

## Elektrochemische Reduktionen von Pentaerythryltetranitrat (PETN) und seinen Metaboliten im Kontext pharmakologischer Wirkungen

U. HESS<sup>1</sup>, H. BROSI<sup>1</sup>, G. KÖNIG<sup>2</sup>, M. STOETER und D. STALLEICKEN<sup>2</sup>

Es werden elektrochemische Untersuchungen zur Reduktionskaskade von Pentaerythryltetranitrat (PETN) als Kombination von cyclisch-voltammetrischen Messungen, analytischen Ergebnissen und präparativen PETN-Metabolitsynthesen beschrieben, weiterhin die Elektroreduktion von Pentaerythryldinitrat (PEDN) in Gegenwart und Abwesenheit von Cystin sowie von Cystin und elektrogenerierten Superoxidradikalanionen ( $O_2^{\bullet-}$ ) im Hinblick auf Erkenntnisse zur Interaktion von PETN-Metaboliten mit oxydierten Thiol-species sowie die Sonderstellung von PETN im Vergleich zu anderen Nitratpharmaka. PETN konnte im Gegensatz zu Pentaerythryltrinitrat (PETriN), PEDN, Pentaerythrylmononitrat (PEMN) sowie anderen organischen Nitraten als potenzieller Precursor einer primär radikalisch ablaufenden Reaktion über intermediären Pentaerythryltrinitrataldehyd (PENA) innerhalb eines sich selbst reduzierenden Nitratsystems nachgewiesen werden, dessen Finalprodukt NO ist. Weiterhin wird gezeigt, dass ein Cystin-Disulfidpool als selektiver Reaktionsmoderator bei der elektrochemischen Reduktion von PEDN wirkt, wobei unbeeinflusst von  $O_2^{\bullet-}$  PEMN entsteht, während ohne Cystin-Zugabe lediglich Pentaerythrit (PE) gebildet wird.

### Electrochemical reduction of pentaerythryltetranitrate (PETN) and metabolites

The reduction-cascade of PETN is described as a combination of cyclic-voltammetric measurements and analytical results together with synthesis of PETN-metabolites; furthermore the electroreduction of pentaerythryldinitrate (PEDN) in the presence and absence of cystine as well as cystine and electrogenerated superoxide-radicalanions to elucidate the interaction of PETN with thiol-species. PETN was recognized as precursor for a initial radicalic process, followed by intermediate formation of pentaerythryltrinitratealdehyde (PENA) inside a self-reducing nitrate-system with NO as final product, which may explain its special position in comparison with other pharmaceutically applied nitratestructures. It could be proved, that a cystine-pool reacts as a selective moderator inside the reduction of PEDN without being interfered by  $O_2^{\bullet-}$ , yielding pentaerythrylmononitrate (PEMN) meanwhile in the absence of cystine only pentaerythrite (PE) is formed.

### 1. Einleitung

Organische Salpetersäureester wie Glyceroltrinitrat (GTN), PETN, Isosorbidmononitrate (ISMN), Isosorbiddinitrat (ISDN), Propatylnitrat, Trolnitrat und ähnliche Verbindungen besitzen ein vasodilatatorisches Wirkspektrum und werden seit Jahrzehnten in der Behandlung der Indikationsgebiete Angina pectoris bzw. ischämische Herzkrankheit (IHK) als weltweite Herausforderung therapeutisch angewandt; ebenso werden organische Nitrate neueren Typs wie *N*-(Nitratopivaloyl)-L-cysteinethylester und dessen Derivate diskutiert.

PETN ist seit 1901 bekannt, wird bereits 40 Jahre therapeutisch verwendet und ist bis zum Ende des 2. Weltkriegs fast ausschließlich im Hinblick auf Sprengstoffe entwickelt worden. Auch danach wurden weder nennenswerte pharmazeutisch orientierte Syntheseentwicklungen eingeleitet noch generelle Untersuchungen zum Reduktionsverhalten durchgeführt, obgleich bei der Therapie mit PETN im Vergleich zu anderen Nitratpharmaka keine Nitratoleranz und kaum Nitratkopfschmerz [1] eintritt. Ohne eventuelle Unterschiede in der Reduktionskaskade zu kennen, schrieb man den verminderten Nitratkopfschmerz der hohen Venoselektivität von PETN zu [2], der fehlenden Nitratoleranz sowie vasoprotektiver [3–6] und antioxidativer Wirkung auf Grund einer Beschränkung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies [7, 8].

