

Stimulierung der Atmung durch Bradykinin und Kallidin

Die nach der Methode von KONZETT und RÖSSLER¹ registrierbare *bronchokonstriktorische* Wirkung des Bradykinins am Meerschweinchen (COLLIER et al.^{2a}, BOISSONNAS et al.³, KONZETT und STÜRMER⁴) lässt sich – im Gegensatz zu dem durch Histamin verursachten Bronchospasmus – durch Salicylate, z.B. Aspirin, verhindern (COLLIER et al.^{2b}).

(1) Am spontan atmenden Meerschweinchen und Kaninchen in Urethannarkose verursachten kleine Bradykinindosen (1–8 µg/kg i.v.), die offensichtlich noch nicht bronchokonstriktorisch wirkten, eine starke *Hyper- und Tachypnoe*, wobei Atemfrequenz und Atemvolumen auf das Doppelte bis Dreifache des Ausgangswertes anstiegen. Diese Wirkung setzte wenige Sekunden nach der Injektion ein und hielt 4–8 min lang an. Hohe Bradykinindosen (20–40 µg/kg i.v.) führten an Meerschweinchen zu einer 10–30 sec dauernden Apnoe.

Ein uns von Herrn Professor WERLE, München, zur Verfügung gestelltes hochgereinigtes Kallidinpräparat (aus Inkubaten von Rinderserum mit Submaxillaris-Kallikrein; 1 Einheit entsprach der Wirksamkeit von 1 µg

synthetischem Bradykinin am isolierten Rattenuterus) stimulierte in vergleichbarer Dosierung (2–6 E/kg i.v.) ebenfalls die Atmung, indem es an Meerschweinchen und Kaninchen zu Hyper- und Tachypnoe führte und das Atemvolumen erhöhte.

Nach bilateraler Vagotomie liess sich die atmungsstimulierende Wirkung des Bradykinins und Kallidins nicht mehr auslösen. Salicylate (4–40 mg/kg Aspirin i.v.) verhinderten sie vollständig (Tabelle).

(2) Auch kleine Dosen Veratrin (5–20 µg/kg i.v.) wirkten am Meerschweinchen tachypnoisch. Die Veratrinwirkung liess sich ebenfalls durch Vagotomie, nicht jedoch durch Salicylate verhindern (Tabelle).

(3) Die tachypnoische Wirkung des *Histamins* (2–20 µg/kg) ist mit einer bronchokonstriktorischen Wirkung verknüpft. Im Gegensatz zur Bradykinin-, Kallidin- und Veratrinwirkung wird sie durch Broncholytica (Aludrin) aufgehoben (Tabelle).

Die ausführliche Veröffentlichung erscheint in Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac.

Summary. In guinea pigs and rabbits small doses of bradykinin and kallidin (1–8 µg/kg i.v.), which have no bronchoconstrictor effect, stimulate respiration causing tachy- and hyperpnea. Bilateral vagotomy as well as salicylates (4–40 mg/kg i.v.) abolish these respiratory responses.

V. GJURIŠ, B. HEICKE,
P. HOLTZ und E. WESTERMANN

Pharmakologisches Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Deutschland), 30. April 1962.

Beeinflussung der tachypnoischen Wirkung von Bradykinin, Kallidin, Histamin und Veratrin durch Vagotomie, Aludrin und Aspirin. Ergebnisse von Versuchen an 14 Meerschweinchen (400–700 g) in Urethannarkose (1,3–1,5 g/kg s.c.). – Bradykinin (1–8 µg/kg i.v.); Kallidin (2–6 E/kg i.v.); Histamin (2–20 µg/kg i.v.); Veratrin (5–20 µg/kg i.v.); Aludrin (Isoproterenol, 8–16 µg/kg i.v. 10 sec vorher); Aspirin (Acetylsalicylsäure, 4–40 mg/kg i.v. 5 min vorher).

