

shown by experiments in which the sleeping times of mice pretreated with serotonin were compared with those of mice injected with hexobarbital alone. Table 1 shows that mice given 20 mg per kilogram of serotonin 10 min prior to 100 mg per kilogram of hexobarbital slept for a considerably greater time than did animals given only the barbiturate.

Serotonin by itself in a dose of 20 mg per kilogram produced a mild depression, but doses as high as 100 mg per kilogram failed to produce hypnosis.

When serotonin was administered intravenously to mice which had just recovered from hypnosis induced by hexobarbital, the animals almost immediately fell asleep again. This shows that serotonin causes subhypnotic amounts of the barbiturate to become hypnotic. Thus, it acts like chlorpromazine and reserpine by increasing the sensitivity of the central nervous system to the barbiturate¹, rather than like β -diethylaminoethyl diphenylpropylacetate (SKF 525-A) which potentiates the activity of many drugs by interfering with their rate of detoxication².

Duration of hypnosis of hexobarbital in mice. Adult male mice were given the various drugs intraperitoneally. LSD (10 mg per kilogram) was given one hour before, and serotonin (20 mg per kilogram) given 10 min before hexobarbital (100 mg per kilogram). The duration of hypnosis is defined as the time from the loss to the return of the righting reflex. Values for duration of hypnosis are means $\pm$ standard deviations. Figures in brackets refer to numbers of animals in each series.

Hexobarbital alone min	Hexobarbital + Serotonin min	Hexobarbital + LSD + Serotonin min
19 $\pm$ 6 (12)	61 $\pm$ 7 (8)	30 $\pm$ 5 (9)

When mice were given 10 mgm per kilogram of LSD prior to the serotonin, the potentiating effects of serotonin were markedly diminished (Table). LSD in doses of 5 mg per kilogram had an almost equivalent effect and definite antagonism to serotonin was observed with doses as low as 1 mg per kilogram. LSD by itself had little or no effect on the hypnosis produced by the barbiturate.

The observations described here are in accord with the concept that serotonin has an important function in the brain and that LSD produces its mental disturbances by suppression of some central action of serotonin.

P. A. SHORE, S. L. SILVER, and
B. B. BRODIE

Laboratory of Chemical Pharmacology, National Heart Institute, National Institutes of Health, Public Health Service, U. S. Department of Health, Education and Welfare, Bethesda, Md., March 10, 1955.

Zusammenfassung

Serotonin (5-Oxytryptamin) wirkt bei der Maus als mildes Sedativum und steigert den hypnotischen Effekt von Evipan deutlich. Diese Wirkungssteigerung kann durch Lysergsäure-diäthylamid (LSD) antagonisiert werden. Dieser Befund stimmt mit der Ansicht überein, dem Serotonin komme eine physiologische Rolle im Gehirn zu und dass LSD möglicherweise durch antagonistische Wirkung gegenüber Serotonin Psychose verursachen kann.

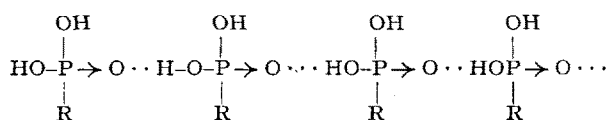
¹ B. B. BRODIE, P. A. SHORE, S. L. SILVER, and R. PULVER Nature (in press).

² J. AXELROD, J. REICHENTHAL, and B. B. BRODIE, J. Pharm. Exp. Therap. 112, 49 (1954).

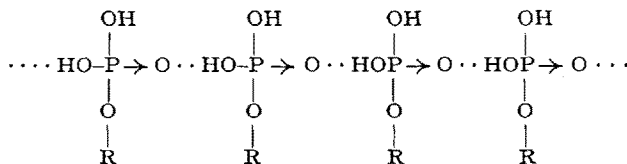
Zum Wirkungsmechanismus des Histamins

Wir haben in früheren Publikationen¹ dargelegt, dass Histamin die Kapillaraktivität von Cetyl-Phosphorsäureester an der Grenzfläche Chloroform-Wasser ausserordentlich stark erhöht. Histamin ist in dieser Hinsicht einzigartig, indem von einer grossen Anzahl bisher geprüfter organischer Verbindungen ähnlicher und verschiedener Konstitution keine dessen Wirkung auch nur annähernd erreicht. Fast ebenso stark, jedoch in entgegengesetztem Sinne, ist die Wirkung des Kalziums und des Bariums sowie der Antihistaminverbindungen. Im Hinblick auf die physiologische Bedeutung des Histamins haben wir einige Versuche unternommen, den Mechanismus dieses Phänomens aufzuklären.

