

INFLUENCE DU pH SUR LA FIXATION TISSULAIRE DE L'AMPHETAMINE ^3H ET DE L'EPHEDRINE ^{14}C

ETUDE *IN VITRO*

CHRISTIAN JACQUOT, JEAN BRALET, YVES COHEN et GUILLAUME VALETTE

Laboratoire de Pharmacodynamie, Faculté de Pharmacie, Paris, I.N.S.E.R.M. et C.N.R.S.

(Received 17 May 1969; accepted 30 May 1969)

Abstract—The uptake in tissue of amphetamine ^3H and ephedrine ^{14}C has been investigated *in vitro* in suspensions of spleen slices and perfused rat hearts. The extent of uptake (expressed by the ratio T/M : amine tissue concentration/amine medium concentration) was directly pH dependent, the pH values of the incubation or perfusion medium varied between 6.50 to 8.40. For both amphetamine and ephedrine, a pH rise of 1 unit led to an increase of the T/M ratio of 2.5 for the spleen and of 2.7 for the heart. With a same pH value, the T/M ratio was 1.4 times higher for amphetamine than for ephedrine in heart and spleen. When the pH of the medium containing ephedrine exceeded the pH of the medium containing amphetamine, by 0.35 unit, the T/M ratios were identical for the two amines. As this pH difference of 0.35 unit approximately corresponds to the pK_a difference between the two amines, it is concluded that the affinity of tissue/wt. amphetamine and ephedrine are equivalent when they are ionized to the same extent.

LES RÉSULTATS des différents travaux consacrés à l'étude de la fixation de l'amphétamine ^3H , par des coupes de tissus^{1, 2} ou par le coeur isolé³ et de l'éphédrine ^{14}C par le coeur isolé⁴ indiquent que le mécanisme de fixation de ces deux amines est différent de celui de la noradrénaline. Leurs taux d'accumulation dans les tissus sont directement proportionnels à leurs concentrations dans les liquides d'incubation ou de perfusion et ne sont pas affectés par la présence de substances connues pour inhiber la fixation de la noradrénaline: Ainsi la cocaïne, la desméthyl-imipramine, l'ouabaïne n'inhibent pas la fixation de l'amphétamine,^{1, 3} de même l'accumulation de l'éphédrine^{4, 5} n'est pas entravée en présence de cocaïne, de guanéthidine, de nor-métabadrénaline, de tyramine, ni d'amphétamine.

Bien qu'inhibant^{6, 7} le transport actif de la noradrénaline au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques, l'amphétamine et l'éphédrine paraissent se fixer dans les tissus d'une manière passive. Dans ces conditions, il est à présumer que leur taux d'ionisation puisse influencer sur leur accumulation tissulaire: l'importance de l'ionisation pour une amine étant fonction de la valeur de son pK_a et de celle du pH du milieu, il nous a paru intéressant d'étudier de manière comparative l'influence du pH sur la fixation tissulaire de l'amphétamine, d'une part et de l'éphédrine d'autre part, ces amines différant entre elles précisément par la valeur de leur pK_a . Notre étude a été réalisée *in vitro*, d'une part sur des coupes de rate, d'autre part sur le coeur isolé perfusé de Rat. Le choix de la rate été dicté par le fait que cet organe fixe des quantités élevées d'éphédrine chez le Rat *in vivo*.⁸

METHODES

Substances radioactives. Nous avons utilisé du chlorhydrate de *dl* éphédrine ^{14}C (C.E.N. SACLAY, activité spécifique 16 mCi/mM) et du sulfate de *d* amphétamine ^3H (New England Nuclear Corporation, activité spécifique 8.9 Ci/mM).

Liquides physiologiques. Les incubations des coupes de rate et les perfusions des coeurs ont été réalisées avec deux liquides physiologiques différents, le choix de l'un ou l'autre de ces liquides étant subordonné au pH fixé dans chaque expérience.

Pour des valeurs de pH comprises entre 6.50 et 7.50, nous avons utilisé un liquide phosphaté glucosé préconisé par McIlwain⁹ de composition suivante : NaCl 134 mM; KCl 5.4 mM; KH_2PO_4 , MgSO_4 et CaCl_2 1.34 mM; glucose 13 mM, Na_2HPO_4 10.4 mM; eau bidistillée q.s. pour 1 litre.

Pour des valeurs de pH comprises entre 7.50 et 8.50, nous avons utilisé du liquide de Krebs-Henseleit, de composition suivante: NaCl 94.8 mM; KCl 4.75 mM; KH_2PO_4 et MgSO_4 1.20 mM; CaCl_2 2.54 mM; NaHCO_3 25 mM; glucose 11.5 mM; eau bidistillée q.s. pour 1 litre.