	Tachypnoe		
	Bradykinin Kallidin	Histamin	Veratrin
Vagotomie	aufgehoben	aufgehoben	aufgehoben
Aludrin	unbeeinflusst	aufgehoben	unbeeinflusst
Aspirin	aufgehoben	unbeeinflusst	unbeeinflusst

Identifizierung von Substanzen durch Simultan-Chromatographie isotopenmarkierter Verbindungen¹

Die inzwischen relativ niedrigen Preise für ¹⁴C-Präparate sowie geeignete autoradiographische Methoden rechtfertigen heute zur Sicherung von Untersuchungsergebnissen eine weitgehende Radiokontrolle auch dort, wo die Einrichtungen eines Isotopenlabors nicht vorhanden sind².

Die Schwierigkeiten bei der Identifizierung unbekannter Naturstoffe auf dem Papierchromatogramm sind bekannt. Das bisher gebräuchlichste Verfahren, durch parallel laufende Testgemische die einzelnen Komponenten eines unbekannten Gemisches zu lokalisieren, scheitert in vielen Fällen an der Retention oder Sekundäradsorption einzelner Flecke und an farbverändernden lokalen Reaktionen auf dem Papier, beides Phänomene, die durch begleitende Ballaststoffe erzeugt werden und beim Testgemisch nicht gegeben sind.

Durch Verwendung ¹⁴C-markierter Testsubstanzen, deren Menge unter der chemischen Nachweisgrenze liegt, deren spezifische Aktivität jedoch zur Autoradiographie des Chromatogramms ausreicht (für Aminosäuren z.B. 5–10 mC/mM) werden für das Testgemisch absolut, gleiche Bedingungen geschaffen. Simultan auf gleichem Startpunkt aufgetragen unterliegt dieses auch während der Chromatographie den gleichen physiko-chemischen Bedingungen wie das Untersuchungsgemisch, obwohl es später getrennt von diesem erfasst werden kann. Beim Vergleich des angefärbten Chromatogramms mit seinem Autoradiogramm schliessen geringste Abweichungen von Form oder Lage der Flecken eine Identität bereits aus.

¹ Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeiten danken wir dem Bundesministerium für Atomenergie und Wasserwirtschaft.

² Durch Verwendung empfindlicher Röntgenpapiere kann bei relativ kurzem Kontaktbelichten (einige Stunden) ein eindeutiges Ergebnis mit geringsten – weit unter der Freigrenze liegenden – Aktivitäten erzielt werden.

Technik. Über die normale, in der Literatur beschriebene autoradiographische Arbeitstechnik³ hinaus muss beachtet werden, dass die markierten Testsubstanzen *vor* dem Auftragen mit der zu untersuchenden Lösung vermischt werden und dass die Belichtung zur Ausschaltung chemischer Störeffekte in jedem Fall *vor* dem Besprühen des entwickelten Chromatogramms erfolgt. Zur exakten Auswertung wird dieses ebenso wie das Röntgenblatt mit einem Locher gestanzt und in zwei auf einer Kunststoffplatte befestigte Stifte eingepasst; Fotoschichtseite auf Auftragsseite, da die Rückseite des Chromatogramms oft nur geringe Aktivität zeigt. Sind photochemisch wirksame Substanzen zu erwarten, wird eine 10 μ dicke Hostaphan®-Folie dazwischengelegt. Einige Blatt Papier genügen zur Strahlenisolierung, so dass auf einer Unterlage mehrfach übereinander autoradiographiert werden kann. Die besten Ergebnisse zeigt Gevaert Structurix D 10 ohne Schutzschicht, es folgen Kodak Definixfilm, Adox Röntgenpapier und andere Fabrikate. Die Expositionszeit beträgt z. B. bei Definix rund 5 h für 0,05 μ C (= z. B. 0,7 γ Alanin einer spezifischen Aktivität von 5 mC/mM) auf Filterpapier einer Stärke von etwa 10 mg/cm².