Nach KOSOLAPOFF² sind Phosphonsäuren in ausgedehntem Masse assoziiert und bilden lineare Ketten von der Struktur:

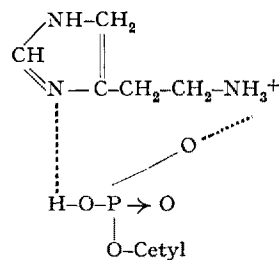


wobei der Zusammenhalt durch H-Brückenbildung zwischen den H-Atomen einer sauren Hydroxylgruppe und dem O-Atom der benachbarten Phosphonsäure bewirkt wird. Wir dürfen nun wohl annehmen, dass auch primäre Phosphorsäureester sich auf gleiche Weise durch H-Brücken assoziieren, so dass wir an der Grenzfläche Chloroformwasser einen Film mit der Struktur



haben, da ja bereits Cetylphosphat selbst eine Reduktion der Grenzflächenspannung bewirkt und demnach dieser Stoff an der Grenzfläche angereichert wird.

Diese laterale Adhäsion der Cetylphosphat-Moleküle ist nun in erster Linie massgebend für den Wert der Grenzflächenspannung, wie schon DANIELLI³ in seinen Untersuchungen mit langkettigen Carbonsäuren hervorgehoben hat. Einer Verminderung dieser lateralen Kräfte entspricht demnach eine Depression der Grenzflächenspannung. Wenn nun Histamin diese gegenseitige Adhäsion herabsetzt, so ist dies durch Bildung einer ringförmigen Anlagerung desselben an den Phosphorsäureester erklärbar, wobei durch Ionenbindung sowohl als durch Wasserstoffbrücken ein Komplex von der Struktur:



¹ R. HIRT *et al.*, Arzneimittelforschung 2, 453 (1952); 3, 175, 297 (1953); 4, 372 (1954).

² G. M. KOSOLAPOFF, J. Amer. chem. Soc. 74, 3427 (1952); J. chem. Soc. London 1950, 3535.

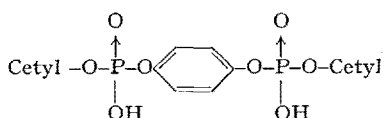
³ J. F. DANIELLI, Proc. Roy. Soc. London 122B, 155 (1937).

entsteht, zu dessen Bildung Histamin offenbar in besonderem Masse befähigt ist. Diese Spezifität ist bedingt durch die passende räumliche Anordnung und die geeigneten nukleophilen Eigenschaften der N-Atome in Histamin, das im primären Phosphorsäureester, dessen zwei Hydroxylgruppen stark verschiedene Dissoziationskonstanten haben, den geeigneten Partner findet. Am Briegleb-Kalottenmodell lässt sich diese günstige sterische Situation sehr gut erkennen. Zudem bewirkt das Histamin infolge seiner ausgeprägten hydrophilen Eigenschaften eine Fixierung des Komplexes an der Grenzfläche zum Unterschied zu den Antihistaminverbindungen, die bei ähnlichen nukleophilen Eigenschaften und sterischer Anordnung infolge ihrer höheren Alkylierung lipophile Komplexe ergeben, die nun in der lipoiden Phase «untertauchen», was sich an einer Verminderung der kapillaren Aktivität bemerkbar macht.

Der starke Anstieg der Grenzflächenspannung durch Kalzium- und Bariumionen wird, entsprechend der Annahme von DANIELLI¹, bewirkt durch die Verstärkung der lateralen Bindung durch elektrostatische Verknüpfung benachbarter Phosphorsäureester durch die zweiwertigen Kationen. Eine intramolekulare Ringbildung ist in diesem Falle, im Gegensatz zum Histamin, unwahrscheinlich, da ein Vierring entstehen müsste.