Weiterhin wurde kürzlich tierphysiologisch festgestellt, dass PETN den durch Sildenafil verursachten Blutdruckabfall in weitaus geringerem Maß potenziert als vergleichbare Dosen von ISDN und GTN [9] im Hinblick auf die Koronardilatation. Diese Tatsache wird einerseits auf die stark eingeschränkte dilatatorische Wirkung von PETN auf

arterielle Widerstandsgefäße [10], andererseits auf die Verminderung der durch reaktive Sauerstoffspezies verursachten negativ inotropen Effekte zurückgeführt.

Um die genannten Besonderheiten im Wirkspektrum unterschiedlicher Nitratpharmaka zu erklären, wurden Untersuchungen an PETN als Kombination von cyclisch-voltammetrischen Messungen mit chemischen Analysemethoden notwendig; weiterhin die Synthese von PETN-Metaboliten sowie die beispielhafte elektrochemische Reduktion von PEDN in Gegenwart und Abwesenheit von Cystin sowie von Cystin und elektrogenerierten Superoxid-Radikalanionen ( $O_2^{\bullet-}$ ) im Hinblick auf eine evt. Interaktion von PETN und seinen Metaboliten mit  $O_2^{\bullet-}$  bzw. oxydierten Thiol-species.

### 2. Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion

Um elektrochemische Reduktionen von organischen Salpetersäureestern verfolgen zu können, ist die analytische Erfassung von Nitrit und Nitrat einzeln und nebeneinander sowie von Stickstoffmonoxyd unerlässlich. Hierzu diente GRIESS-Reagens [11] als sensibler Nachweis von Nitrit. Als spezifischer Nitratnachweis, auch in Gegenwart von Nitrit, ließ sich Nitron zuverlässig verwenden. Zum Nachweis von NO und  $O_2^{\bullet-}$  eignete sich Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>), ein violett-schwarzer Feststoff, der zu 99% als stabiles Radikal vorliegt und sich in organischen Lösungsmitteln mit blauer Farbe löst. Die colorimetrisch bestimmbare Lösung von DPPH<sup>•</sup> reagiert beim Durchleiten von NO oder mit elektrochemisch erzeugtem  $O_2^{\bullet-}$  – unter Farbumschlag zu gelbem DPPH<sup>-</sup> [12, 13] bzw. durch dessen Reaktion mit einem Proton aus dem Lösungsmittelsystem zu DPPH-H.

### 2.1. Cyclische Voltammetrie (CV)

CV-Messungen zeigten, dass die Nitratgruppen der PETN-Metaboliten Pentaerythryltrinitrat (PETriN), PEDN und Pentaerythrylmononitrat (PEMN) völlig gleichwertig sind und bei Potenzialen von etwa  $-1,6$  V (Referenzelektrode Ag/AgI/ $I^-$  0,1 M) reduziert werden.

In aprotischen Systemen wie DMF führt die Reduktion einer aliphatischen Nitratfunktion irreversibel und 1-elektronisch zu eindeutig nachweisbarem Nitrit sowie radikalischen Folgeprodukten.

Die Nitratbildung über ein eventuelles Gleichgewicht  $2\text{NO}_2 = \text{N}_2\text{O}_4$  und dessen Reaktion als gemischtes Anhydrid zu Nitrat und Nitrit konnte mittels negativer Nitronreaktion ausgeschlossen werden.

Hingegen führen Elektrolysen in protischen Lösungsmitteln über eine vorgelagerte Protonierung (Schema 1, Gl. 1), gefolgt von einer elektrochemischen 2-Elektronenreduktion zum Ester der entsprechenden hydratisierten salpetrigen Säure (Gl. 2), der nachweisbar anschließend zu salpetriger Säure und dem korrespondierenden Alkohol (Gl. 3) reagiert.

