Synthese, Organ-Verteilung und cytostatische Wirkung der N-Methyl-N- β -chloräthyl-hydrazone von Metallocen-aldehyden

Synthesis, Biochemistry and Cytostatic Effects of N-Methyl-N- β -chloroethyl-hydrazones of Metallocene Aldehydes

M. Wenzel, M. Schneider und E. Liss

Pharmazeutisches Institut und Institut für Klinische Chemie der Freien Universität Berlin

Z. Naturforsch. **34 c**, 670 – 676 (1979); eingegangen am 19. März/29. Juni 1979

Cytostatica, Metallocenes, Chlorethyl-Hydrazones, Organ-Affinity, Ruthenocen

Since the N-Methyl-N- β -chloroethylhydrazone of benzaldehyde has cytostatic effects, the corresponding hydrazones of ferrocene- and ruthenocenaldehyde were synthesized. The ruthenocenaldehyde hydrazone was labelled with ^{103}Ru and its excretion, metabolism and organ-distribution in mice and rats were measured. The hydrazone was metabolized to one main metabolite, which was rapidly excreted in the bile. No evidence for the liberation of ruthenium ions was found. The hydrazone had a very high affinity to lung tissue, a ^{103}Ru -concentration ratio lung/muscle of 600 : 1 was found, but only moderate affinities to liver, kidney and gut. The affinity for thymus, spleen and tumor was low. Both metallocenaldehyde hydrazones showed cytostatic effects, similar to that of benzaldehyde hydrazone.

Einleitung

Das N-Methyl-N- β -chloräthyl-hydraxon des Benzaldehyds zeigt eine deutliche cytostatische Wirkung [1, 2]. Über die Verteilung dieser Hydrazone im Organismus ist bisher nichts bekannt. Um etwas über Exkretion und Organ-Verteilung dieser Verbindungsklasse zu erfahren, haben wir die analogen Metallocenaldehyd-Hydrazone hergestellt, sie mit dem Gammastrahler ^{103}Ru markiert [3] und anschließend einige ihrer biochemischen Eigenschaften untersucht. Wir gehen dabei von der Annahme aus, daß das biochemische Verhalten der Hydrazone mehr von ihrer identischen Seitenkette bestimmt wird als von den aromatischen Grundkörpern Benzol bzw. Ferrocen oder Ruthenocen. Mit dieser Arbeit werden gleichzeitig unsere Untersuchungen über die Biochemie der Metallocene [4 – 7] erweitert.

Ergebnisse

Exkretion und Metabolismus

Das mit ^{103}Ru markierte Hydraxon des Ruthenocen-aldehyds wurde Mäusen appliziert und die Exkretion durch Messung der Gesamt-Aktivität der Versuchstiere nach verschiedenen Zeiten bestimmt. Nach i. v.-Injektion beträgt die Radioaktivitäts-Aus-

scheidung innerhalb von 24 Stunden etwa 85%. Dagegen wird nach i. v.-Injektion von $^{103}\text{RuCl}_3$ in diesem Zeitraum die ^{103}Ru -Aktivität erst zu 10% eliminiert [4, 6]. Dieses Ergebnis spricht gegen eine Freisetzung von Ru-Ionen aus dem Ruthenocen-Derivat und für die Stabilität des aromatischen Systems im Organismus. Dies deckt sich mit der nachgewiesenen Stabilität der Metallocen-Struktur *in vivo* bei anderen Metallocen-Derivaten [7, 8, 8 a].

Da bei Mäusen die Gewinnung von Körperflüssigkeiten relativ schwierig und unergiebig ist, wurden zur Isolierung von Metaboliten des Ruthenocen-aldehyd-Hydrazons bei Ratten Gallen fisteln angelegt und die biläre Exkretion untersucht. Wie Tab. I zeigt, wird nach i. v.-Injektion innerhalb von 2 Stunden bereits die Hälfte der injizierten Dosis via Gallen fistel ausgeschieden. Nach oraler Gabe war die prozentuale Ausscheidung geringer.