Beispiele. (1) Es wird der Nachweis der An- oder Abwesenheit einzelner Substanzen auch bei eng zusammenliegenden Flecken ermöglicht (Figur 1, A–A*). Die fast gleichen Rf-Werte würden in einem gewöhnlichen Chromatogramm keine Unterscheidung mehr erlauben. (2) Veränderungen durch Begleitstoffe spielen keine Rolle mehr. B₁ (Figur 1) zeigt das Chromatogramm von Glycin, Glutaminsäure und Tyrosin mit grösseren Mengen Rhamnose und Natriumsulfat als Verunreinigungen, B₁* das dazugehörige Autoradiogramm. B₁ zeigt gegenüber B₂, dem parallel gelaufenen Testgemisch der drei Aminosäuren, deutliche Veränderungen in Rf-Werten und Fleckenform. Der blosse Vergleich mit diesem Paralleltest liess vermuten, dass der mittlere längliche Fleck in B₁ aus mehreren Aminosäuren besteht, die weder mit Glycin noch mit Glutaminsäure identisch sind und dass Tyrosin in B₁ nicht anwesend ist. Das Autoradiogramm B₁* zeigt dagegen, dass es sich in Wirklichkeit im ersten Fall nur um auseinandergezogene Glutaminsäure handelt und dass weiterhin Tyrosin sehr wohl anwesend ist. (3) Der Paralleltest C₁–C₂ (Figur 1) zeigt gegenüber der Simultanauftragung C₃–C₃* ähnliche Täuschungen, die auch ohne Ballaststoffe nur durch Anwesenheit anderer Verbindungen der gleichen Klasse auftreten können. (4) Bei sehr langen Laufstrecken wandern grössere Mengen oft schnell-

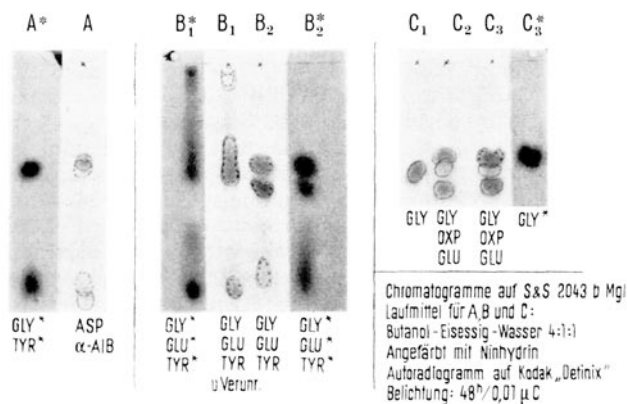


Fig. 1. Identifizierung von Papierchromatogrammen durch Autoradiographie mitlaufender isotonenmarkierter Verbindungen im Vergleich zur «Identifizierung» durch parallellaufende Testgemische. (A*, B₁*, B₂*, C₃*, ... Autoradiogramme).