Die coulometrische Analyse ergibt für die Reduktion von Nitratestern wie PETN einen Wert von  $n = 1,6$  pro Nitratgruppe ( $n = \text{Zahl der ausgetauschten Elektronen}$ ); d. h. 1,6 Mol verbrauchte Elektronen implizieren die Tatsache, dass der überwiegend 2-elektronisch ablaufende Mechanismus zwar partiell auch über eine konkurrierende 1-Elektronenreduktion wie in Aproten zu gleichen Endprodukten abläuft, jedoch weitgehend ohne die dort auftretenden radikalischen Intermediate.

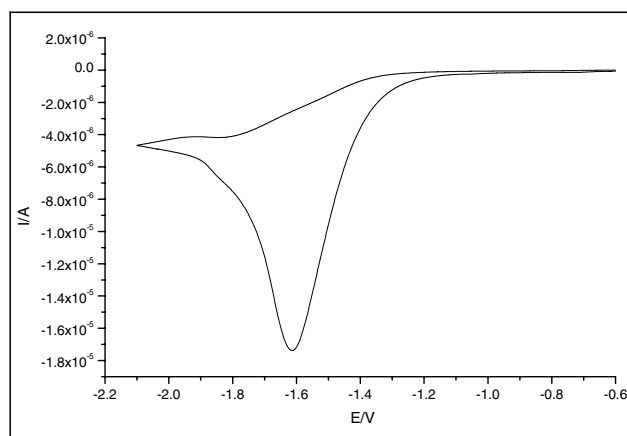
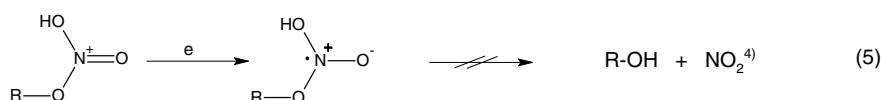
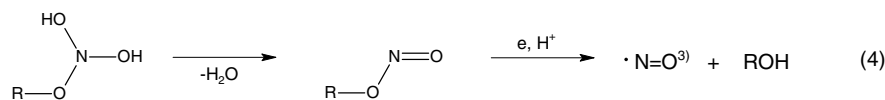
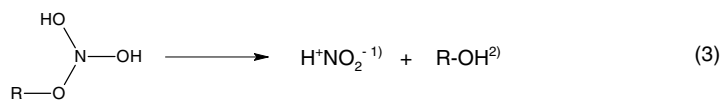
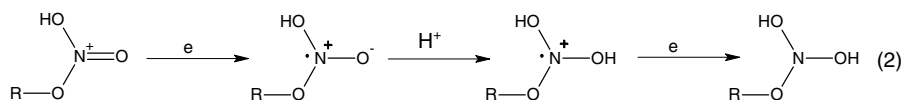
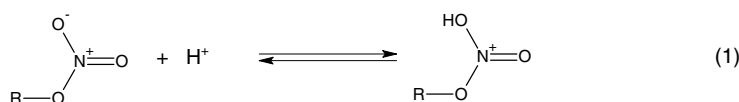


Abb. 1: CV von PEDN (analog PETriN, PEMN) in DMF/0,1 M TBAI, vs. Ag/AgI/0,1 M  $I^-$ ,  $c = 5 \times 10^{-3}$  mol/l

Die Bildung von NO als untergeordnete Kolateralreaktion (Gl.4) ist bei  $n = 1,6$  sehr wahrscheinlich. Da jedoch bekannt ist, dass in wässrigen Systemen stets gelöster Sauerstoff mit Stickstoffmonoxid zu Nitrit reagiert [14], konnte NO selbst nicht nachgewiesen werden. Hingegen ist die Bildung von  $\text{NO}_2$  gemäß Gl.5 auszuschließen, da keine spezifische Nitratreaktion mit Nitron zu beobachten war.

