Antiaggregatorische und anticoagulante Eigenschaften von Oligoaminen, 9. Mitt.

Zur Pharmakokinetik von N,N′,N″-Tris-4-(3-iod-4-methoxyphenyl)-butyl-1,3,5-benzol-triethanamin

Klaus Rehse, Wolfgang Buck und Martin Wenzel

Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin,
Königin-Luise-Str. 2+4, 1000 Berlin 33

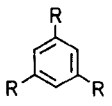
Eingegangen am 18. März 1988

Nach intravenöser Gabe an Ratten wird die Titelverbindung [**3***] in gut durchbluteten Organen wie Lunge (C_{max} = 16.6 % Dosis/g) und Milz (C_{max} = 8.8 % Dosis/g) angereichert. In Vollblut wird eine ausgeprägte Affinität zu Erythrocyten beobachtet, die in Humanblut zu 70 % auf eine unauswaschbare Membranbindung zurückzuführen ist. Nach oraler Gabe wird **3*** kaum resorbiert (~2 % der Dosis).

Platelet Aggregation Inhibiting and Anticoagulant Effects of Oligoamines, IX: Pharmakokinetic Investigation of N,N′,N″-tris-4-(3-iodo-4-methoxyphenyl)-butyl-1,3,5-benzene-triethanamine

After intraveneous administration to rats the title compound [**3***] is accumulated in organs with good vascularization like lung (C_{max} = 16.6 % dose/g) and spleen (C_{max} = 8.8 % dose/g). In whole blood a strong affinity to red blood cells is observed. 70 percent of **3*** bound to the erythrocytes are found in the membranes and could not be washed out with buffer. After oral adminstration of **3*** to rats only 2 % of the applied dose is absorbed from the gastrointestinal tract.

Kürzlich haben wir über N,N′,N″-Triarylalkyl-1,3,5-benzol-trialkanamine berichtet und zeigen können[1], daß es sich in vitro um starke Hemmstoffe der Thrombocytenaggregation handelt. Ferner konnten wir zeigen, daß diese Substanzklasse in vivo antithrombotisch wirkt[2]. Allerdings sind die Effekte nach oraler Applikation wesentlich geringer als nach intravenöser Gabe. Es war daher für die weitere Entwicklung dieser Substanzklasse erforderlich, Informationen über das pharmakokinetische Verhalten derartiger Oligoamine zu erhalten. Um dies im Bereich der für die Wirkung ausreichenden mikromolaren Konzentrationen rasch und rationell durchführen zu können, war die Markierung eines gerinnungsphysiologisch aktiven Oligoamines mit einem γ-Strahler wie ^{131}I angezeigt. Zunächst wurde in Anlehnung an ein bereits beschriebenes Verfahren[1] N,N′,N″-Tris-4-(4-methoxyphenyl)-butyl-1,3,5-benzol-triethanamin **(2)** dargestellt. Durch Umsetzung mit Jodchlorid wurde N,N′,N″-Tris-4-(3-iod-4-methoxyphenyl)-butyl-1,3,5-benzol-triethanamin **(3)** erhalten. Die Radiosynthese erfolgte durch Umsetzung von **2** mit ^{131}ICl (aus $Na^{131}I$ und ICl). Die radiochemische Reinheit von N,N′,N″-Tris-(3-^{131}iod-4-methoxyphenyl)-butyl-1,3,5-benzol-triethanamin (**3***) wurde radiochromatographisch gesichert.



1: R = $CH_2-CO-NH-(CH_2)_4-C_6H_3(OCH_3)$

2: R = $CH_2-CH_2-NH-(CH_2)_4-C_6H_3(OCH_3)\times 3HCl$

3: R = $CH_2-CH_2-NH-(CH_2)_4-C_6H_2(I)(OCH_3)\times 3HCl$

Biochemische Untersuchungen

Das Triethanamin-Derivat **3** hemmte in vitro die durch Collagen induzierte Thrombocyten-Aggregation (IC_{50} = 3 µmol/L) und verlängerte die Quickzeit (Δt = 15s bei 400 µmol/L). Es wies damit zwar nur ca. 1/8 der Wirkung von **2** (IC_{50} = 3 µmol/L; Δt = 18s bei 50 µmol/L), jedoch das gleiche Wirkungsprofil auf. Bei diesen und den folgenden Untersuchungen war der limitierende Faktor die geringe Löslichkeit der Substanz (60 µmol/L in Tris-Puffer).

