Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität München

Kommissarische Leitung Prof. Dr. med. P. Eyer

Untersuchungen zur schnellen Freigabe von HI-6 Dichlorid und HI-6 Dimethansulfonat aus verschiedenen Autoinjektorsystemen

Neue Aspekte des Stabilitätsverhaltens dieser Salze und
ihrer ungepufferten, konzentrierten Lösungen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wilhelm Josef Hartwich

aus München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. P. Eyer
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. O. Habler
	Priv. Doz. Dr. M. Schmolke
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	18.02.2004

Danksagung

„Ihre wissenschaftliche Meinung zählt so viel wie die meine - sofern gut belegt und begründet“. Dank dieser Äußerung meines Doktorvaters fühlte ich mich unerwartet von Anfang an wie ein Kollege willkommen geheißen. Für die Zeit und für sein Verständnis, das er wie selbstverständlich für die Sorgen und Fragen seines Doktoranden aufbrachte, danke ich Herrn Prof. Dr. P. Eyer aus ganzem Herzen. Ich durfte in seinem Arbeitskreis erleben, wie spannend wissenschaftliche Antwortensuche sein kann und wie erfolgreich, wenn fach-übergreifend gearbeitet wird.

Das Thema verlangte die Anwendung unterschiedlichster Methoden und die Entwicklung neuer. Deshalb möchte ich allen denen danken, die mich mit Spezialwissen und -ausrüstung unterstützt haben:
Herrn Dr. Breugst von der Apotheke der Innenstadtklinik für die Nutzung des IR-Spektrometers. Herrn Dr. Lerche vom Department Pharmazeutische Chemie der Fakultät Chemie und Pharmazie für die großzügige bemessene Zeit für Kernresonanz- und Massenspektrenaufnahmen. Herrn Prof. Dr. Winter und seinen Mitarbeitern vom Department Pharmazeutische Technologie der gleichen Fakultät für die Benutzung ihres DSC-Meßgerätes und anderer Meßgeräte. Den Herren Madersdorfer, Mann, Härtl von der feinmechanischen Werkstatt und der Hauswerkstatt des Institutes für die prompte Herstellung von notwendigen Bauteilen und das Ausleihen von Werkzeug.

Herrn Dr. Thiermann und Herrn Dr. Worek von der Sanitätsakademie der Bundeswehr möchte ich für ihre freundschaftliche wissenschaftliche Hilfs-bereitschaft und für die mit Sarin, Cyclosarin und VX behandelten Erythrozyten danken. Herrn Prof. Dr. Szinicz danke ich für die Übersetzung mancher kroatischer Literatur.

Im Arbeitskreis fand ich mich unter Freunden wieder. In der aufgeschlossenen, hilfsbereiten und fröhlichen Atmosphäre ging ich täglich gern an die Arbeit. Ich danke allen dafür von Herzen. Ganz besonders aber auch unser aller „gutem Geist“, Frau Dressnandt.

Meiner Frau danke ich für die strapazierte Geduld dem „Spätheimkehrer“ gegenüber. Ich danke ihr für ihre Aufmunterungen in manchen Talsohlen und dafür, meinen Blick gelegentlich wieder auf andere wichtige Fragen gelenkt zu haben.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 1

2 MATERIAL UND METHODEN 15

2.1 Reagenzien und Standards 15
2.2 Verwendete HI-6 Salze 16
2.2.1 HI-6 Dichlorid Monohydrat (HI-6 2Cl) 16
2.2.2 HI-6 Dimethansulfonat (HI-6 DMS) 17
2.3 Verglichene Autoinjektoren (Charakteristika) 20
2.4 Häufig verwendete Meßeinrichtungen und -geräte 23
2.5 Häufig verwendete analytische Methoden 25
2.6 Testverfahren für Astra Autoinjektoren 28
2.6.1 Mechanische Verschüttelung 28
2.6.2 Manuelle Verschüttelung 29
2.6.3 Mess- und Auswertemethoden 30
2.7 Testverfahren für Meridian Autoinjektoren 31
2.7.1 Versuchsanordnung zur Fraktionssammlung 31
2.7.2 Versuchsanordnung und Auswertung für Kontrollen und Versuche mit Gegendruck 33
2.8 Alterung konzentrierter, ungepufferter HI-6 Lösungen 34
2.9 „HI-6 Säure“ (M3) 35
2.9.1 Herstellung und Isolierung aus gealterter HI-6 Lösung 35
2.9.2 Untersuchung mittels Kernresonanz- und Massenspektroskopie 36
2.9.3 Biochemische Charakterisierung 36
2.10 Untersuchung pharmazeutisch-technologischer Eigenschaften beider HI-6 Salze 38