Ungeklärt innerhalb der PETN-Forschung ist die Tatsache, dass trotz identischer Reduktionspotenziale nur die Metaboliten PETriN, PEDN und PEMN im Humanplasma nachgewiesen werden können. Damit liegt nahe, dass die Biotransformation von PETN im Vergleich zu seinen Me-

#### Schema 1 Elektrochemische Reduktion von Salpetersäureestern in DMF/Eisessig



<sup>1</sup> nachweisbar durch Griess-Reagens; <sup>2</sup> z. B. PE aus PEMN nachgewiesen; <sup>3</sup> coulometrisch als Kolateral-Reaktion nicht nachgewiesen, aber in untergeordnetem Maß wahrscheinlich; <sup>4</sup> nicht wahrscheinlich, da kein  $\text{NO}_2^-$  nachweisbar

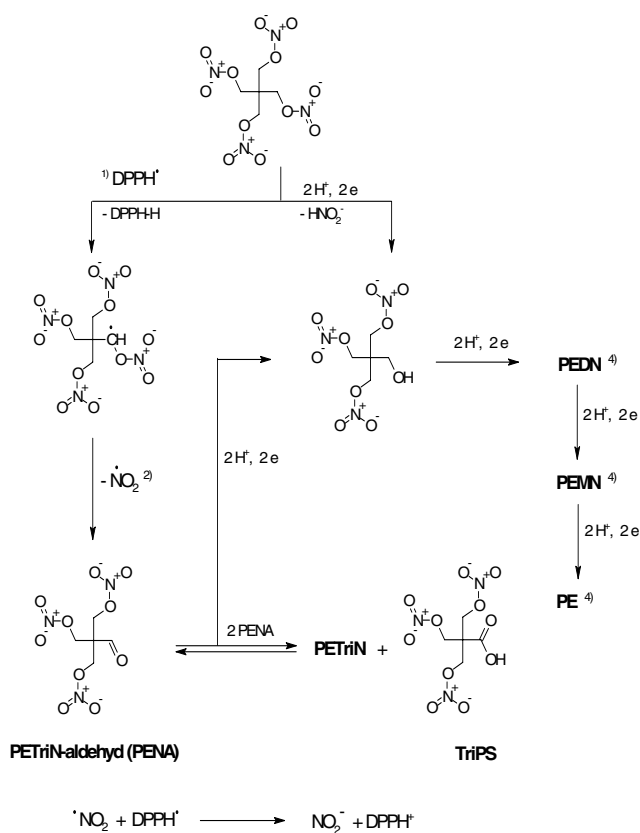
taboliten unterschiedlich verläuft, indem aus einer der den vier Nitratfunktionen benachbarten CH<sub>2</sub>-Gruppen eine Protonen- und/oder Wasserstoffabspaltung stattfindet, die im Fall der H<sup>+</sup>-Abstraktion zum korrespondierenden Anion führt; ein derartiger Ablauf würde jedoch jede weitere Reduktion blockieren. Hingegen führt die Wasserstoffabstraktion zu einem instabilen C-zentrierten Radikal, dass chemisch und elektrochemisch weiter reagieren kann.

Wie vergleichende Untersuchungen mit DPPH<sup>•</sup> zeigten, erfolgt ausschließlich bei PETN, nicht jedoch bei PETriN, PEDN und PEMN eine Wasserstoffabstraktion aus einer CH<sub>2</sub>-Gruppe zum intermediären  $\cdot\text{CH}-\text{O}-\text{NO}_2$ -Radikal; d.h. nur hier kann der unterschiedliche radikalische Abbaumechanismus wirksam werden und macht im Gegensatz zu nicht partiell radikalisch verlaufenden Abbau-mechanismen aller anderen Nitratpharmaka das vergleichsweise sehr unterschiedliche Wirkspektrum von PETN verständlich.