Organverteilung von 3* nach i. v. Applikation

Zur weiteren Charakterisierung von **3*** wurde die Organverteilung bei Wistar-Ratten im Zeitraum 0.5–48 h untersucht. **3*** wurde in einer Menge von 0.5 bzw. 5 µmol/kg (Ethanol/Wasser 1 + 1, 100 µl) i. v. an Ratten verabreicht. Die Wiederfindung der injizierten Radioaktivität lag bei allen Versuchen etwas über 90 %. Aus Tab. 1 erkennt man, daß die Substanz keine große Bevorzugung für einzelne Organe zeigt, mit Ausnahme der Lunge, die im Vergleich zu Blut etwa die 4fache Konzentration aufweist. Die Schilddrüse zeigte keine bemerkenswerte Radioaktivitäts-Anreicherung. Damit konnte gezeigt werden, daß unter den in vivo-Bedingungen kaum Iod aus **3*** abgespalten wird. Eine Abhängigkeit der Verteilung von der Konzentration war nur in der Lunge nachweisbar. Die relativ hohe Lungen-Aufnahme bei der höheren Dosis (vgl. die Werte nach 0.5 h) kann sich aus der Schwerlöslichkeit der Substanz erklären (die Substanz konnte nur durch Zusatz von 50 % Ethanol für die i. v. Injektion präpariert werd).

Bei den anderen Organen treten Sättigungsphänomene bei den gewählten Konzentrationen noch nicht auf. Dies konnte durch einen weiteren Versuch erhärtet werden: wenn man die Ratten mit der 200fachen Dosis von **3** vorbehandelt (t =

 © *VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim, 1988* *0365-6233/88/1111-0813 $ 02.50/0*

Tab. 1: Organverteilung von **3*** bei Wistar-Ratten (n=3)
Lösungsmittel: EtOH/H_2O 1 + 1, 100 µl, i.v.

Zeit	Dosis µmol/kg	% Dosis/g $\bar{x} = \pm \sigma$							
		Muskel	Blut	Lunge	Leber	Niere	Nebenniere	Herz	Milz
0.5 h	5.2	0.164 ± 0.082	2.908 ± 0.322	16.611 ± 3.843	2.179 ± 0.186	0.903 ± 0.138	2.635 ± 0.548	0.939 ± 0.465	4.148 ± 0.859
	0.08	0.104 ± 0.004	2.087 ± 0.193	2.336 ± 0.057	2.699 ± 0.171	0.685 ± 0.128	1.588 ± 0.165	0.561 ± 0.053	3.394 ± 0.944
1 h	3.2	0.110 ± 0.016	2.325 ± 0.201	11.997 ± 0.293	3.046 ± 0.224	0.934 ± 0.090	2.552 ± 0.216	0.756 ± 0.112	5.217 ± 0.578
	0.07	0.125 ± 0.034	1.626 ± 0.416	2.721 ± 0.568	3.255 ± 0.302	0.810 ± 0.158	1.922 ± 0.286	0.623 ± 0.169	4.167 ± 0.905
4 h	3.0	0.077 ± 0.006	1.305 ± 0.179	10.151 ± 2.816	1.660 ± 0.297	0.815 ± 0.056	2.608 ± 0.320	0.474 ± 0.037	6.830 ± 0.898
	0.05	0.158 ± 0.043	0.930 ± 0.120	3.736 ± 0.410	2.742 ± 0.335	1.070 ± 0.038	3.530 ± 0.174	0.598 ± 0.088	7.746 ± 1.337
10 h	5.07	0.118 ± 0.016	0.419 ± 0.048	10.750 ± 4.219	1.683 ± 0.108	0.811 ± 0.127	2.627 ± 0.010	0.451 ± 0.082	6.479 ± 1.172
24 h	4.6	0.156 ± 0.016	0.152 ± 0.004	6.856 ± 0.621	2.168 ± 0.075	0.920 ± 0.065	4.035 ± 0.122	0.458 ± 0.002	8.847 ± 0.199
	0.05	0.185 ± 0.031	0.088 ± 0.025	3.180 ± 0.828	3.660 ± 0.734	1.131 ± 0.262	4.618 ± 0.284	0.674 ± 0.123	6.333 ± 0.855
40 h	5.92	0.095 ± 0.011	0.028 ± 0.002	6.713 ± 0.052	1.742 ± 0.392	0.710 ± 0.088	2.390 ± 0.006	0.306 ± 0.034	5.415 ± 0.032

–2 h), so bleiben die Werte der Organverteilung unverändert, wie in Tab. 1.