Durch Dünnschicht-Chromatographie in einem polaren System (vergl. Abb. 1) ließ sich nachweisen, daß 77% der Radioaktivität der Galle in einem Metaboliten (R_F 0,41) enthalten waren. Ruthenocen-aldehyd-Hydraxon (R_F 0,78) war nur noch zu 7% vorhanden. Die restliche Radioaktivität (16%) verteilte sich auf 3 weitere Maxima. Vergl. Abb. 1. Auch die Chromatographie mit einem lipophilen Laufmittel führt zu dem Ergebnis, daß ca. 95% der in der Galle vorliegenden Radioaktivität *nicht* das Ausgangsprodukt darstellen. Ru-Ionen ließen sich nicht nachweisen, sie hätten in den verwendeten Laufmitteln am Start liegen müssen.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. M. Wenzel, Pharmazeut. Institut der FU Berlin, Biol. Chem. Abt., D-1000 Berlin-Dahlem.

0341-0382/79/0900-0670 \$ 01.00/0

Tabelle I. Gewinnung von ^{103}Ru -markierten Metaboliten bei Ratten durch biläre Exkretion nach Applikation von ^{103}Ru -Ruthenocenaldehyd-Hydrazon. Wistar-Ratten (♂) von 250 g Gewicht erhielten ^{103}Ru -Ruthenocenaldehyd-Hydrazon (gemischt mit Ferrocenalddehyd-Hydrazon, gemäß Relation Tab. III, Versuch a) in Propylenglykol. Die Galle wurde durch eine Gallenfistel in den angegebenen Zeiträumen gesammelt. Zur Auftrennung der Metaboliten vgl. Abb. 1. Die Zahlen geben den Mittelwert von 2 Versuchen an.

Dosis [$\mu\text{mol/kg}$]	Exkretion in % der applizierten Dosis						Summe
	0 – 1 h	1 – 2 h	2 – 3 h	3 – 4 h	4 – 5 h	5 – 6 h	
700 (oral) (150 μl Lösung)	0,7	1,2	1,4	1,7	1,6	2,1	= 8,7 (0 – 6 h)
55 (i. v.) (100 μl Lösung)	36,5	14,3	5,7	3	–	–	= 59,5 (0 – 4 h)

Organ-Verteilung

Untersucht man die Organ-Verteilung bei Ratten durch Autoradiographie, so findet man neben der Markierung des Darminhalts und der Leber eine extrem hohe Anreicherung in der Lunge. Bei Einzelmessungen verschiedener Organe (Tab. II) erhält man 24 h nach i. v.-Injektion von ^{103}Ru -Ruthenocenaldehyd-Hydrazon Quotienten der ^{103}Ru -Konzentrationen Lunge/Muskel bei Ratten von 270 : 1 und bei Mäusen sogar 580 : 1.

In Tab. II sind die Radioaktivitäts-Konzentrationen nicht in % der injizierten Dosis/g Organ angegeben worden, sondern in % der injizierten Dosis in der Organmenge, die 1% des Körpergewichtes entspricht (% inj. Dosis/% KG). Mit dieser Berechnung kann man die Organ-Verteilung auch bei verschiedenen großen Tieren (z. B. Ratte und Maus) vergleichen [8 b].

Aus Tab. II ist ferner ersichtlich, daß neben der Lunge nur Leber und Niere erhebliche Radioaktivi-

täts-Konzentrationen aufweisen. Die Konzentration in Ratten-Nieren ist um den Faktor 5 geringer als in den Nieren von Mäusen.

Wie Abb. 2 zeigt, ist die herausragende Radioaktivitäts-Konzentration in der Lunge bereits zum frühesten Meßpunkt (15 min nach i. v.-Injektion) nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt erhält die gesamte Lunge 7,5% der injizierten Dosis.

Niere, Leber und Dünndarm zeigen zwar auch eine gewisse Affinität zu dieser Verbindung, geben sie jedoch relativ schnell wieder ab (Abb. 2). Im auffälligen Gegensatz zur Thymus- bzw. Milz-Affinität anderer Metallocene [5, 7] steht die geringe Anreicherung des Ruthenocenaldehydhydrazons in Thymus und Milz.

Untersucht man die Tumor-Affinität des Ruthenocenaldehyd-Hydrazons bei Mäusen mit einem soliden Ehrlich-Carcinom, so findet man keine auffällige Radioaktivitäts-Anreicherung im Tumorgewebe (nach 24 h ca. 0,1% der Dosis/% Körpergewicht).