Les deux liquides sont oxygénés et leur pH est ajusté à la valeur désirée par addition de HCl N ou de NaOH N.

Incubation des coupes de rate. La rate est prélevée chez des Rats mâles Charles River, d'un poids moyen de 250 g et débitée en coupes longitudinales d'un poids moyen de 60 mg. Chaque coupe est placée dans 4 ml de liquide physiologique contenus dans une fiole maintenue à 37°, sous agitation constante dans un incubateur de tissus. Après 15 min, chaque coupe est transférée dans une autre fiole placée dans l'incubateur et contenant 4 ml du même liquide renfermant, soit de l'éphédrine ^{14}C , soit de l'amphétamine ^3H . La concentration du liquide en *dl* éphédrine ^{14}C est de 0.5 μg , soit 0.05 $\mu\text{Ci/ml}$. La *d* amphétamine ^3H est diluée avec de la *d* amphétamine non radioactive de manière à obtenir une concentration finale de 0.5 μg d'amphétamine/ml de liquide d'incubation correspondant à une concentration radioactive en amphétamine ^3H de 0.05 $\mu\text{Ci/ml}$.

La durée d'incubation en présence de l'amine radioactive varie de 10 à 70 min. Le pH du liquide d'incubation est contrôlé à la fin de chaque expérience, des variations de pH étant parfois observées particulièrement au cours des expériences de longue durée: dans ce cas, c'est la valeur du pH à la fin de l'expérience qui est retenue.

Les coupes sont essorées sur du papier filtre, pesées, broyées à l'Ultra-Turrax dans 3 ml de HClO_4 0.4 N et l'homogénat est centrifugé. 0.5 ml du liquide d'incubation et des extraits perchloriques sont ajoutés à 6 ml d'éthanol et à 12 ml de liquide scintillant (PPO 4 g, diméthyl-POPOP 0.1 g, toluène q.s. pour 1 litre) et la radioactivité est mesurée au moyen d'un scintillateur liquide Tri-Carb. 3380.

La présence éventuelle de métabolites acides ou phénoliques de l'amphétamine ou de l'éphédrine⁸ a été recherchée par extraction au benzène en milieu alcalin: 1 ml de l'extrait perchlorique est additionné de 0.2 ml de NaOH 10 N et extrait pendant 10 min par 3 ml de benzène. Dans ces conditions, l'amphétamine et l'éphédrine sont extraites, alors que les dérivés phénoliques ou acides restent dans la phase aqueuse. La radioactivité benzénique est évaluée par addition de 2 ml de benzène à 12 ml de liquide scintillant. Nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de métabolites et la radioactivité retrouvée dans les homogénats tissulaires a été attribuée à l'éphédrine ^{14}C ou à l'amphétamine ^3H .

Perfusion des coeurs. Des Rats mâles Charles River, d'un poids moyen de 250 g

sont anesthésiés à l'éther et héparinés (2000 unités par voie intra-veineuse). Les coeurs sont perfusés selon la méthode de Langendorff: la température du liquide de perfusion est de $38 \pm 0.5^\circ$, la pression de perfusion de 67 cm d'eau et le débit de 6 à 8 ml/min. L'appareil de perfusion comprend deux flacons reliés par un robinet à 3 voies et contenant le liquide physiologique additionné dans l'un des flacons d'amphétamine ^3H ou d'éphédrine ^{14}C à la concentration de $0.1 \mu\text{g/ml}$, correspondant à une concentration radioactive de $0.01 \mu\text{Ci/ml}$. Les coeurs sont perfusés tout d'abord par le liquide physiologique seul puis, après 5 min, par le liquide physiologique renfermant l'amine radioactive, pendant un temps variant de 1 à 20 min. Le pH du liquide de perfusion est contrôlé à la sortie des coeurs. A la fin de l'expérience, le coeur est divisé, essuyé sur du papier filtre, pesé, homogénéisé dans 5 ml d' HClO_4 0.4 N. Les techniques de mesure de la radioactivité et d'identification des molécules marquées sont identiques à celles qui ont été utilisées pour les coupes de rate.