Alle Organe verlieren in dem gemessenen Zeitbereich Radioaktivität, erstaunlicherweise nicht die Milz. Möglicherweise beruht der Aktivitätsanstieg in der Milz auf einem Substanztransfer durch absterbende Erythrozyten, die in der Milz akkumuliert werden. Für diese Vermutung spricht auch das Verteilungsverhältnis von **3*** zwischen Plasma und Blutzellen. In Vollblut von Ratten erhält man (Herzpunktion) ein Verteilungsverhältnis von 40:1 zwischen Erythrozyten und plättchenreichem Plasma. Es gibt hier jedoch eine deutliche Speziesabhängigkeit: In Humanblut (in vitro) betrug die Verteilung zwischen Erythrozyten und plättchenreichem Plasma 2:1. Nach Hämolyse der Erythrozyten zeigte sich, daß ⅓ der von den Erythrozyten aufgenommenen Radioaktivität an der Erythrozyten-Membran gebunden ist.

Verteilung von ***3**** *nach oraler Applikation*

Für die Anwendung von Oligoaminen zur Beeinflussung der Blutgerinnung ist die Frage ihrer Blutkonzentration entscheidend. Insbesondere interessiert dabei die Frage, ob biologisch aktive Amine auch nach oraler Applikation eine gerinnungsphysiologisch effektive Konzentration im Blut erreichen. Daher wurden entspr. Resorptionsstudien mit radioaktivem **3*** bei Ratten auch nach oraler Gabe durchgeführt. Tab. 2 zeigt einen entspr. Vergleich der Organ-Konzentration. Danach wird aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit und des hohen Molekulargewichtes (MG = 1071) die Verbindung schlecht resorbiert, obwohl der Verteilungs-Koeffizient zwischen Octanol und Wasser mit log p = 2.1 bei pH 7.4 günstig liegt. Angesichts der geringen Resorption ist auch die Blutkonzentration sehr gering. Unter etwa vergleichbaren Bedingungen wird nach oraler Applikation in das Blut nur ca. 0.6 % der Menge aufgenommen, die man nach i. v. Gabe erreicht.

Die vorgestellten Modell-Versuche machen deutlich, daß eine Weiterentwicklung der Oligoamine darin bestehen muß, ihre Resorptionsquote nach oraler Gabe zu verbessern. Über entsprechende Versuche werden wir an anderer Stelle berichten.

Tab. 2: Organ-Verteilung von **3*** nach i.v. und oraler Applikation bei Ratten (t = 4 h)

Applikation (Dosis)	% Dosis/Gesamtorgan					gemessene Σ Organe
	Muskel	Blut	Lunge	Leber	Niere	
i.v. (n=3) 3 µmol/kg	7.4	19.6	8.9	17.2	0.84	53.9
oral (n=4) 11 µmol/kg	0.39	0.12	0.01	0.059	0.018	0.60
i.v./oral	19	163	890	292	47	90.3

Experimenteller Teil

a) Chemische und radiochemische Synthesen

Geräte: Schmelzpunkte: Linström (unkorr.). – Elementaranalysen: Perkin-Elmer-Elementaranalysator 240B. – IR-Spektren: Perkin-Elmer-Spektralphotometer 297. – ^{1}H-NMR-Spektren: Bruker WM 250 und WP 60. – Massenspektren: Finnigan-MAT CH 7A (70 eV), CH-5D (80 eV). – Dünnschichtchromatographie: Merck-Glasplatten mit Kieselgel 60F 254. – γ-Meßplatz (Ganztierzähler) und automatischer – Probenwechsler „Gammascint" der Fa. Berthold. – Berthold-Dünnschichtscanner LB 2722-2.