Tabelle II. Organverteilung von ^{103}Ru -Ruthenocenaldehyd-Hydrazon. Je 7 CF 1 Mäusen (♀) wurde das Hydrazon (Mischung aus Ferrocen-Derivat und ^{103}Ru -Ruthenocen-Derivat, gemäß Tab. III, Versuch a) in Propylenglykol (50 μl je Maus) verabreicht. 24 h nach Applikation wurden die Tiere getötet, die Organe entnommen, anschließend Gewicht und Radioaktivität bestimmt und daraus die ^{103}Ru -Konzentration im Gewebe berechnet. Die Zahlen geben die Mittelwerte an (Lunge $\bar{x} \pm \delta$)

Substanz	Dosis [$\mu\text{mol/kg}$]	Injektions- art	^{103}Ru -Konz. [% inj. Dosis/% Körpergewicht]						Quotient Lunge/Muskel
			Muskel	Blut	Lunge	Leber	Niere	Milz	
Hydrazon	6,1	i. v.	0,01	0,03	$4,4 \pm 0,3$	1,12	1,34	0,01	439
	7,3	i. p.	0,01	0,03	$1,9 \pm 0,5$	1,94	1,53	0,04	188
	2,9	oral	0,004	0,01	$0,04 \pm 0,006$	0,81	1,11	0,01	10
Hydrazon- ^a Metabolit	2,4	i. v.	0,01	0,07	$0,15 \pm 0,07$	0,55	2,54	0,01	17
Hydrazon ^b	0,7	i. v.	0,003	0,001	0,81	0,46	0,26	0,02	269

^a Metabolit ($R_F 0,41$) in Abb. 1, Werte 6 h post inj.

^b Wistar-Ratten (♂, 250 g, $n=2$).

Spezielle Aspekte der Lungen-Affinität

Zur hohen ^{103}Ru -Konzentration in der Lunge nach Gabe von $[^{103}\text{Ru}]$ -Ruthenocenaldehyd-Hydrazon ist folgendes zu sagen:

1. Eine denkbare Ursache für die Lungen-Affinität könnte das Ausfallen der i. v. injizierten Substanz

Abb. 1. Radio-Dünnschicht-Chromatogramm von Nativgalle nach i. v.-Injektion von $[^{103}\text{Ru}]$ -Rc-Hydrazon. 50 μl Nativgalle (0–1 Std. nach Injektion, vergl. Tab. I) mit $4 \times 10^{-3} \mu\text{Ci } ^{103}\text{Ru}$ wurden auf Merck-Kieselgel-Platten chromatographiert. Fließmittel: *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (4/1/1). Direkt-Messung mit dem „Dünnschicht-Scanner“ (Fa. Berthold, Wildbad). Radioakt. Maximum mit R_F 0,78 entspricht Ruthenocenaldehyd-Hydrazon; gemäß Kontrollversuch bleiben Ru-Ionen am Start. R_F -Wert des Metaboliten = 0,41.

Abb. 2. Zeitabhängigkeit der ^{103}Ru -Konzentration im Gewebe nach Gabe von $[^{103}\text{Ru}]$ -Ruthenocenaldehyd-Hydrazon. Zur Methodik vergl. Text und Legende von Tab. II. Es wurde ein Hydrazon-Gemisch gemäß Versuch a) in Tab. III injiziert. Dosis: 4 μmol Hydrazon/kg (i. v.), Mittelwerte von 7 Mäusen. Ordinate: ^{103}Ru -Konzentration im Gewebe in % der inj. Dosis/1% des Körpergewichtes.

im Blut sein mit anschließendem Transport der Mikropartikel in das Kapillargebiet der Lunge. Da aber eine Serum-Lösung des Hydrazons, die vor der Injektion durch einen Millipore-Filter ($\varnothing$ 0,45 μm) filtriert worden war, nach i. v.-Injektion die gleiche Lungen-Affinität zeigte, ist die Möglichkeit von Mikroembolien auszuschließen.