Auf einfache sekundäre Phosphorsäureester (Cetyl-Methylphosphat) ist Histamin völlig unwirksam, wie wir schon früher² mitgeteilt haben.

Es blieb noch die Möglichkeit einer Wirkung auf bissekundäre Phosphorsäureester, bei denen der Abstand der beiden sauren Hydroxylgruppen nach dem Kalottenmodell eine Ringbildung durch Histamin im erwähnten Sinne zulassen würde. Eine solche Verbindung ist der symmetrische Diczetylster des Hydrochinon-Diphosphats:



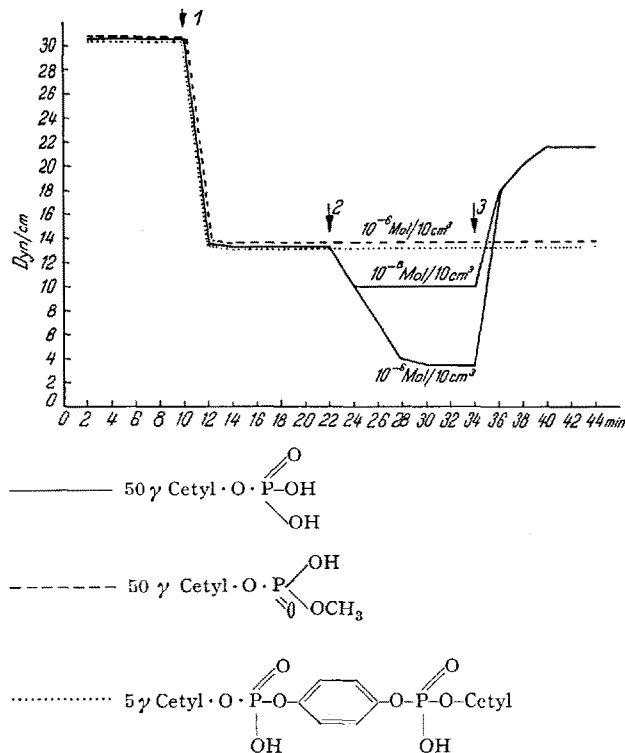
Es hat sich nun gezeigt, dass Histamin auf solche Verbindungen völlig wirkungslos ist, auch in Konzentrationen, die 100mal grösser sind als die Grenzverdünnung, die bei primärem Cetylphosphat noch eine deutliche Wirkung hervorruft. Über den Verlauf solcher Messungen orientiert die folgende graphische Darstellung von 3 Kurven, welche den angegebenen 3 Phosphorsäureestern entsprechen.

In diesem Kurvenbild sind auf der Ordinate die Werte der Grenzflächenspannung in Dyn/cm, gemessen mit dem Tensiometer nach LECOMTE DU NOUY und auf der Abszisse die Zeit in Minuten aufgetragen. Die untere Phase in der Messzelle besteht aus 10 cm³ reinstem Chloroform, die obere aus 10 cm³ destilliertem Wasser. Im übrigen verweisen wir auf unsere früheren Publikationen².

Bei Pfeil 1 erfolgt die Zugabe der angegebenen Menge Phosphorsäureester, gelöst in 0,1 cm³ Chloroform. Dadurch sinkt im Verlauf von rund 2 min die Grenzflächenspannung von 30 bis 31 Dyn/cm auf 13–14 Dyn.

Pfeil 2 bezeichnet den Moment der Zugabe der angegebenen Menge Histamin-Dichlorhydrat, gelöst in 0,1 cm³ Wasser. Wie ersichtlich, verursacht Histamin beim primären Phosphat schon bei einer Zugabe von 10⁻⁶ Mol zu den 10 cm³ Wasser eine starke sekundäre Depression

der Grenzflächenspannung, während bei den sekundären Phosphorsäureestern auch 10⁻⁶ Mol Histamin völlig wirkungslos sind.