N,N',N''-Tris-[4-(4-methoxyphenyl)-butyl]-benzol-1,3,5-triessigsäureamid **(1)**

4.5 g (17.8 mmol) 1,3,5-Benzoltriessigsäure werden mit 20.0 g Thionylchlorid 4 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Entfernen des $SOCl_2$-Überschusses erhält man 5.5 g (18 mmol) braunes Säurechlorid. 9.6 g (53 mmol)4-(4-Methoxyphenyl)-butylamin werden in 100 ml trockenem Benzol gelöst und nach Zugabe von 10 g wasserfreiem Natriumcarbonat kräftig gerührt. Dazu wird langsam die Lösung von 5.5 g des Säurechlorids in 200 ml Benzol getropft. Man gibt weitere 10 g wasserfreies Na_2CO_3 hinzu und erhitzt 12 h unter Rückfluß. Das Benzol wird abgezogen, der Rückstand wird mit Wasser erwärmt und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroform-Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, abdestilliert und der Rückstand aus EtOH umkristallisiert. – Farblose Kristalle (EtOH), Schmp. 182 °C, Ausb. 60 % – $C_{45}H_{57}N_3O_6$ (735.3) Ber. C 73.4 H 7.80 N 5.7 Gef. C 73.2 H 7.83 N 5.6. – IR (KBr): 3290; 2920; 2850; 1640; 1610; 1540; 1510; 1460; 1340; 1300; 1250; 1175; 1110; 1030; 820 cm^{-1}. – 60 MHz-^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 7.0 („d", 6H, H-2, H-6, aromat.), 6.7 („d", 6H, H-3, H-5 aromat.), 6.95 (s, 3H, aromat.), 5.85 (bs, 3H, austauschb. NH), 3.7 (s, 9H, OCH_3), 3.4 (s, 6H, Ar-C$\underline{H}_2$-CO), 3.15 (m, 6H, NH-C$\underline{H}_2$), 2.5 (m, 6H, Ph-C$\underline{H}_2$), 1.5 (m, 12H, aliphat.). – MS (100 °C): m/z = 735 (14 %, $M^{+\cdot}$), 530 (17), 206 (40), 180 (20), 163 (30), 162 (27), 161 (24), 160 (19), 134 (23), 121 (100), 91 (20).

N,N',N''-Tris-[4-(4-methoxyphenyl)-butyl]-benzol-1,3,5-triethanamin-trihydrochlorid **(2)**

4.0 g (5.4 mmol) **1** werden in 150 ml H_2O-freiem Ether suspendiert. Anschließend gibt man vorsichtig 110 mmol $LiAlH_4$ hinzu und erhitzt 6 h unter Rückfluß. Unter Eiskühlung wird der Überschuß des Reduktionsmittels durch tropfenweise Wasserzugabe zerstört. Danach wird filtriert, der Rückstand dreimal mit Ether gewaschen, die Lösung über Na_2SO_4 getrocknet und mit etherischer HCl das Hydrochlorid gefällt. – Farbloses Pulver (EtOH), Schmp. 314 °C (Zers.), Ausb. 35 % – $C_{45}H_{63}N_3O_3 \cdot 3HCl$ (802.7) Ber. C 67.2 H 8.28 N 5.2 Gef. C 67.2 H 8.15 N 5.2. – IR (KBr): 2930; 2770; 2440; 1610; 1580; 1510; 1450; 1300; 1245; 1175; 1030; 820 cm^{-1}. – 250 MHz-^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 8.8 (bs, 6H, $\overset{+}{N}H_2$), 7.55 (s, 3H, aromat.), 7.05 („d", J = 8 Hz, 6H, aromat., H-2, H-6), 6.8 („d", J = 8 Hz, 6H, aromat., H-3, H-5), 3.8 (s, 9H, OCH_3), 3.29 (m, 6H, Ar-CH_2-C$\underline{H}_2$-$\overset{+}{N}H_2$), 3.19 (m, 6H, $\overset{+}{N}H_2$-C$\underline{H}_2$-CH_2-CH_2), 2.95 (m, 6H, Ar-C$\underline{H}_2$-CH_2-$\overset{+}{N}H_2$), 2.58 (t, J = 8 Hz, 6H, Ph-C$\underline{H}_2$-CH_2-CH_2), 1.9 (m, 6H, aliphat.), 1.6 (m, 6H, aliphat.). – MS (250 °C): m/z = 693 (2 %, $M^{+\cdot}$), 503 (70), 502 (98), 501 (30), 500 (53), 498 (19), 311 (63), 310 (21), 193 (30), 192 (100), 190 (35), 161 (93), 121 (98), 91 (29), 44 (60).