Détermination des coefficients de partage heptane/eau

Nous avons déterminé les coefficients de partage de l'éphédrine et de l'amphétamine entre l'heptane et un tampon aqueux phosphate de sodium 0.2 M, à différentes valeurs de pH (7-7.5-8 et 10); 5 ml de tampon phosphate amené au pH désiré et contenant de l'éphédrine ^{14}C ou de l'amphétamine ^3H à la concentration de $0.1 \mu\text{g/ml}$ sont extraits pendant 15 min par 5 ml d'heptane (Carlo Erba R S). La radioactivité de la phase organique est déterminée par addition de 4 ml d'heptane à 12 ml de liquide scintillant et celle de la phase aqueuse par addition de 0.5 ml de tampon phosphate à 6 ml d'éthanol et 12 ml de liquide scintillant. Les coefficients de partage sont définis par le rapport de la radioactivité présente dans 1 ml d'heptane à celle présente dans 1 ml de tampon phosphate.

Expression des résultats. Le taux d'amine radioactive fixée par la rate ou le coeur est exprimé par le rapport T/M, rapport de la concentration de l'amine dans 1 g de tissu (T) à sa concentration dans 1 ml de milieu (M) d'incubation ou de perfusion. Il n'a pas été effectué de correction pour l'espace extracellulaire. Les valeurs moyennes sont affectées des erreurs moyennes Sm. Les mesures de pH ont été effectuées à la température de 20° .

RESULTATS

1. Cinétique de la fixation tissulaire de l'amphétamine ^3H et de l'éphédrine ^{14}C

La fixation tissulaire de l'amphétamine ^3H et de l'éphédrine ^{14}C a été étudiée au cours du temps, d'une part, sur des coupes de rate, d'autre part, sur le coeur isolé perfusé.

(A) *Coupes de rate.* Les coupes de rate sont incubées pendant 10, 20, 30, 40, 60 ou 70 min en présence d'amphétamine ou d'éphédrine, chacune de ces deux amines étant présente dans le liquide d'incubation à la concentration de $0.5 \mu\text{g/ml}$. Le pH du liquide est de 8.40. La Fig. 1 montre les résultats obtenus. La fixation est initialement rapide, puis diminue pour atteindre un plateau au bout du temps 60 min. A chaque instant, la fixation tissulaire de l'amphétamine excède celle de l'éphédrine. Les valeurs moyennes des rapports T/M aux temps 20, 40, 60 et 70 min sont respectivement de 10.9-14.6-15.5 et 15.4 pour l'amphétamine et de 7.6-11.3-13.0 et 13.2 pour l'éphédrine.

(B) *Coeur isolé.* La fixation a été étudiée aux temps 1, 5, 10 et 20 min (Fig. 2). La concentration du liquide de perfusion en amphétamine ou éphédrine est de 0.1

$\mu\text{g/ml}$ et le pH de 7.70. La fixation est, à chaque instant, plus importante pour l'amphétamine que pour l'éphédrine et, dans les deux cas, elle est déjà maximale au bout de 10 min. La valeur moyenne des rapports T/M aux temps 1, 5, 10 et 20 min sont respectivement de 2.62-3.08-3.74 et 3.78 pour l'amphétamine et de 1.95-2.57-2.78 et 2.69 pour l'éphédrine.

II. Influence du pH sur la fixation tissulaire.

(A) *Coupes de rate*. Les taux de fixation tissulaire de l'amphétamine et de l'éphédrine, toujours à la concentration de $0.5 \mu\text{g/ml}$, ont été déterminés après 30 min d'incubation et à des pH variant de 6.50 à 8.40.

Les courbes obtenues en coordonnées semi-logarithmiques (Fig. 3) avec l'amphétamine et l'éphédrine sont deux droites parallèles. Lorsque le pH passe de 6.50 à 8.40, les valeurs des rapports T/M passent de 2.14 à 13.3 dans le cas de l'amphétamine et de 1.55 à 9.18 dans le cas de l'éphédrine.

La pente des droites est telle que, dans les 2 cas, une variation de pH de 1 unité entraîne une augmentation de la fixation tissulaire d'un facteur égal en moyenne à 2.5.

La distance entre les deux droites indique que, pour un même pH, la fixation tissulaire de l'amphétamine est environ 1.4 fois plus élevée que celle de l'éphédrine. Lorsque le pH du milieu contenant l'éphédrine excède de 0.35 unité le pH du milieu