Pfeil 3 bezeichnet den Moment der Zugabe von 10⁻⁶ Mol Ca-acetat in 0,1 cm³ Wasser gelöst. Dieses bewirkt beim primären Phosphat einen starken Anstieg der Grenzflächenspannung, wobei wiederum die sekundären Ester nicht beeinflusst werden. Dieser Effekt ist eine direkte Einwirkung auf das primäre Phosphat, wie wir schon früher¹ dargelegt haben, da er auch ohne Histamin eintritt und die Wirkung des Histamins überkompensiert. Eine ähnliche Wirkung wie Kalzium-Ionen haben höhere aliphatische Amine – als freie Basen oder als Chlorhydrate – und ganz speziell die Antihistaminverbindungen.

Die grosse Spezifität der Histaminwirkung an sich auf primäre Phosphorsäureester sowie die ausgesprochene antagonistische Wirkung des Kalziums und der Antihistaminverbindungen darauf rechtfertigen u. E. die Vermutung, dass auch der physiologische Wirkungsmechanismus des Histamins mit primären Phosphorsäureestern verknüpft ist. Steht an unserem Test der Einfluss des Histamins auf primäre Phosphorsäureester an Grenzflächen im Vordergrund, so geschieht dies in erster Linie aus methodischen Gründen. Die gleiche Wirkung des Histamins dürfte sich aber auch in homogenem Milieu abspielen und zu einer Desaggregation und Blockierung von primären Phosphorsäureestern, wie sie in Proteinen³ und Fermenten³ vorkommen, führen.

R. HIRT und R. BERCHTOLD

Forschungsinstitut der Dr. A. Wander AG., Bern, den 16. April 1955.

¹ R. HIRT *et al.*, *Arzneimittelforschung* 2, 453 (1952); 3, 175, 297 (1953); 4, 372 (1954).

² G. PERLMANN, *Biochem. Biophys. acta* 13, 452 (1954); *J. Amer. chem. Soc.* 74, 3191 (1952); *Nature* 174, 273 (1954).

³ A. W. D. AVISON *et al.*, *Quart. Rev.* 5, 717 (1951).

¹ J. F. DANIELLI, *Proc. Roy. Soc. London* 122B, 155 (1937).

² R. HIRT *et al.*, *Arzneimittelforschung* 2, 453 (1952); 3, 175, 297 (1953); 4, 372 (1954).

Summary

With the aid of the tensiometer, it can be proved that histamine reacts in a specific manner with primary phosphoric acid esters. This proof is brought about by strongly increasing the capillary activity of cetyl phosphate by histamine on the interface chloroform water. The mechanism of this reaction is discussed. Simple secondary phosphoric acid esters and bi-secondary phosphoric acid esters are not influenced under the same conditions. A pronounced antagonistic effect of calcium ions antihistamine compounds may be proved with the same assays.

The point of attack of these compounds is the phosphate and not the histamine. The results of the tests confirm the assumption that the mode of action of the histamine and of the antihistamine compounds is connected with primary phosphoric acid esters.

Stability and Local Anaesthetic Effect in Some Derivatives of "Xylocaine"

Xylocaine (o,o'-dimethyl-N-diethylaminoacetylani-
lin), prepared by LÖFGREN in 1943, is one of the most successful recent local anaesthetics. In view of the favourable properties of this compound in clinical practice, a number of structural analogues has been prepared by various authors. From published work on the structure-activity relations in this series, particular interest attaches to the fact that the favourable properties of Xylocaine, and especially the duration of its action, are largely dependent on the presence of the two ortho-methyl substituents on the aromatic nucleus. This fact clearly emerges in the case of e.g. analogues derived from the isomeric xylydines and toluidines, and more strikingly still from a comparison with the demethylated analogues derived from o-toluidine and aniline. LÖFGREN¹, who was the first to note this effect, interpreted it in the light of the mechanism of action proposed by him, which was based on the inhibition of resonance between nitrogen atom and the aromatic nucleus. More recently HACH² has criticized LÖFGREN's theory and submitted the view that lipophilic character is an important factor affecting the activity of Xylocaine and its isomeric and demethylated analogues.

Though the chemical stability of Xylocaine was noted already by LÖFGREN and later confirmed particularly by WOOD *et al.*³, who studied the metabolism of this drug in dogs, this factor has, in our opinion, been given insufficient weight in theoretical considerations regarding the mechanism of action of this type of compound.