2. Die ^{103}Ru -Anreicherung in der Lunge wird vermutlich von der unmetabolierten Substanz verursacht. Für diese Annahme spricht die unmittelbar nach der i. v.-Injektion nachweisbare Lungenaffinität sowie die Tatsache, daß der aus der Gallenflüssigkeit isolierte Haupt-Metabolit (Abb. 1) keine Anreicherung in der Lunge zeigt (Tab. II).

Appliziert man das Hydrazon oral, so beobachtet man ebenfalls keine Lungenaffinität (Tab. II). Das aus dem Darm resorbierte Hydrazon passiert hierbei zunächst die Leber und wird dort metabolisiert. Damit können nach oraler Gabe die übrigen Körper-Organen nur von Metaboliten erreicht werden.

3. Bei der Herstellung von radioaktiven Ruthenocen-Derivaten durch Zentralatom-Austausch entsteht primär eine Mischung von $[^{103}\text{Ru}]$ -Ruthenocenvat mit einem Überschuß von nicht markiertem Ferrocen-Derivat (vergl. Methodik). Es stellte sich die Frage, ob die Organverteilung und speziell die hohe Lungenaffinität der $[^{103}\text{Ru}]$ -Verbindung durch die Anwesenheit eines großen Überschusses an Ferrocen-Verbindung beeinflusst wird. Dies ist nicht der Fall, wie die Tab. III zeigt. Bei Verabreichung der isolierten $[^{103}\text{Ru}]$ -Verbindung findet man das gleiche Verteilungsmuster wie bei der Verabreichung der Mischung, die ca. 300mal mehr Ferrocen-Verbindung als $[^{103}\text{Ru}]$ -Verbindung enthält. Dieses Ergebnis hat eine generelle Bedeutung für mögliche Anwendungen ^{103}Ru - bzw. ^{97}Ru -markierter Ruthenocene in der Nuklearmedizin, die durch den Herstellungsprozeß noch Ferrocen-Anteile enthalten.

Cytostatische Wirksamkeit

Mit Kulturen von Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen *in vitro* wurde die cytostatische Wirksamkeit der Metallocen-Hydrazon-Verbindungen untersucht. Zum Vergleich wurde das Hydrazon des Benzaldehyds und eine weitere Metallocen-Verbindung (Ferrocen- bzw. Ruthenocen-phenyl-propenon [6] in diese Untersuchungen mit einbezogen. Die in Tab. IV dargestellten Ergebnisse zeigen, daß das Ferrocenaldehyd-Hydrazon sowohl bei 10^{-5} als auch bei

Tabelle III. Vergleich der Organ-Verteilung von Ferrocen-haltigem bzw. Ferrocen-freiem [^{103}Ru]-Ruthenocenaldehyd-Hydrazon. Je 7 CF1 Mäusen (♀) wurde eine Hydrazon-Lösung (in 50 μl Propylenglykol, je Maus ca. 0,03 μCi) i. v. infiziert: a) Mischung aus nicht radioaktivem Ferrocenaldehyd-Hydrazon und [^{103}Ru]-Ruthenocenaldehyd-Hydrazon. b) [^{103}Ru]-Hydrazon (spez. Akt. von 100 μCi $^{103}\text{Ru}/\mu\text{mol}$). 24 h nach Injektion wurden die Tiere getötet, die Organe entnommen, Gewicht und Radioaktivität bestimmt und daraus die ^{103}Ru -Konzentration im Gewebe berechnet. Die Zahlen geben die Mittelwerte an (Lunge ± 8). Fc = Ferrocen-, Rc = Ruthenocen-Verbindung.

Applikation von	Dosis [$\mu\text{mol/kg}$]		^{103}Ru -Konz. [% inj. Dosis/1% des Körpergewichtes]							Quotient Lunge/Muskel
	Fc	^{103}Ru -Rc	Muskel	Blut	Lunge	Leber	Niere	Milz	Thymus	
a) <i>mit</i> Fc-Derivat	6,1	0,007	0,01	0,03	$4,4 \pm 0,3$	1,12	1,34	0,01	0,02	439
b) <i>ohne</i> Fc-Derivate	—	0,019	0,01	0,03	$5,8 \pm 0,9$	1,03	1,17	0,03	0,03	580