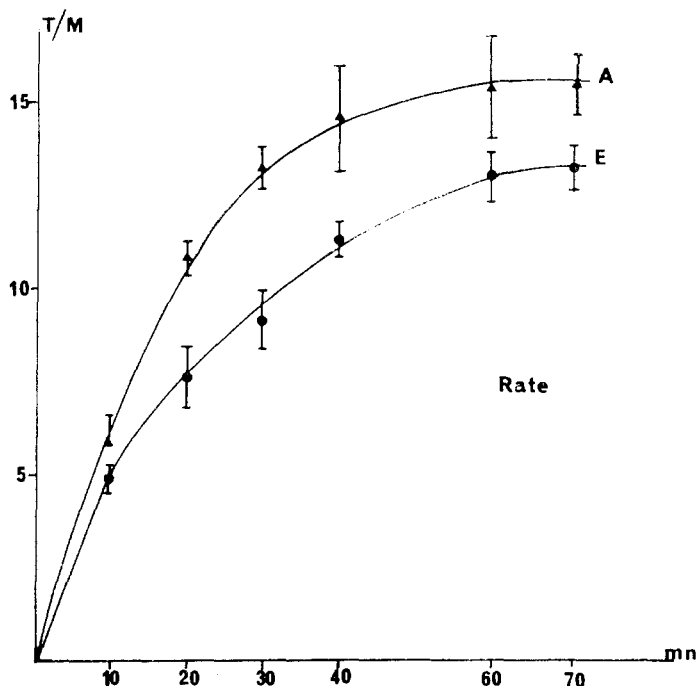


FIG. 1. Cinétique de la fixation de l'amphétamine ^3H (A▲) et de l'éphédrine ^{14}C (E●) par des coupes de rate incubées à 37° . La concentration de chacune des amines, dans le liquide d'incubation, est de $0.5 \mu\text{g/ml}$ et le pH de 8.40. L'intensité de la fixation tissulaire est exprimée par le rapport T/M, rapport de la concentration de l'amine dans 1 g de tissu à sa concentration dans 1 ml de liquide d'incubation. Chaque point est la moyenne d'au moins quatre expériences.

contenant l'amphétamine, les rapports T/M sont égaux pour l'éphédrine et l'amphétamine. Ceci ressort de la Fig. 3 où l'on peut voir que le rapport T/M de l'amphétamine à pH 7 est identique à celui de l'éphédrine à pH 7.35.

(B) *Coeur isolé*. Les coeurs sont perfusés pendant 10 minutes par des liquides de différents pH contenant de l'amphétamine ou de l'éphédrine à la concentration de $0.1 \mu\text{g/ml}$ (Fig. 4). Dans le cas de l'amphétamine, les valeurs extrêmes de pH des liquides de perfusion (mesurés à la sortie du coeur) ont été de 6.44 et 7.96, ce qui conduit respectivement à des valeurs T/M égales à 1.07 et 5.13.

Pour l'éphédrine, lorsque le pH passe de 6.42 à 8.21, les rapports T/M passent de 0.78 à 4.79.

Ici encore, les valeurs expérimentales s'alignent sur deux droites parallèles. La pente des droites est sensiblement identique à celle qui a été obtenue avec les coupes de rate: une augmentation de 1 unité pH entraîne, pour les deux amines, une augmentation de la fixation tissulaire d'un facteur égal à 2.7. La distance entre les deux