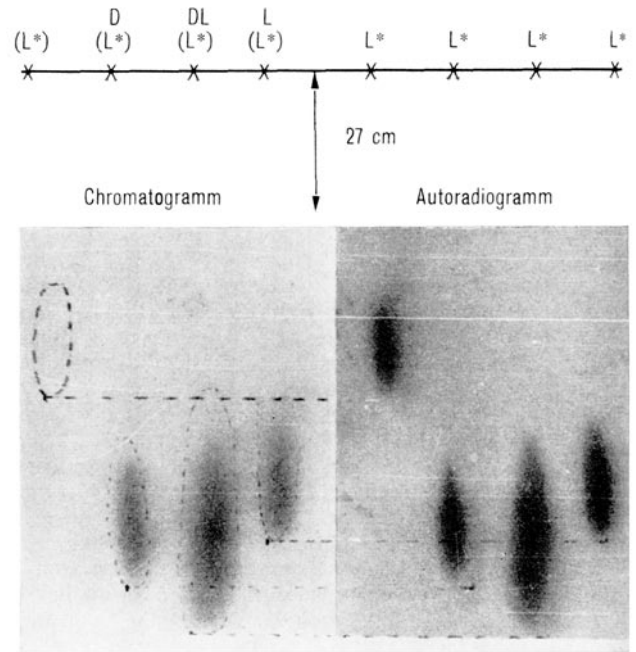


Fig. 2. Modellversuch zur Veranschaulichung von Konzentrations-effekten, die Trennungen vortauschen können. D bzw. DL und L = D- bzw. DL- und L-Histidin. L* = ¹⁴C-markiertes L-Histidin. Chromatogramm auf S.u.S. 2043 b Mgl. Laufmittel: Methanol-Wasser 3:1. Angefärbt mit Pauly-Reagenz. Autoradiogramm auf Kodak Definix. Belichtung 10 h, Aktivität 0,03 μ C.

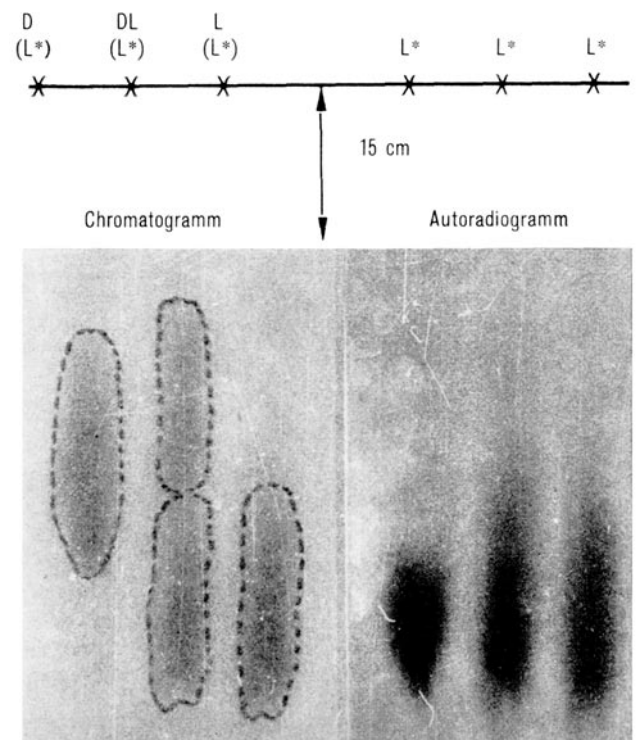


Fig. 3. Nachweis einer erfolgten Antipodentrennung. D, DL, L und L* wie Figur 2. Chromatogramm auf Whatman Nr. 4. Laufmittel: Methanol-Wasser 3:1. Angefärbt mit Pauly-Reagenz. Autoradiogramm auf Kodak Definix. Belichtung 10 h, Aktivität 0,03 μ C.

³ I. M. Hais, in I. M. Hais und K. Macek, *Handbuch der Papierchromatographie* (G. Fischer, Jena 1958), p. 199.

ler als kleinere, so dass z. B. bei einem Chromatogramm von *D*-, *L*- und *DL*-Histidin je nach den Umständen bei Besprühen mit Pauly-Reagenz zu Unrecht der Eindruck einer Trennung in die Antipoden entstehen kann. Auf diese Weise kann man beliebige Effekte erzielen. Für das Chromatogramm in Figur 2 wurden die Mengen so gewählt, dass eine Verteilung von *R_f*-Werten zustandekam, wie sie in keinem Fall bei einer Trennung in Antipoden zu erwarten ist. Am schnellsten laufen hier 30 γ *DL*-Histidin, dann folgen 20 γ *D*- und 15 γ *L*-Histidin. «Gewichtsloser» Tracer allein bleibt am weitesten zurück. Auf einer anderen Papiersorte, Whatman Nr. 4, die diesen Konzentrationseffekt nicht zeigt, erfolgt dagegen mit Sicherheit eine Antipodentrennung (Figur 3). Ein einwandfreier Nachweis der tatsächlichen Vorgänge wird also besonders für eine gleichzeitige und unabhängige Identifizierung von optischen Antipoden (als Substanzen

gleicher skalarer Grössen ergeben diese ähnliche Probleme wie Untersuchungen über Selbstdiffusion) nur durch die Simultanauftragung radioaktiver Tracer ermöglicht.