Substanzen	<i>n</i>	Konzentration [mol/l]	
		10×10^{-6}	5×10^{-6}
Fc-CH=N-N(CH ₃)C ₂ H ₄ Cl	4	35 ± 6	71 ± 4
Rc-CH=N-N(CH ₃)C ₂ H ₄ Cl	4	83 ± 2	93 ± 6
Ph-CH=N-N(CH ₃)C ₂ H ₄ Cl	4	88 ± 4	101 ± 8
Fc-CH=CH-CO-Ph	3	25 ± 9	34 ± 13
Rc-CH=CH-CO-Ph	3	27 ± 10	78 ± 12

Tabelle IV. Cytostatische Wirkung von Metallocenen *in vitro*. Die Vermehrung von Ehrlich-Carcinom-Zellen in einer Suspensionskultur wurde bei Anwesenheit der Metallocene gemessen, Inkubationszeit 3 Tage. Weitere Einzelheiten vgl. Methodik.

Mittelwerte $\pm \sigma$
 Fe = Ferrocenyl
 Rc = Ruthenocenyl
 Ph = Phenyl

5×10^{-6} mol/l eine deutlich größere cytostatische Wirksamkeit aufweist als das Benzaldehyd-Hydrazon. Ruthenocenaldehyd-Hydrazon hemmt das Wachstum der Ascites-Tumor-Zellen ebenso schwach wie das Benzaldehyd-Hydrazon. Auch bei den Phenylpropenon-Derivaten der Metallocene ist das Ferrocen-Derivat wirksamer als das Ruthenocen-Derivat.

Bei entsprechenden *in vivo* Untersuchungen mit den Ehrlich-Ascites-Carcinom bei Mäusen erwiesen sich die Hydrazone nur bei hohen Dosierungen (Gesamt-Dosis 1,5 mmol/kg) als schwach wirksam. Unterschiede zwischen Benzaldehyd-Hydrazon und Ferrocenaldehyd-Hydrazon waren nicht erkennbar.

Diskussion

Das auffallendste Ergebnis dieser Untersuchungen ist die hohe ^{103}Ru -Konzentration in der Lunge von Mäusen und Ratten nach Applikation von [^{103}Ru]-Ruthenocenaldehyd-Hydrazon. Die hohe Lungen-Affinität eines γ -Strahlers ist für die Nuklearmedizin interessant. Zur Lungen-Szintigraphie werden gegenwärtig Partikelgebundene γ -Strahler verwendet,

die nach i. v.-Injektion Mikroembolien verursachen und durch diese Fixierung die Lunge darstellbar machen. Unseres Wissens ist eine hohe Lungen-Affinität einer löslichen Substanz, die einen für die Klinik geeigneten γ -Strahler enthält, bisher nicht bekannt.

Da der aus der Gallenflüssigkeit von Ratten isolierte polare Metabolit keinerlei Lungenaffinität aufweist und auch nach oraler Gabe des Hydrazons keine nennenswerte Anreicherung in der Lunge auftritt (Tab. II), ist zu vermuten, daß die unmetabolisierte Substanz die Affinität zur Lunge besitzt.

Weder bei dem Ausscheidungs-Verhalten, noch bei der Organ-Verteilung noch bei der Dünnschicht-Chromatographie der Galle ergaben sich Anzeichen für einen Zerfall des Ruthenocen-Grundgerüsts unter Freisetzung von Ionen des Rutheniums. Dies bestätigt frühere Ergebnisse über Stabilität der Ruthenocen-Struktur im Säugetier-Organismus [7, 8 a].

Damit wird eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der hohen Lungen-Affinität unwahrscheinlich, nämlich, daß aus dem Ruthenocenaldehyd-Hydrazon primär ^{103}Ru -Ionen durch Zerfall des aromati-

schen Ringsystems im Organismus freigesetzt werden und diese Ionen sich anschließend in der Lunge anreichern. Diese Interpretation ist auch deswegen auszuschließen, weil i. v. injiziertes $^{103}\text{RuCl}_3$ sich im Organismus relativ gleichmäßig verteilt [4, 6].