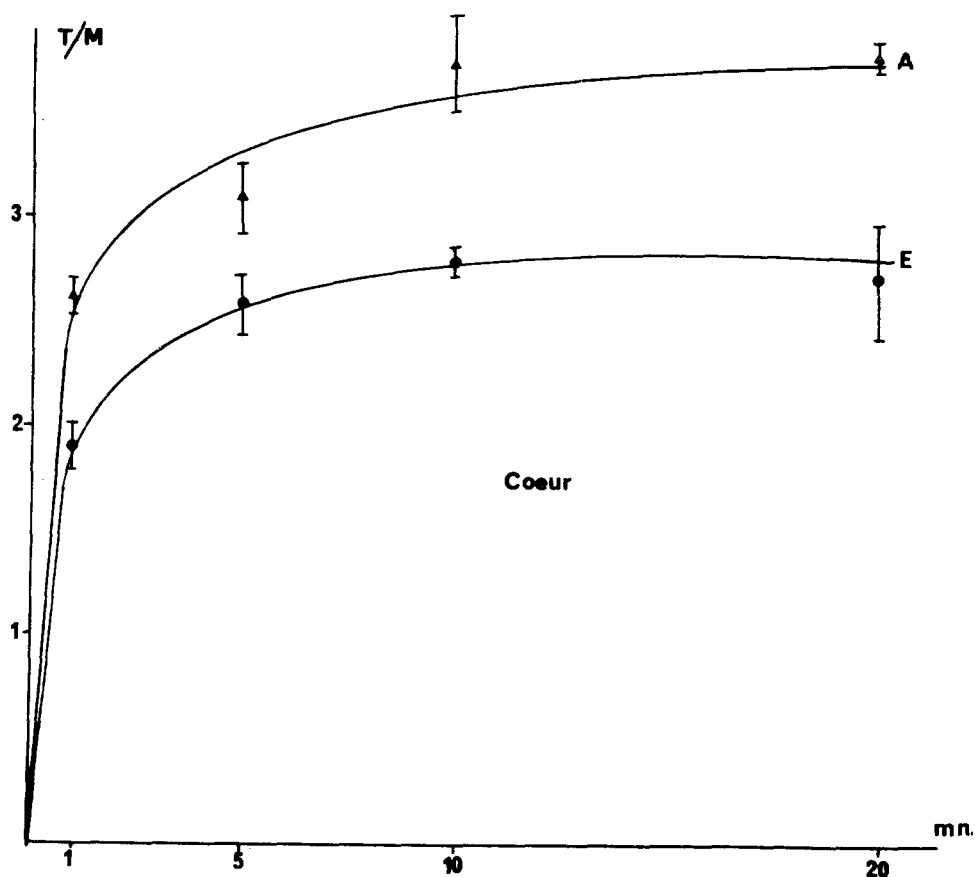


FIG. 2. Cinétique de la fixation de l'amphétamine ^3H (A▲) et de l'éphédrine ^{14}C (E●) par le coeur isolé perfusé. La concentration de chacune des amines dans le liquide de perfusion est de $0.1 \mu\text{g/ml}$ et le pH de 7.70. Chaque point est la moyenne de cinq expériences.

droites est telle que pour un même pH, la fixation tissulaire de l'amphétamine est environ 1.4 fois plus élevée que celle de l'éphédrine. De même que pour les coupes de rate, une élévation de 0.35 unité pH du liquide renfermant l'éphédrine amène une égalité des rapports T/M pour l'éphédrine et l'amphétamine.

III. Coefficients de partage heptane/eau.

La Fig. 5 illustre les variations des coefficients de partage de l'amphétamine et de l'éphédrine entre l'heptane et un tampon aqueux phosphate de sodium à pH 7–7.50–8 et 10. Le passage des deux amines dans l'heptane augmente avec le pH, la solubilité de l'amphétamine pour ce solvant étant toujours supérieure à celle de l'éphédrine.

Aux pH 7, 8 et 10, les valeurs des coefficients de partage sont respectivement de 0.0042–0.020 et 0.23 pour l'amphétamine et de 0.0024–0.0088 et 0.092 pour l'éphédrine.

DISCUSSION

Les résultats qui viennent d'être décrits indiquent que l'accumulation de l'amphétamine et de l'éphédrine par la rate et le coeur est fonction de la valeur du pH du milieu de perfusion ou d'incubation: l'élévation du pH entraîne une augmentation de la quantité d'amine fixée. Bien que l'accumulation de l'amphétamine et de l'éphédrine soit plus importante, en valeur absolue, dans la rate que dans le coeur, les variations