N,N',N''-Tris-[4-(3-iod-4-methoxyphenyl)-butyl]-benzol-1,3,5-triethanamin-trihydrochlorid **(3)**

0.5 g (0.62 mmol) **2** werden in 20 ml Eisessig gelöst und auf 90 ° erhitzt. 0.7 g ICl (4.3 mmol) in 3 ml Eisessig werden hinzugefügt. Man erhitzt 1 h auf 100 °C und läßt während dieser Zeit 40 ml H_2O zutropfen. Man erwärmt weitere 15 min auf 120 °C, kühlt auf 10 °C ab und entfärbt mit Natriumthiosulfat-Lösung. Die Reaktionsmischung wird alkalisiert und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformphase wird über Natriumsulfat getrocknet und abdestilliert. Der Rückstand wird über Nacht mit 1 l Ether extrahiert.Man engt ein und fällt mit etherischer HCl das Hydrochlorid: Hellbraune Kristalle (EtOH/Ether), Schmp. 244 °C (Zers., Subl.), Ausb. 25 % – $C_{45}H_{60}I_3N_3O_3 \cdot 3HCl$ (1180.4) Ber. C 45.8 H 5.37 N 3.6 I 32.3 Gef. C 45.7 H 5.51 N 3.7 I 32.1. – IR (KBr): 3400; 2930; 2750; 2440; 1595; 1490; 1450; 1280; 1250; 1045; 1015; 810 cm^{-1}. – 250 MHz-^{1}H-NMR ([D_6]DMSO): δ (ppm) = 9.1 (bs, 6H, austauschb., $\overset{+}{N}H_2$), 7.65 (d, J = 2 Hz, 3H, H-2), 7.2 (dd, J = 8/2 Hz, 3H, H-6), 7.1 (s, 3H, aromat.), 6.9 (d, J = 8 Hz, 3H, H-5), 3.8 (s, 9H, OCH_3), 3.15 (m, 6H, Ar-CH_2-C$\underline{H}_2$-$\overset{+}{N}H_2$), 2.92 (m, 12H, Ar-C$\underline{H}_2$-CH_2-$\overset{+}{N}H_2$-C$\underline{H}_2$), 2.5 (Ph-CH_2 und Lösungsmittel), 1.6 (m, 12H; aliphat.). – MS (230 °C): m/z = 1071 (1 %, $M^{+\cdot}$), 466 (38), 437 (23), 332 (37), 318 (19), 305 (25), 260 (80), 247 (100), 245 (22), 178 (54), 162 (35), 161 (60), 160 (24), 134 (26), 128 (33), 121 (23), 105 (32), 91 (52), 90 (67), 77 (76), 58 (43).

Markierung von **3** *mit* ^{131}I

4 mg (4.6 µmol) **2** werden in eine Duran-Glasampulle (Durchmesser 0.8 cm, Länge 2–3 cm) eingewogen und mit 100 µl Eisessig gelöst. Die gewünschte Radioaktivität (ca. 7.5 MBq) wird in Form von 200 µl phosphatgepufferter $Na^{131}I$-Lösung (37 MBq/ml) zugesetzt und mit 100 µl Eisessig in die Ampulle gespült. Um die Kontaminationsgefahr zu verringern, wird der Ampulleninhalt in flüssigem N_2 eingefroren. Danach erst werden 6 mg (37 µmol) Iodchlorid mit weiteren 100 µl Eisessig in die Ampulle gespült. Nach erneutem Einfrieren wird die Ampulle unter Vakuum zugeschmolzen und 2 h bei 110 °C im Ölbad erhitzt. Die Ampulle wird wieder eingefroren, und nach dem Öffnen wird der Inhalt in eine wäßrige, alkalische Natriumthiosulfat-Lösung gegeben. Es wird mehrmals mit Chloroform extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet, eingeengt und mit unmarkiertem **2** und **3** als Referenzsubstanzen chromatographiert. Nach zweimaliger Entwicklung in Ether/Diethylamin 9 + 1 (Rf = 0.23) wird das Reaktionsprodukt anhand der Referenzsubstanz identifiziert, abgeschabt und eluiert. Ein Aliquot des Eluats wird zur Bestätigung der Reinheit erneut chromatographiert und die spezifische Aktivität bestimmt – Ausb. 8 %, Spez. Akt. 0.61 MBq/µmol (= 16 µCi/µmol).