Die *in vitro*-Versuche über den Einfluß der Hydrazone auf Tumorzellen ergaben eine nachweisbare cytostatische Wirkung. Diese tritt allerdings erst bei Dosierungen auf, die höher liegen als die wirksamen Dosierungen einiger bekannter cytostatisch wirksamer Substanzen. In Verbindung mit der Anreicherung des Ru-Aldehyd-Hydrazons in der Lunge wäre zu prüfen, ob speziell gegen Lungentumoren eine selektive Wirkung erreicht werden könnte.

Material und Methoden

Darstellung von Ferrocenaldehyd-*N*-methyl-*N*- β -chloräthylhydrazon

Die Synthese erfolgte analog zum entsprechenden Benzaldehyd-Hydrazon [10].

500 mg (2,3 mmol) Ferrocenaldehyd wurden mit 350 mg (2,4 mmol) *N*-Methyl-*N*- β -chloräthylhydrazin-hydrochlorid in 15 ml Methanol 3 Stunden lang auf 60 °C erwärmt. Nach dem Einengen der violett-roten Lösung wurde an einer Al_2O_3 -Säule ($\varnothing$ 1 cm, Länge 20 cm) mit CH_2Cl_2 eine orangefarbene Lösung abgetrennt. Das nach dem Eindampfen verbleibende Öl wurde mit 3 ml *n*-Hexan geschüttelt, wobei nach kurzer Zeit Kristallisation erfolgte. Der Kristallbrei wurde abgesaugt und aus Hexan umkristallisiert. Auf Kieselgelplatten (Fa. Merck) zeigte die

Substanz einen R_F -Wert von 0,58 ($\text{CHCl}_3/\text{Aceton}$ 9 : 1).

Ausbeute: 320 mg (1,05 mmol) Hydrazon = 46% d. Th. (orange Nadeln).

Fp.: 66 – 67 °C.

UV-Spektrum (in CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 300$ nm, $\epsilon = 16\,600$. $\lambda_{\text{max}} = 434$ nm, $\epsilon = 1100$.

berechnet: C = 55,3% H = 5,6% N = 9,2%

gefunden: C = 55,4% H = 5,7% N = 9,2%.

Darstellung von Ruthenocenaldehyd-*N*-Methyl-*N*- β -chloräthylhydrazon

Die Synthese erfolgte analog zur Eisenverbindung. Ausbeute: 38% d. Th. (blaßgelbe Kristalle).

Fp.: 75 – 77 °C. R_F ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Aceton}$ 9 : 1) = 0,58 (Kieselgelplatten Fa. Merck).

UV-Spektrum (in CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 281$ nm, $\epsilon = 15\,200$.

berechnet: C = 48,1% H = 4,9% N = 8,0%

gefunden: C = 49,1% H = 5,1% N = 7,9%.

In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Fragment-Ionen der Massenspektren wiedergegeben:

Darstellung des ^{103}Ru -markierten Ruthenocenaldehyd-*N*-methyl-*N*- β -chloräthylhydrazons

Syntheseweg:

Fragment-Ion	Ferrocen-Hydrazon		Ruthenocen-Hydrazon	
	<i>m/e</i> **	rel. Int.	<i>m/e</i> **	rel. Int. [†]
$\text{C}_5\text{H}_5\text{M}^+ \cdot \text{C}_5\text{H}_4 - \text{CH} = \text{N} - \text{N} \begin{cases} \text{CH}_3^+ \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl} \end{cases}$	304	64	350	58
$\text{C}_5\text{H}_5\text{MC}_5\text{H}_4 - \text{CH} = \text{N} - \text{N} \begin{cases} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_2^+ \end{cases}$	255	21	401	28
$\text{C}_5\text{H}_5\text{MC}_5\text{H}_4 - \text{CH} = \text{N}^+$	212	57	258	84
$\text{C}_5\text{H}_5\text{MC}_5\text{H}_4^+$	185	100	231	100
$\text{C}_5\text{H}_5\text{M}^+$	121	67	167	55

* M = Fe bzw. Ru.