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die intermediäre  $\cdot\text{CH}-\text{O}-\text{NO}_2$ -Gruppe zu PENA reagiert; hierbei wird gleichzeitig NO<sub>2</sub> abgespalten, das sich in Nitrit umwandelt indem es aus DPPH<sup>•</sup> unter Bildung des korrespondierenden Kations, DPPH<sup>+</sup>, ein Elektron aufnimmt. Das entstandene Nitrit konnte mittels GRIESS-Reagens als roter Farbstoff, PENA mittels Derivatisierung nachgewiesen werden (s. Schema 2).

Die Reduktionskaskade des primär aus PETN entstehenden PENA verläuft anschließend als Folge bekannter Aldehydreaktionen über PETriN, PEDN, PEMN zum Endprodukt Pentaerythrit (PE). Weiterhin kann durch

**Schema 2** Radikalische und elektrochemische Reduktionskaskade von PETN in DMF/H<sub>2</sub>O



<sup>1</sup> Diphenylpicrylhydrazyl; <sup>2</sup> Nachweis von NO<sub>2</sub>- mit Griess-Reagens; <sup>3</sup> Nachweis als 2,4-Dinitrophenylhydrazon; <sup>4</sup> inaktiv gegen DPPH

Redoxdisproportionierung von PENA zu PETriN und 2-Nitryloxy-2,2-bis(nitryloxymethyl)propionsäure (TriPS) entstehen und durch Reaktion von PETriN und TriPS 2,2-Bis-(nitryloxymethyl)-3-nitryloxypropionsäure-2,2-bis-(nitryloxymethyl)-3-nitryloxypropylester (TriPS-PETriNester), der damit auch ein wahrscheinlicher Metabolit der Biotransformation von PETN ist.

TriPS-PETriNester konnte von uns aus PETriN und TriPS-chlorid synthetisiert werden [17].

Das Redoxsystem PENA/TriPS-PETriNester schließt innerhalb der real bestehenden chemischen Redoxgleichgewichte von Carbonylverbindungen noch die Möglichkeit einer 2-elektronischen Redoxdisproportionierung von PENA zum Oxydationsprodukt TriPS ein, verbunden mit der internen Reduktion einer Nitrat- zur Nitritfunktion bzw. bis zu NO.

Auf Grund der intermediären Bildung von PENA über einen radikalischen Mechanismus innerhalb der ersten Metabolisierungsstufe, kann PETN als „selbst reduzierendes System“ bezeichnet werden; diese Tatsache impliziert im Gegensatz zu anderen Pharmaka vom Nitrat-Typ auch die Möglichkeit einer antioxidativen Wirkung im Metabolismus.

## 2.2. Reduktionen von PEDN in Gegenwart von Cystin in Ab- und Anwesenheit von O<sub>2</sub><sup>•-</sup>

Es ist bekannt, dass bei Anwesenheit einer Reihe von Thioispezies die Reduktion von Nitraten stimuliert wird [15]. Die Reaktion ist verbunden mit der Bildung entsprechender Disulfidverbindungen. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die Regulation der Xanthinoxidase-Xanthindehydrogenase-Aktivität sowie deren reversibler Übergang ineinander mit der Bildung von Disulfidbrücken bestimmter Cysteinheiten zusammenhängt [16].

Die elektrochemische Reduktion von PEDN in Gegenwart von Cystin in sauerstoffgesättigter Lösung konnte daher beim Stand der bisherigen Kenntnisse die Frage einer potenziell selektiven und im Vergleich zur metabolischen Reduktionskaskade vergleichsweise weniger komplizierten Interaktion von PETN-Metaboliten mit oxidierten Thioispezies partiell beantworten.

Hierzu war einerseits die qualitative und quantitative Erfassung von Cystin und O<sub>2</sub><sup>•-</sup> in Abwesenheit und Gegenwart von PEDN in verschiedenen Lösungsmittel-Leitsalzsyste-men notwendig; andererseits die Überführung der gewonnenen Messergebnisse auf coulometrisch zu erfassende Elektrolysen sowie die Identifizierung der hierbei gewonnenen Reaktionsprodukte.