b) Pharmakologischer Teil

Geräte: Sonicator Cell Disruptor W 185 F (Heat Systems Ultrasonic). – Quick-Test-Gerät „Coag-a-pet" (Fa. Goedicke). – Eppendorf-Zentrifuge 5412 (15000 U/min). – Heidolph-Zentrifuge. – Thermodual (Liebisch). – Aggregometer elvi 840. – „Omni Scribe Recorder" (Houston Instruments).

Chemikalien und Reagentien: Tris-Puffer: 6.1 g Tris-(hydroxymethyl)-methanamin und 0.7 g HCl mit Aqua dest. lösen und auf 800 ml auffüllen, 0.2 % Tween 80 zusetzen, auf pH 7.4 einstellen und auf 1000 ml ergänzen. – Collagen (Hormon Chemie) – Simplastin® (Fa. Goedicke). – Die verwendeten Chemikalien entsprachen den Reinheitsanforderungen der Ph. Eur. oder dem Reinheitsgrad p.a. $Na^{131}I$-Lösung: Fa. Amersham-Buchler (Braunschweig).

Tiere: Männliche Albinoratten vom Typ Wistar, 170–260 g, 12–15 Wochen alt, geschlechtsreif (Fa. Hagemann). Standardfutter Altromin®, Wasser ad libitum.

Die Messung der Thrombocytenaggregation sowie der Thromboplastinzeit wurden wie üblich durchgeführt[4, 5].

Bestimmung der Organverteilung[6]

Nach Applikation der Testsubstanzen wurden die Ratten in üblichen Tierkäfigen bei ausreichend Wasser und Futter gehalten. Zum gewünschten Zeitpunkt wurden sie durch Ethernarkose getötet und die betreffenden Organe und Gewebe sofort entnommen. Die ausgebluteten und auf Filterpapier kurz abgetupften Organe wurden mit der Pinzette in tarierte Plastikgläschen der Fa. Sarstedt gegeben und gewogen. Anschließend wurde die

Radioaktivität im Gamma-Probenwechsler der Fa. Berthold gemessen. Alle Messungen sind mit einem Rechnerprogramm ausgewertet und entsprechend der Halbwertszeit von ^{131}I (8 d) korrigiert worden.

Aufbewahrung und Applikation der Injektionslösungen

Die radiomarkierte Verbindung wurde in Chloroform gelöst aufbewahrt. Vor der Anwendung wurde die Reinheit und Identität jeweils durch DC eines Aliquots geprüft. Das Chloroform wurde dann unter N_2 entfernt und das zur Injektion verwendete Lösungsmittel zugesetzt. – Als Lösungsmittel wurde bei der parenteralen Applikation ein EtOH/H_2O-Gemisch (1+1; 100 µl) eingesetzt. Bei der Gabe per os wurde Propylenglycol verwendet.
Applikationsarten: intravenös: Die Substanzlösung wurde den Ratten nach Etherbetäubung in die Schwanzvene injiziert. Das Volumen betrug maximal 100 µl pro Ratte. Zur Bestimmung der applizierten Dosis wurde die in der Injektionsspritze und ggf. im Schwanz verbliebene Radioaktivität berücksichtigt.
oral: Die Substanzen wurden in 1 ml Propylenglycol gelöst und den Tieren mit einer Schlundsonde in den Magen appliziert. Die Ratten waren durch Entzug der festen Nahrung 12 h vorher nüchtern gestellt worden.