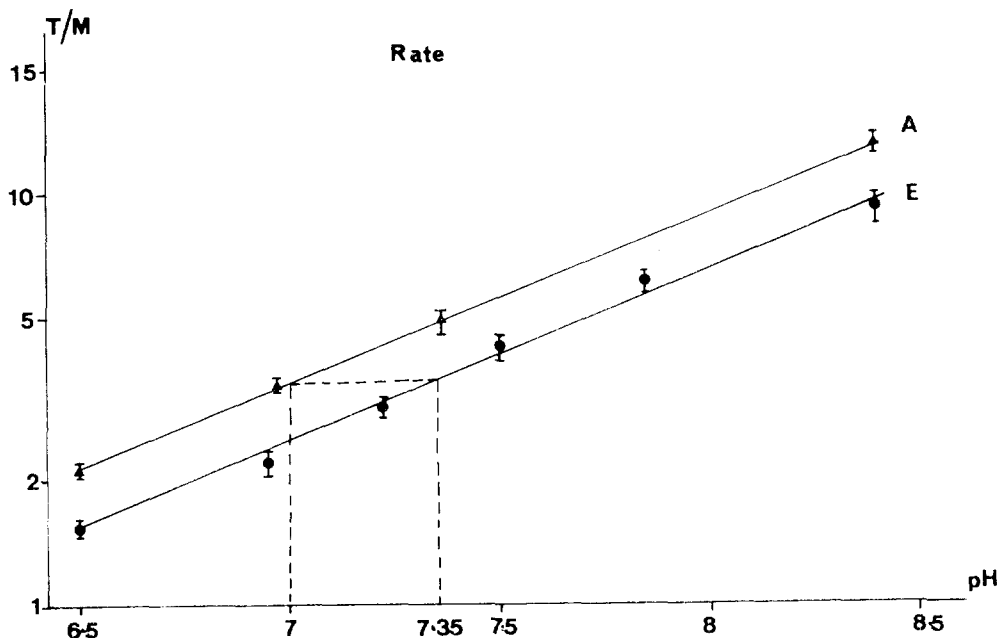


FIG. 3. Influence du pH du liquide d'incubation sur la fixation par des coupes de rate de l'amphétamine ^3H (A▲) et de l'éphédrine ^{14}C (E●). La concentration de chacune des amines dans le liquide d'incubation est de $0.5 \mu\text{g/ml}$. Chaque point est la moyenne d'au moins quatre expériences. On peut voir que, pour une différence de 0.35 unité pH, les rapports T/M sont pratiquement identiques pour l'amphétamine et l'éphédrine.

de pH conduisent pratiquement aux mêmes variations dans les taux de fixation: une augmentation de pH de 1 unité entraîne un accroissement du rapport T/M de 2·5 pour la rate et de 2·7 pour le coeur.

Si l'on compare les courbes obtenues avec l'amphétamine à celles qui sont obtenues avec l'éphédrine, on constate que pour un même pH, la fixation de l'amphétamine est toujours supérieure à celle de l'éphédrine d'un facteur égal à 1·4 dans le coeur et dans la rate. D'autre part, dans les deux organes étudiés et dans la limite de pH de nos expériences, on constate que la valeur T/M pour l'amphétamine à $\text{pH} = x$ est égale à la valeur T/M pour l'éphédrine à $\text{pH} = x + 0\cdot35$. Cette différence de 0·35 unité pH, déterminée expérimentalement, correspond à la différence de pK_a entre les 2 amines, si l'on admet pour l'amphétamine un pK_a de 9·93¹⁰ et pour l'éphédrine un pK_a de 9·58.¹¹ Cependant il faut noter que la différence de pK_a entre l'amphétamine et l'éphédrine est comprise selon les auteurs entre 0·19¹¹ et 0·44.¹⁰

Le pH et le pK_a sont reliés entre eux par la relation:

$$\text{pH} - \text{pK}_a = \log \frac{\text{forme non ionisée}}{\text{forme ionisée}}$$

En adoptant comme différence de pK_a entre les deux amines, la valeur 0·35, cela signifie que pour une différence de pH de 0·35 unité, les rapports $\frac{\text{forme non ionisée}}{\text{forme ionisée}}$

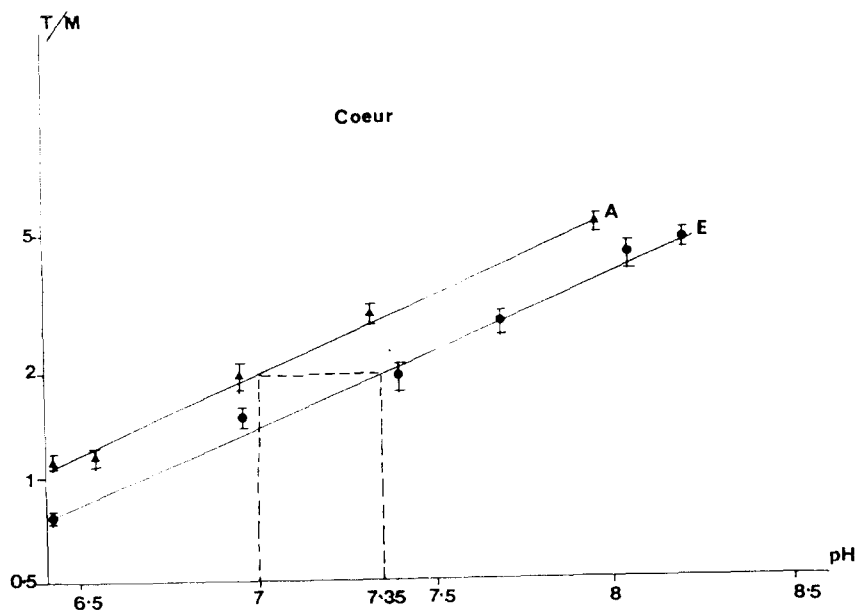


FIG. 4. Influence du pH du liquide de perfusion sur la fixation par le coeur isolé de l'amphétamine ^3H (A▲) et de l'éphédrine ^{14}C (E●). La concentration de chacune des amines dans le liquide de perfusion est de 0·1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Chaque point est la moyenne de cinq expériences. On peut voir que, pour une différence de 0·35 unité pH, les rapports T/M sont pratiquement identiques pour l'amphétamine et l'éphédrine.