** mit dem häufigsten Fe-Isotop (^{56}Fe) bzw. Ru-Isotop (^{102}Ru).

Zunächst wurde aus Ferrocen durch thermischen Zentralatomaustausch das ^{103}Ru -markierte Ruthenocen hergestellt [3, 11]. Die Methode liefert einen Überschuß an nicht radioaktivem Ferrocen neben wenig markiertem Ruthenocen (Molverhältnis $\text{Fc}/^{103}\text{Ru}-\text{Rc}$ je nach Mischungsverhältnis 30 bis 1000 : 1). Dieses Gemisch wurde durch Vilsmeier-Formylierung [12] zum Aldehyd derivatisiert, das dann mit N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin-hydrochlorid zum entsprechenden Hydrazon kondensiert wurde.

Gesamtausbeute bezogen auf eingesetztes $^{103}\text{RuCl}_3 = 38\%$. Das Hydrazongemisch wurde dünn-schichtchromatographisch in $\text{CHCl}_3/\text{Aceton}$ 9 : 1 gereinigt. Die radioaktive Substanz wurde auf der Kieselgelplatte mit dem „Dünnschicht-Scanner“ (Fa. Berthold, D-7547 Wildbad) lokalisiert, dann abgeschabt und eluiert [13].

Säulen-Trennung der Aldehyde von Ferrocen und Ruthenocen

Nach der Vilsmeier-Formylierung wurde das Ferrocen-aldehyd/Ruthenocen-aldehyd-Gemisch durch Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie getrennt. Zunächst wurde mit einer analytischen μ -Bondapak- C_{18} -Säule (300 mm lang, $\varnothing$ 3,9 mm), Fa. Waters, Königstein, Deutschland) mit einem nicht radioaktiven Aldehydgemisch die Trennung optimiert.

Mit einem Methanol/Wasser-Gemisch 37 : 63 konnte bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 4 ml/min vollständige Auftrennung erreicht werden. (Retentionszeiten: $\text{Fc}-\text{CHO} = 7,9$ min, $\text{Rc}-\text{CHO} = 10,0$ min.) Anschließend wurde das Gemisch aus Ferrocen-aldehyd (1 mg) und radioaktivem Ruthenocen-aldehyd (0,026 mg) unter diesen optimierten Bedingungen getrennt.

Das Ferrocen-aldehyd-freie $[^{103}\text{Ru}]$ -Ruthenocen-aldehyd wurde mit N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin zum Hydrazon kondensiert und dünn-schichtchromatographisch aufgearbeitet.

Darstellung von 1-Ferrocenyl-3-phenyl-propen-1-on-3

Die Darstellung erfolgte nach [6, 17] durch Kondensation von Ferrocen-aldehyd mit Acetophenon in alkalischer Lösung.

Ausbeute: 83% d. Th. (violettrote Nadeln).
Fp.: 128 – 130 °C.

Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten geschlechtsreife weibliche CFI-Mäuse (ca. 25 – 28 g) und Wistar-Ratten (ca. 250 g) der Fa. Hagemann (Extertal). Die Tiere erhielten Altromin Preßlinge und Wasser *ad libitum*.

Tumoren

Solide Tumoren wurden durch subcutane Injektion von 5×10^6 Ehrlich-Ascites-Carcinom-Zellen in den Nacken von CF 1 Mäusen erzeugt. Die Tumor-Affinität wurde 6 Tage nach Tumor-Transplantation bestimmt. Die soliden Tumoren waren zu diesem Zeitpunkt 300 – 500 mg schwer.

Verabreichung der radioaktiven Substanzen

Die radioaktiven Ruthenocen-Verbindungen wurden in Propylenglykol gelöst. Von dieser Lösung wurden je Tier 50 μl (mit der in den Legenden angegebenen Dosis) injiziert.

Radioaktivitäts-Messungen der Tiere und Organe

Der Gehalt der Mäuse an ^{103}Ru wurde *in vivo* durch Ganzkörper-Messung in einem entsprechend großen Bohrloch eines $3' \times 3'$ großen NaJ-Kristalls bestimmt. Zählausbeute: 20,5%.

Die Radioaktivitäts-Messung der den getöteten Tieren entnommenen und gewogenen Organe wurde in einem Gamma-Probenwechsler (Fa. Berthold, Wildbad) mit einer Zählausbeute von 19% ausgeführt. Alle Radioaktivitäts-Messungen sind entsprechend der Halbwertszeit von ^{103}Ru (39,5 Tage) korrigiert worden.