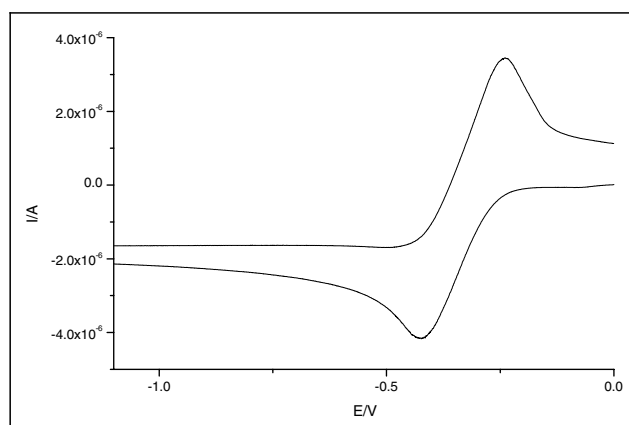


Abb. 2: Cyclovoltammogramm von Sauerstoff in DMF

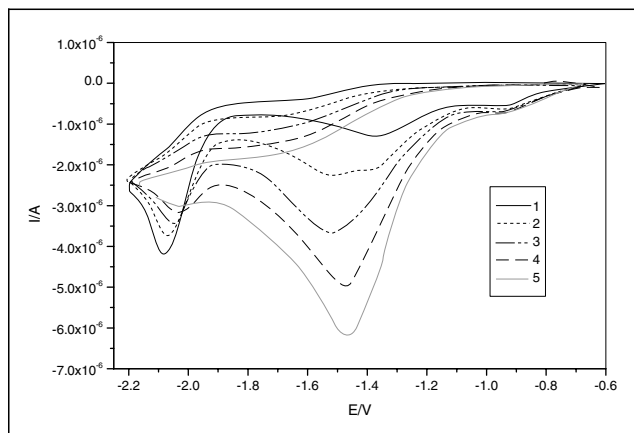


Abb. 3: Cyclovoltammogramme von Cystin  $\times$  2 HCl in Gegenwart steigender PEDN-Konzentration

Abb. 2 zeigt die reversible Erzeugung von  $O_2^{\cdot-}$  aus reinem  $O_2$  in abs. DMF. Schon geringste Wasserspuren würden die Bildung von  $H_2O_2$  über reaktive Sauerstoffspezies einleiten, so dass in Gegenwart von  $O_2^{\cdot-}$  durchgeführte Elektrolysen absolut aprotisch erfolgen müssen. Weitere CVs weisen eindeutig nach, dass  $O_2^{\cdot-}$  mit Cystin reagiert, nicht hingegen mit PEDN.

Das CV von Cystin (Abb. 3, Kurve 1) weist im ersten Reduktionspeak die weitgehend irreversible Spaltung der Thioethergruppe aus, im zweiten die Reduktion der Protonen der Ammoniumstruktur zu naszierendem Wasserstoff. Die resultierende Thiolstruktur konnte mit DPPH $\cdot$  nachgewiesen werden.

Die dynamischen CVs von PEDN in Gegenwart von Cystin (Abb. 3, Kurven 2–6) zeigen, dass die Peakströme mit zunehmender Konzentration an PEDN bei etwa  $-1,5$  V zu-, die des bei  $-2,1$  V reagierenden Cystins deutlich abnehmen.

Die aus den CV-Messungen abgeleiteten und die in der Tabelle angeführten Resultate präparativer Elektrolysen zeigen, dass in Abwesenheit von Cystin die Reduktion von PEDN quantitativ zu PE führt. Hingegen erfolgt sie in Gegenwart von Cystin zu PEMN im Verhältnis 2 : 1 zu PE bei gleichem n-Wert geflossener Elektronen. Die Ausbeute an PEMN lässt sich bei geeigneter Elektrolyseführung auf 95% steigern. Damit ermöglicht die Zugabe von Cystin eine selektive Synthese von PEMN, indem es die Nitratgruppen vor schneller Reduktion schützt. Durch welche