In consideration of the work of a number of earlier authors⁴ concerning the stability of anilide bonds in simpler compounds, we came to the conclusion that the increase in activity observed with progressive substitu-

tion of the ortho-positions with methyl groups might be connected with the increased stability of the amide linkage. Compounds of the Xylocaine type are most likely to be initially attacked *in vivo* at the anilide bond (peptidases) with formation of the free aromatic amine and liberation of the acid moiety. This assumption is borne out by the work of THER¹, which has recently become available to us, on the Xylocaine analogue Hostacaine. The stability of the anilide linkage must needs affect the metabolism of these compounds in the organism which leads to the formation of inactive metabolites from the active compounds (cf. e.g. KINDLER²).

Table I.—Structures and Numbering of the Compounds Studied

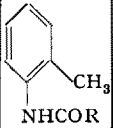
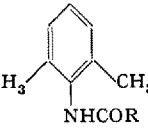
Structure R =			
–O·CH ₂ ·CH ₂ ·N(C ₂ H ₅) ₂ –CH ₂ ·N(C ₂ H ₅) ₂ . . .	"S 11" "S 200"	"S 31" "S 201"	"S 170" "S 202" (Xylocaine)

Table II.—Rate Constants of Acid Hydrolysis and Anaesthetic Activities

Compounds	Rate constant k (sec ⁻¹)	Activity	
		Surface anaesthesia (rabbit)	infiltration anaesthesia (guinea-pig)
"S 11"	8.22×10^{-6}	0.1	1.2
"S 31"	3.18×10^{-6}	0.54	1.0
"S 170"	3.32×10^{-7}	1.0	2.1
"S 200"	8.15×10^{-5}	(incomplete)*	0.12
"S 201"	2.64×10^{-5}	(4.5 ± 2.0 min)*	0.24
"S 202"	7.27×10^{-7}	0.24 (52.5 ± 2.0 min)*	1.4
Cocaine	—	1	—
Procaine	—	—	1

* Duration of complete anaesthesia after application of M/3 solution.

This hypothesis, which has been developed in more detail elsewhere³, has now been subjected to experimental testing by measurement of the rates of acid hydrolysis of Xylocaine ("S 202") and its demethylated analogues ("S 200" and "S 201") as well as of the three structurally related carbamates ("S 11", "S 31", and "S 170") and comparison with the local anaesthetic activities of these compounds. The structures of the substances studied are shown in Table I; the results are recorded in Table II.

The rates of hydrolysis were studied in 5N-HCl at 99.5°C at an initial substrate concentration of 0.01 M and followed by an electrophotometric determination of the

¹ N. LÖFGREN, Arkiv Kemi Mineral. Geol. [A] 22, No. 18, 1 (1946). — N. LÖFGREN and B. LUNDQUIST, Svensk Kem. Tid. 58, 206 (1946). — N. LÖFGREN, Xylocaine a new synthetic drug (Haeggströms, Stockholm 1948).

² V. HACH, Českoslov. farm. 2, 159 (1953).

³ F. G. McMAHON and L. A. WOODS, J. Pharmacol. Exptl. Therap. 103, 354 (1951); Federat. Proc. 10, 321 (1951).

⁴ G. SEMERANO, Gazz. chim. ital. 61, 921 (1931). — G. BADDELEY, Nature 144, 444 (1939). — O. CH. DAVIS, J. Chem. Soc. 1909, 1397; Z. physik. Chem. 78, 353 (1912). — O. CH. DAVIS and F. RIXON, J. Chem. Soc. 1915, 728. — P. FRIEDLÄNDER, Mn. Chem. 19, 642 (1898).

¹ L. THER, Arch. exptl. Path. Pharmacol. 220, 300 (1953). — L. THER and H. HARNISCH, Klin. Wschr. 31, 850 (1953). — A. HÄUSSLER and L. THER, Arzneimittel-Forsch. 3, 609 (1953).

² K. KINDLER, Arch. Pharm. 266, 19 (1928); 267, 541 (1929); Forschungen u. Fortsch. 10, 435 (1934).

³ A. SEKERA, New Trends in Local Anaesthetic Research lecture presented at the Scientific Conference, held at Brno University, February 19th–20th, 1954.