Verteilung und Thrombocytenaggregationsbestimmung in Rattenblut ex vivo

4 Sprague-Dawley-Ratten (männl.) bekamen **3*** in einer Dosierung von 6.21 µmol/kg intravenös verabreicht. Nach 30 min wurde jedem Tier 1 ml Blut unter Vorlage von 0.1 ml 0.05 molarer Natriumcitrat-Lösung durch Herzpunktion abgenommen. Die Proben wurden gewogen, die Radioaktivität wurde gemessen. Anschließend wurde 20 min bei 1100 U/min zentrifugiert. Das PRP und die Erythrocyten wurden getrennt, gewogen und die Radioaktivitäten bestimmt. Nach Inkubation bei 20 °C und nach Induktion durch 4 µl einer konzentrierten Collagen-Suspension (1 mg/ml) wurde mit dem PRP der Born-Test durchgeführt.

*Verteilung und Thrombocytenaggregationsbestimmung von **3*** in Humanblut*

Mittels Ultraschall (Sonicator Cell Disruptor W 185 F) wurden 2.97 µmol **3** in 1.7 ml Tris-Puffer gelöst und mit 0.063 µmol **3*** versetzt. 16 Humancitratblutproben (1 ml) wurden mit je 100 µl dieser Lösung inkubiert. Bei acht Proben betrug die Inkubationszeit 10 min, bei weiteren acht 35 min. Nach Zentrifugation (1100 U/min, 20 min) wurden PRP und Erythrocyten getrennt, gewogen und die Radioaktivitäten der Fraktionen gemessen. Anschließend wurde die Thrombocytenaggregation im *Born*-Test[7] bestimmt. Vier Leerwerte dienten der Kontrolle.

*Bestimmung der Bindung von **3*** an Erythrocyten in Humanblut*

Sechs Proben zu 0.5 ml Humancitratblut wurden mit je 50 µl einer Lösung der radiomarkierten Substanzen in Tris-Puffer versetzt. Aus der Radioaktivitätsmessung wurde die Konzentration bestimmt. Nach 15 min wurde 20 min bei 1100 U/min zentrifugiert, das gesamte plättchenreiche Plasma abgehoben und gemessen. Die Erythrocyten wurden anschließend zweimal mit 0.5 ml Tris-Puffer vermischt und geschüttelt. Nach jeweils 20 min Zentrifugation in einer Eppendorf-Zentrifuge (1500 U/min) wurden die abpipettierten Pufferphasen gemessen. Die Erythrocyten wurden durch Hämolyse mit 0.5 ml destilliertem Wasser zerstört. Nach 40 min Zentrifugation bei 1500 U/min wurden Hämolysat und Erythrocytenmembranen separiert und die Radioaktivitäten bestimmt.

Bestimmung der Verteilungskoeffizienten

Zur Messung wurde Octanol verwendet, das mit dem entspr. Puffer gesättigt war. Die Puffer wurden nach den Angaben für Standard-Puffer-Lösungen der Deutschen Normen (DIN 19266) hergestellt. Es wurden die Standard-Puffer A, E und F mit pH-Werten von 1.679; 7.413 und 9.180 eingesetzt.
Das Verteilungssystem bestand jeweils aus 2 ml Octanol und 2 ml Puffer. Konzentration von **3***: 3.5 nmol/4 ml.
Die Octanol-Puffersysteme mit **3*** wurden 15 min geschüttelt und anschließend 15 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Aus jeder der getrennten Phasen wurden mit geeichten Pipetten 5 Proben zu 100 µl entnommen. Die Radioaktivität der Proben wurden gemessen und der Verteilungskoeffizient aus den gemittelten Werten bestimmt.

Literatur

1 K. Rehse, U. Lükens und G. Claus, Arch. Pharm. (Weinheim) *320*, 1233 (1987).
2 K. Rehse, U. Lükens, S. Leißring, V. Schein und A. Kesselhut, Thromb. Haemostasis *58*, 174 (1987).
3 Dissertation V. Schein bzw. A. Kesselhut, in Vorbereitung.
4 K. Rehse und U. Siemann, Arch. Pharm. (Weinheim) *314*, 627 (1981).
5 K. Rehse und U. Emisch, Arch. Pharm. (Weinheim) *315*, 1020 (1982).
6 M. Wenzel, G. Schachschneider, M. Schneider und R. Herken, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. *363*, 693 (1982).
7 G. V. R. Born, Nature *194*, 927 (1962).

[Ph 467]