**Tabelle: Potenzialkontrollierte Elektrolysen des PETN-Metaboliten PEDN**

Substrat	Elektrolyse	Potential (-v)	n <sup>1</sup> (pro -ONO <sub>2</sub> )	Produkte
PEDN	DMF	1,6	1	PE
PEDN	DMF/5% H <sub>2</sub> O/ 0.5% Eisessig	1,6	1,6	PE (90)
PEDN	DMF/Cystin <sup>2</sup>	0,6	1	PEDN (100)
PEDN	DMF/Cystin <sup>2</sup>	1,6	1	PEMN : PEMN 8 : 1
PEDN	DMF/5% H <sub>2</sub> O/ 0.5% Eisessig/ Cystin <sup>2</sup>	1,6	1	PEMN : PEDN 2 : 1
PEDN	DMF/O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	0,6	1	PEDN (100)
PEDN	DMF/Cystin <sup>2</sup> /O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	1,6	1	PEMN : PEDN 8 : 1

<sup>1</sup> coulometrisch ermittelte Zahl der umgesetzten Elektronen

<sup>2</sup> Lösung mit Cystin  $\times$  2xHCl gesättigt

Kolateralreaktionen hierbei der Cystin-Disulfid-Pool den selektiven Reduktionsmechanismus moderiert, wird künftigen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Vergleichende Elektrolysen von PEDN in Gegenwart von  $O_2^{\cdot-}$  sowie von  $O_2^{\cdot-}$  und Cystin verlaufen etwa analog zu solchen in Abwesenheit von Superoxid-Radikalanionen. Die Cyclovoltammogramme zeigen, dass die Reduktion von Cystin und PEDN bei etwa 1,7 V bzw. 0,9 V negativem Potenzial im Vergleich zu  $O_2$  stattfindet. In sauerstoffgesättigter Reaktionslösung liegt daher  $O_2$  als  $O_2^{\cdot-}$  vor und steht nicht mehr, anders wie in biologischen Systemen, für eine Elektronenübertragung zur Verfügung. Damit entfällt der Sauerstoffeinfluss auf die elektrochemische Reduktion von PEDN.

### 3. Experimenteller Teil

#### 3.1. Cyclovoltmetrie

Die cyclovoltmetrischen Untersuchungen erfolgten mittels Autolab PGSTAT 20 der ECO-Chemie B. V. gekoppelt mit dem VA Stand 636 der DEUTSCHE METROHM-GmbH & Co. Die Messungen wurden am hängenden Quecksilbertropfen (Gegenelektrode: Glassy Carbon; Referenzelektrode: Ag/AgI/0.1 M I<sup>-</sup>) in trockenem DMF/0.1 M Tetrabutylammoniumiodid bei Substratkonzentrationen von  $2,5$ – $5,0 \times 10^{-3}$  mol l<sup>-1</sup> im Potenzialbereich zwischen 0 bis  $-2,25$  V mit einer Potenzialvorschubgeschwindigkeit von  $0,1$  Vs<sup>-1</sup> durchgeführt. Die Messlösungen wurden gegebenenfalls mit  $O_2$  und/oder Cystin  $\cdot$  2 HCl gesättigt.

#### 3.2. Präparative Elektrolysen

Zur Durchführung der präparativen Elektrolysen fand der Potentiostat NTN 700M-350 der F.u.G. Elektronik GmbH Verwendung. 1 g Substrat (PEDN) wird in 75 ml trockenem DMF/0.1 M Tetrabutylammoniumiodid (gegebenenfalls gesättigt mit Cystin 2 HCl, mit 5% Wasser bzw. 0.5% Eisessig) gelöst und in einer mit G5-Frittendiaphragma geteilten H-Zelle an einer ca. 10 cm<sup>2</sup> großen Bodenquecksilberkathode (Anode: Graphitstab; Referenzelektrode: Ag/AgI/0.1 M I<sup>-</sup>) beim cyclovoltmetrisch ermittelten Peakpotenzial potentiostatisch elektrolysiert. Die Reduktionen werden bei Raumtemperatur und ständigem Magnetrühren bei einer Anfangsstromstärke von 100 mA durchgeführt. Die Zelle wird dabei entweder mit sauerstofffreiem Stickstoff oder reinem Sauerstoff begast. Die Elektrolysen werden abgebrochen, wenn die Stromstärke auf ca. 5% des Anfangswertes abgesunken, oder die vorher berechnete Strommenge verbraucht worden ist.