seront égaux pour l'amphétamine et l'éphédrine, autrement dit, le degré d'ionisation de ces deux amines sera identique. Or, pour cette différence de pH de 0.35 unité, le coeur ou la rate fixent des quantités équivalentes d'amphétamine et d'éphédrine. On peut alors supposer que l'affinité de ces deux amines pour un organe donné est identique lorsque les deux amines ont le même degré d'ionisation. La différence de structure chimique entre l'amphétamine et l'éphédrine (fonction alcool secondaire en bêta, groupement méthyle sur l'azote) semble ne jouer un rôle dans l'intensité de leur fixation qu'en modifiant la valeur du pK_a .

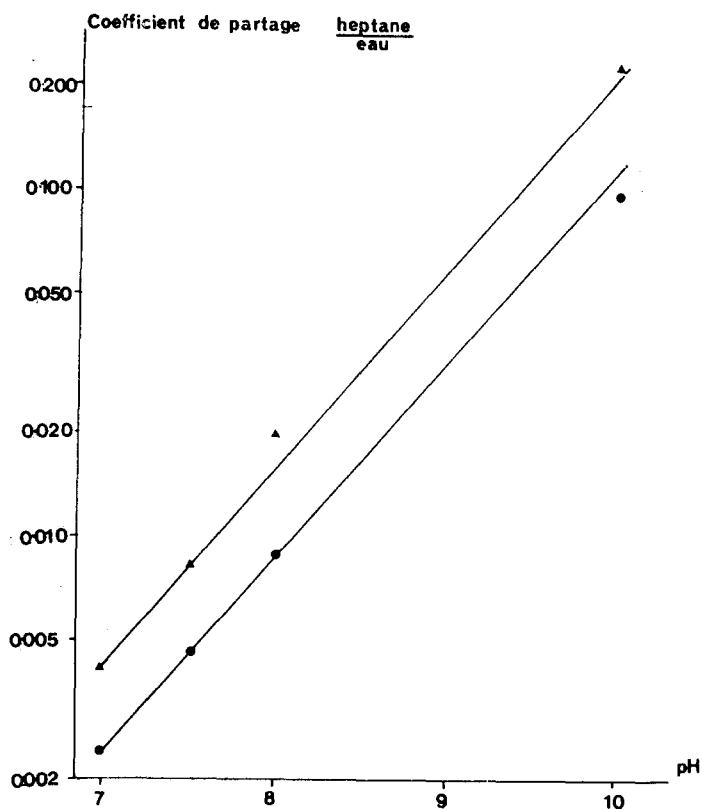


FIG. 5. Coefficients de partage de l'amphétamine 3H (▲) et de l'éphédrine ^{14}C (●) entre l'heptane et un tampon phosphate de sodium 0.2 M à différents pH.

Les constituants cellulaires responsables de la fixation de ces amines paraissent posséder un caractère lipophile : l'élévation du pH qui accroît la proportion de forme non ionisée augmente le passage de ces deux amines dans l'heptane, l'amphétamine se montrant plus lipophile que l'éphédrine. Il faut remarquer cependant que l'affinité de ces deux amines pour l'heptane est considérablement plus faible que leur affinité vis-à-vis des tissus. Le rapport de la concentration dans l'heptane à la concentration dans l'eau à pH 8 est de 0.02 pour l'amphétamine et de 0.0088 pour l'éphédrine, alors qu'aux mêmes pH, les rapports T/M sont toujours supérieurs à l'unité.

L'importance des constituants responsables de la fixation tissulaire de ces amines,

varie selon l'organe considéré: dans nos conditions expérimentales, la capacité de fixation de la rate est beaucoup plus importante que celle du coeur et des résultats identiques ont été observés chez l'animal entier, aussi bien avec l'éphédrine⁸ qu'avec l'amphétamine.¹³

