7H_6N_2O_3S$ (198,19)

Beregnet: C: 42,42 H: 3,05 N: 14,13 S: 16,18

Fundet: 42,31 3,12 14,01 16,18

5 1,2-Benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid-4-diazoniumchlorid.

1,98 g (10 mmol) 4-Amino-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid blev opløst i vand under tilsætning af natriumcarbonat og fældet med konc., vandig saltsyre. Til denne suspension blev der ved 0-5°C tildryppet en opløsning af 700 mg natriumnitrit i 3 ml vand og omrørt 2 timer ved 5°C. Den på denne måde vundne diazoniumsaltopløsning blev anvendt direkte til den videre omsætning uden isolering af diazoniumsaltet.

Forbindelserne med formlen I eller deres salte kan på sædvanlig måde indarbejdes i præparatformer, såsom tabletter, pulvere eller opløsninger.

Dette er illustreret i de følgende eksempler.

Eksempel I

Sødestofopløsning indeholdende 50 mg natriumsalt af 4-hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid i 1 ml opløsning.

I 100 ml destilleret vand blev der ved 60°C succesivt opløst de følgende stoffer under omrøring:

0,1 g Sorbinsyre
1,2 g Citronsyre
1,5 g Dinatriumphosphat
5,0 g Natriumsalt af sødestoffet.

Heraf indeholdt 1 ml (svarende til ca. 25 dråber)

50 mg af ovennævnte sødestof, hvilket svarer til en sødestyrke som ca. 3 stykker hugget sukker.

Eksempel II

Tabletter til sødning indeholdende 20 mg 4-hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid.

Sammensætning af en tablet:

5	Sødestof	20 mg
	Natriumbicarbonat	5 mg
	Sorbit, pulv.	25 mg

Sødestoffet blev blandet med natriumbicarbonat og sorbit og ved en relativ luftfugtighed på maksimalt 60%
10 presset til tabletter.

1 Tablet svarede til en sødestyrke som ca. ét stykke hugget sukker.

Eksempel III

Tabletter til sødning indeholdende 20 mg natriumsalt af
15 4-hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid.

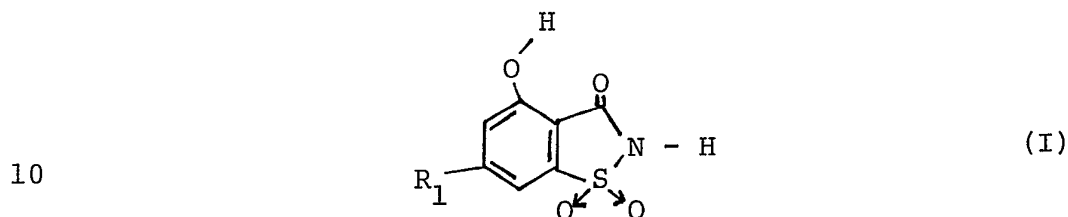
Sammensætning af 1 tablet:

Natriumsalt af sødestoffet	20 mg
Sorbit	30 mg

Sødestoffet blev blandet godt med sorbit og presset
20 til tabletter. 1 Tablet svarede til en sødestyrke som ca. ét stykke hugget sukker.

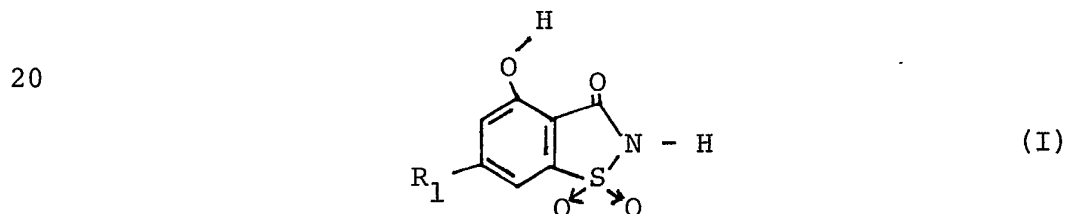
P A T E N T K R A V

1. 4-Hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxi-
 5 der, k e n d e t e g n e t ved, at de har den almene for-
 mel I:



hvor R_1 er et hydrogenatom eller en hydroxygruppe, og fy-
 siologisk uskadelige salte deraf med uorganiske eller or-
 15 ganiske baser.

2. Søddestofkomposition, k e n d e t e g n e t ved,
 at den indeholder én eller flere forbindelser med den al-
 mene formel I:



25 hvor R_1 har den i krav 1 anførte betydning, eller fysio-
 logisk uskadelige salte deraf med uorganiske eller orga-
 niske baser samt sædvanlige bære- og/eller hjælpestoffer.

3. Søddestofkomposition, k e n d e t e g n e t ved,
 at den indeholder natrium- eller calciumsaltet af 4-hydro-
 30 xy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid.

4. Søddestofkomposition, k e n d e t e g n e t ved,
 at den indeholder natrium- eller calciumsaltet af 4,6-di-
 hydroxy-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid.

35 Fremdragne publikationer:

US patent nr. 4057555

C.A. bind 32 (1938), s.3761-3762, C.Finzi et al: Chemical
 constitution with sweet taste

Kirk-Othmer: Encyclopedia of Chemical Technology, bind 13
 (1954), New York, s.559-564.