#### 3.3. 3-Nitryloxy-2,2-bis(nitryloxymethyl)propionsäure-3-nitryloxy-2,2-bis(nitryloxymethyl)propylester

TriPS (1 g, 3,5 mmol) wird mit Thionylchlorid (1 ml) und 1 Tropfen trockenem DMF versetzt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Abdampfen des überschüssigen Thionylchlorids im Vakuum gibt man zum erhaltenen Säurechlorid PETriN (950 mg, 3,5 mmol) gelöst in 1 ml Pyridin und rührt 3 h bei 65 °C. Das Reaktionsgemisch wird auf 0 °C gekühlt, mit 10 ml Eiswasser versetzt und fünfmal mit Diethylether extrahiert. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen mit Natriumsulfat und Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man ein gelbes Öl, welches nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, Hexan/Essigester – 2 : 1) farblose Kristalle (414 mg) ergibt. Schmp. 70 °C. Ausbeute: 23%. R<sub>f</sub> (Kieselgel; Hexan/Essigester – 1 : 1) 0,63.

#### Literatur

- Pffaffenrath, V.; de la Motte, S.; Harrison, F.; Rühning, C.: *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **48**, 646 (1998)
- Noack, E.; Kojda, G.: *Pentaerythryltetranitrat – Gesichertes und Neues zur Pharmakologie eines Langzeitnitrats*, Steinkopff-Verlag, Darmstadt 1994
- Bassenge, E.; Fink, N.; Skatchev, M.; Fink, B.: *J. Clin. Invest.* **102**, 67 (1998)
- Engelmann, L.; Wetzler, G.; Kucher, A.; Frömmel, H.: *Z. Kardiologie*, **78**, 99 (1989)
- Silber, S. in: Mutschler, E.; Schrör, K. (Hrsg.): *Pentaerythryltetranitrat – pharmakologische und klinische Daten zur koronaren Herzkrankheit*, Steinkopff-Verlag, Darmstadt 1999
- Kojda, J.; Hacker, A.; Noack, E.: *Eur. J. Pharmacol.* **355**, 23 (1998)
- Fink, B.; Bassenge, E.: *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **30**, 831 (1997)
- Dikalov, S.; Fink, B.; Skatchkov, M.; Stalleicken, D.; Bassenge, E.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**, 938 (1998)

- 9 Schwemmer, M.; Bassenge, E.; Stoeter, M.; Hartmann, B.; Hess, U.; Fink, B.: *J. Pharmacol.* **38**, 149 (2001)
- 10 Dück, K. D.; Richard, F.: *Z. Ges. Inn. Med.* **45**, 735 (1990)
- 11 Hütter, W. in: *Wasser und Wasseruntersuchungen*, 5. Aufl. S. 382, Salle-Verlag, Frankfurt 1992
- 12 Papariello, G.; Janish, M.: *Anal. Chem.* **37**, 899 (1965)
- 13 Blots, M.: *Nature* 1199 (1958)
- 14 Beckmann, J. in: Lancaster, J. (Hrsg.): *Nitric Oxide, Principles and Actions* Academic Press Inc, London 1996
- 15 Sergeev, N.; Ananina, L.; Lwow, I.: *Biochimia (russ.)* **984**, UDK 577.151.33
- 16 Kooij, A.: *Histochem. J.* **26**, 889 (1994)
- 17 Hess, U.; Windeck, A.-K.; Brosig, H.: WO 98/15521 A1 vom 15.04.1998

Eingegangen am 9. November 2001  
Angenommen am 26. November 2001

Dr. Ulrich Hess, Prof. i.R  
Institut für Pharmazie  
Humboldt-Universität  
Goethestr. 54  
D-13086 Berlin