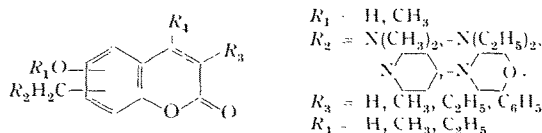
Summary. Weightless amounts of radioactive test-mixtures are run from the same starting point as the compounds to investigate while checked independently. It is shown that this allows a dependable identification even in cases where the technique of inactive parallel running test-mixtures fails completely.

F. VESTER und W. REITER

Institut für Organische Chemie der Universität des Saarlandes, Biochemisches und Isotopenlabor, Saarbrücken (Deutschland), 13. April 1962.

New Centrally Acting Drugs: Coumarin Derivatives

According to JONGEBREUR¹, there seems to be no pharmacological difference in coronary-dilator potency between chromone and coumarin derivatives. As a number of *N*-substituted 8-amino-methyl-7-methoxy and 7-hydroxychromones and flavones with central nervous system (C.N.S.) stimulating activity have recently been described^{2,3}, we thought it interesting to test whether this activity was retained in the corresponding coumarin derivatives. These are represented by the general formula:



in which the positions of the hydroxy or methoxy group and the basic chain were 7,8 – 7,6 – 6,5 – and 8,5 respectively. These compounds were prepared via the Mannich reaction on hydroxycoumarins or by means of the chloromethylation procedure applied to methoxy analogues, followed by amination. In both cases, secondary amines such as dimethyl and diethylamine, piperidine and morpholine were employed.

The pharmacological screening of fifty coumarin derivatives has shown that the C.N.S. stimulating activity is retained, though to a lower degree than in the corresponding chromone and flavone compounds. No difference is noticeable between hydroxy and methoxy derivatives, although the latter seem to furnish the most active compounds. The optimal position for the methoxy group and the basic chain is the *ortho* position, and, of the locations

tried, the 6:5 positions were found to be the best for C.N.S. stimulating activity. When the oxygen function and the basic chain are *para* to one another, a considerable loss of activity is observed, e.g. in the *N*-substituted 5-aminomethyl-8-methoxy (and 8-hydroxy) derivatives, with the sole exception of 3-methyl-8-methoxy-5-dimethylaminomethylcoumarin.

Of the basic chains, the dimethylaminomethyl is the most efficient, as in the corresponding chromone and flavone compounds. 6-Methoxy-5-dimethylaminomethyl-3-phenylcoumarin (Rec 14-0073) seems to be the most active compound in the series. Its activity expressed as the reciprocal of the intraperitoneal LD₅₀ of metrazol (71 mg/kg) was 17,8, on a molar basis, i.e. half that of the most active compound in the chromone series.

Riassunto. Si descrive una nuova classe di farmaci stimolanti il sistema nervoso centrale, rappresentata dalle aminometilidrossi- e dalle aminometilmetossicumarine *N*-sostituite.

L'attività di questi nuovi composti è inferiore a quella dei corrispondenti isomeri derivati dal cromone e dal flavone.

P. DA RE, L. BONOLA, I. SETNIKAR,
and M. J. MAGISTRETTI

Department of Medical Chemistry and Department of Pharmacology, Research Division, Recordati S.p.A., Milano (Italy), June 1, 1962.

¹ G. JONGEBREUR, *Arch. int. Pharmacodyn.* **90**, 384 (1952).

² P. DA RE et al., *Nature* **181**, 362 (1959).

³ I. SETNIKAR et al., *J. Med. Pharm. Chem.* **3**, 171 (1961).