Il est bien connu que la perméabilité des membranes cellulaires à une substance donnée varie, du fait de la structure lipidique de ces membranes, avec le degré d'ionisation de la molécule. Il a été montré¹⁴ pour un certain nombre de médicaments à caractère acide ou basique, que leurs vitesses d'absorption par la muqueuse gastrique, ou intestinale dépendaient de la valeur du pH du milieu, les molécules sous forme non ionisée étant préférentiellement absorbées. De même, l'intensité de l'excrétion urinaire de l'amphétamine¹⁵ et de l'éphédrine¹⁶ varie dans de grandes proportions avec le pH urinaire: les quantités d'amphétamine et d'éphédrine éliminées par l'urine sont fortement accrues lorsque l'urine est acide: dans ces conditions, la réabsorption tubulaire de ces amines est réduite, l'épithélium du tubule distal étant beaucoup plus perméable aux formes non ionisées qu'aux formes ionisées.¹⁷ L'élimination urinaire de ces amines étant accélérée, il en résulte une baisse progressive de leurs taux plasmatiques. Or, il existe pour chaque organe un équilibre permanent entre le taux circulant de l'amine et sa concentration dans l'organe: ceci a été montré *in vitro* sur le coeur isolé de Rat pour l'amphétamine³ et l'éphédrine⁴ et nous avons obtenu des résultats identiques *in vivo*, dans divers organes du Rat (coeur, rate, poumons, intestin) au bout de temps variables, après l'injection intraveineuse d'éphédrine ^{14}C (à paraître). L'ensemble de ces faits montre l'importance de la valeur du pH des différents liquides de l'organisme sur l'intensité de l'accumulation et sur la durée de vie dans l'organisme de l'amphétamine et de l'éphédrine.

Résumé—La fixation tissulaire de l'amphétamine ^3H et de l'éphédrine ^{14}C a été étudiée *in vitro* par incubation de coupes de rate et par perfusion du coeur isolé de Rat. La variation du pH (6.50 à 8.40) des liquides d'incubation ou de perfusion contenant l'amphétamine ou l'éphédrine entraîne une variation de leur accumulation tissulaire (exprimée par le rapport T/M: rapport des concentrations de l'amine g de tissu/ml de milieu): l'augmentation du pH du milieu de 1 unité entraîne, pour les deux amines, une augmentation du rapport T/M d'un facteur 2.5 dans le cas de la rate et 2.7 dans le cas du coeur. Pour un même pH, le rapport T/M de l'amphétamine est 1.4 fois plus élevé que celui l'éphédrine dans le coeur comme dans la rate. Lorsque le pH du milieu contenant l'éphédrine est supérieur de 0.35 unité à celui qui renferme l'amphétamine, la valeur des rapports T/M est la même pour l'amphétamine et l'éphédrine. Cette différence de 0.35 unité pH correspond approximativement à la différence de pK_a entre les deux amines: il en résulte que les affinités respectives de l'amphétamine et de l'éphédrine, pour un organe donné, sont équivalentes lorsque leurs degrés d'ionisation sont identiques.

Remerciements—Nous remercions vivement Melle Bernadette Chezlemas pour son excellente collaboration technique.

BIBLIOGRAPHIE

1. S. B. ROSS et A. L. RENYI, *Acta Pharmac. Toxic.* **24**, 297 (1966).
2. S. B. ROSS et A. L. RENYI, *J. Pharmac.* **18**, 756 (1966).
3. H. THOENEN, A. HÜRLIMANN et W. HAEFELY, *J. Pharm. Pharmac.* **20**, 1 (1967).
4. C. JACQUOT, J. BRALET, Y. COHEN et G. VALETTE, *Biochem. Pharmac.* **18**, 903 (1969).
5. C. JACQUOT, J. BRALET, Y. COHEN et G. VALETTE, *C.R. Soc. Biol.* (à paraître).
6. A. S. V. BURGEN et L. L. IVERSEN, *Br. J. Pharmac.* **25**, 34 (1965).
7. J. BRALET, Y. COHEN, et G. VALETTE, *Biochem. Pharmac.* **15**, 793 (1966).
8. J. BRALET, Y. COHEN et G. VALETTE, *Biochem. Pharmac.* **17**, 2319 (1968).

9. M. McILWAIN, *Biochem. J.* **49**, 382 (1951).
10. G. P. LEWIS, *Br. J. Pharmac.* **9**, 488 (1954).
11. E. B. LEFFLER, I. M. SPENCER et A. BURGER, *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 2611 (1951).
12. W. C. BOWMAN, M. J. RAND et G. B. WEST, in *Textbook of Pharmacology* p. 485. Blackwell Scientific Publications (1968).
13. R. W. FULLER et C. W. HINES, *Biochem. Pharmac.* **16**, 11 (1967).
14. L. S. SHANKER, in *Advances in drug research*, Academic Press, **1**, 71 (1964).
15. A. M. ASATOOR, B. R. GALMAN, J. R. JOHNSON et M. D. MILNE, *Br. J. Pharmac.* **20**, 293 (1964).
16. G. R. WILKINSON et A. H. BECKETT, *J. Pharmac.* **162**, 139 (1968).
17. I. M. WEINER et G. H. MUDGE, *Am. J. Med.* **36**, 743 (1964).