Messung der cytostatischen Wirkung der Hydrazone *in vitro*

Die verwendeten Ehrlich-Carcinom-Zellen befinden sich seit Monaten in der Suspensionskultur, in der sie sich mit einer Verdopplungszeit von 11–12 h vermehren. Das Nährmedium setzt sich zusammen aus 10 Teilen RPMI 1640-Medium, (Fa. Sero-

med, München) mit 6 g/l HEPES (*n*-2'-Hydroxy-äthylpiperazin-2'-äthansulfonsäure, Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland) und 1 Teil foetalem Kälberserum. Durch den Zusatz von HEPES ist in verschlossenen Röhrchen die Aufrechterhaltung eines pH-Wertes zwischen 7,0 und 7,4 auch ohne Begasung mit CO₂/Luft-Gemischen gewährleistet.

Die Röhrchen mit den Zellsuspensionen (4 ml) wurden in einem Brutschrank bei 35 °C durch sehr langsame Rotation bewegt. Die zu untersuchenden Hydrazone (2×10^{-3} molare Lösung in Äthanol) wurden mit den angegebenen Endkonzentrationen zu den Zellkulturen gegeben. Die Zellzahl bei Be-

ginn der Versuche lag bei 6000/ml. Nach einer Inkubationsdauer von 3 Tagen wurde die dann erreichte Zellzahl gemessen und die Vermehrungsrate errechnet. Durch Vergleich von behandelten Zellen und unbehandelten Kontrollansätzen ergab sich die relative Hemmung der Zellvermehrung. Zellzählungen erfolgten mit dem Coulter-Zähler, Modell B.

Danksagung

Wir danken dem Bundesministerium für Forschung und Technologie für die Förderung dieser Arbeiten sowie Frau Brüggener, Frau Scholl und Herrn Kamann für die experimentelle Mitarbeit.

- [1] R. Braun u. G. Wolf, *Z. Krebsforsch.* **86**, 127 – 133 (1976).
- [2] R. Braun u. D. Gericke, *Naturwissenschaften* **64**, 47 (1977).
- [3] D. Langheim, M. Wenzel u. E. Nipper, *Chem. Ber.* **108**, 146 – 154 (1975).
- [4] M. Wenzel, E. Nipper u. W. Klose, *J. Nucl. Med.* **18**, 367 – 372 (1977).
- [5] M. Wenzel, N. Subramanian u. E. Nipper, *Naturwissenschaften* **63**, 341 (1976).
- [6] M. Wenzel, R. Herken u. W. Klose, *Z. Naturforsch.* **32 c**, 473 – 481 (1977).
- [7] A. J. Taylor u. M. Wenzel, *Biochem. J.* **172**, 77 – 82 (1978).
- [8] A. J. Taylor u. M. Wenzel, *Xenobiotica* **8**, 107 – 112 (1978).
- [8 a] R. P. Hanzlik u. W. H. Soine, *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 1290 – 1291 (1978).
- [8 b] M. J. De Roo, *J. Nuclear Biol. Med.* **16**, 62 – 72 (1972).
- [9] M. Wenzel, *Strahlentherapie* **154**, 506 – 507 (1978).
- [10] H. Böhme u. F. Martin, *Arch. Pharm.* **307**, 272 – 277 (1974).
- [11] E. Stadelbauer, E. Nipper u. M. Wenzel, *J. labelled Comp.* **13**, 491 – 508 (1977).
- [12] A. Vilsmeier, *Chem. Ztg.* **75**, 133 – 135 (1951).
- [13] M. Wenzel u. A. Abdul-Wahid, *Int. J. Appl. Radiat. Isotop.* **26**, 119 – 123 (1975).
- [14] K. Wayss, J. Mattern u. M. Volm, *Arzneimittelforsch.* **25**, 71 – 81 (1975).
- [15] B. Rosenberg, *Naturwissenschaften* **60**, 399 – 406 (1973).
- [16] T. Giraldi, G. Sava, G. Bertoli, G. Mestroni u. G. Zassinovich, *Canc. Res.* **37**, 2662 – 2666 (1977).
- [17] E. R. Hauser u. J. K. Lindsay, *J. Organ. Chem.* **22**, 906 – 908 (1957).