3 ERGEBNISSE 40

3.1 Funktionsprüfung von Astra Tech und Meridian Autoinjektoren, befüllt mit HI-6 Dichlorid oder HI-6 Dimethansulfonat 40
3.1.1 HI-6 Dimethansulfonat in Astra Tech Autoinjektoren bei 5°C 40
3.1.2 Prüfung von Meridian Injektoren mit HI-6 2Cl bzw. HI-6 DMS bei Raumtemperatur und bei 5°C 44
3.2 Alterung konzentrierter, ungepufferter HI-6 Lösungen 58
3.2.1 Charakterisierung der „HI-6 Säure“ (M3) 58
3.2.2 Zerfallsschema 69
3.2.3 pH-Abfall 71
3.2.4 Produktbildung 72
3.2.5 Reinheit und pH frisch hergestellter HI-6 Lösungen 76
3.2.6 Stabilität konzentrierter, ungepufferter HI-6 Lösungen in D2O 77

3.3 Alterung gebrauchsfertiger, konzentrierter und ungepufferter HI-6 Dimethansulfonat-Lösungen in Astra Autoinjektoren 78
3.4 Biochemische Prüfung der „HI-6 Säure“ (M3) und gealterter, konzentrierter HI-6 Lösung 83
3.4.1 Reaktivierung gehemmter Erythrozyten-Acetylcholinesterase 83
3.4.2 Hemmung der Acteylcholinesteraseaktivität durch „HI-6 Säure“ (M3) 85

4 DISKUSSION 88

4.1 Autoinjektorenfunktionsprüfung: In situ Erzeugung konzentrierter HI-6 2Cl H_2O bzw. HI-6 DMS Injektionslösungen und deren Freisetzung 88
4.2 Abbau von HI-6 in konzentrierter, ungepufferter Lösung 98
4.3 Biochemische Wirkung von M3 und den Polymerisaten 103
4.4 Stabilität von HI-6 Kristallpulvern 104
4.5 Rückblick und Ausblick 105

5 ZUSAMMENFASSUNG 109

6 LITERATUR 112

7 ANHANG 118

7.1 pH-Absenkung bei der Säulenchromatographie von HI-6 DMS 118
7.2 Konstruktionsdaten der untersuchten Autoinjektoren 119
7.3 HPLC-Daten der gealterten 400 mM HI-6 Lösungen 120
7.4 UV/VIS-Absorption gealterter HI-6 Lösungen 122
7.5 Technologische Eigenschaften der HI-6 Salze und Lagerstabilität 124

Abkürzungen

2-PA	2-Pyridinaldehyd
2-PAO	2-Pyridinaldoxim
2-PAOH$^+$	am Pyridinstickstoff protoniertes 2-Pyridinaldoxim
2-PCN	2-Pyridinnitril
2-PO	2-Pyridon
AChE	Acetylcholinesterase
ASCh	Acetylthiocholin
Astra	Astra Tech
CAD-MS	Collisionally-activated-dissociation Mass Spectrometry
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)
Ery-AChE	Erythrozytenacetylcholinesterase
HI-6 2Cl (H_2O)	1-(2-Hydroximinomethyl-1-pyridinium)-3-(4-carbamoyl-1-pyridinium)- 2-oxapropan Dichlorid Monohydrat
HI-6 DMS	1-(2-Hydroximinomethyl-1-pyridinium)-3-(4-carbamoyl-1-pyridinium)- 2-oxapropan Dimethansulfonat
INA	Isonicotinsäureamid
INS	Isonicotinsäure
M3	HI-6, an der Amidfunktion hydrolysiert = „HI-6 Säure“
MMT	Meridian Medical Technologies
OPCW	Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons
STI	STI (Survival Technology Inc.) International Ltd.
TNB$^-$	5-Thio-2-nitrobenzoat

1 Einleitung

HI-6 als asymmetrisches Bispyridiniumoxim gehört zur Gruppe der Stoffe, die ursächlich die Symptome von Nervenkampfstoffvergiftungen auf Organophosphatbasis bekämpfen können.

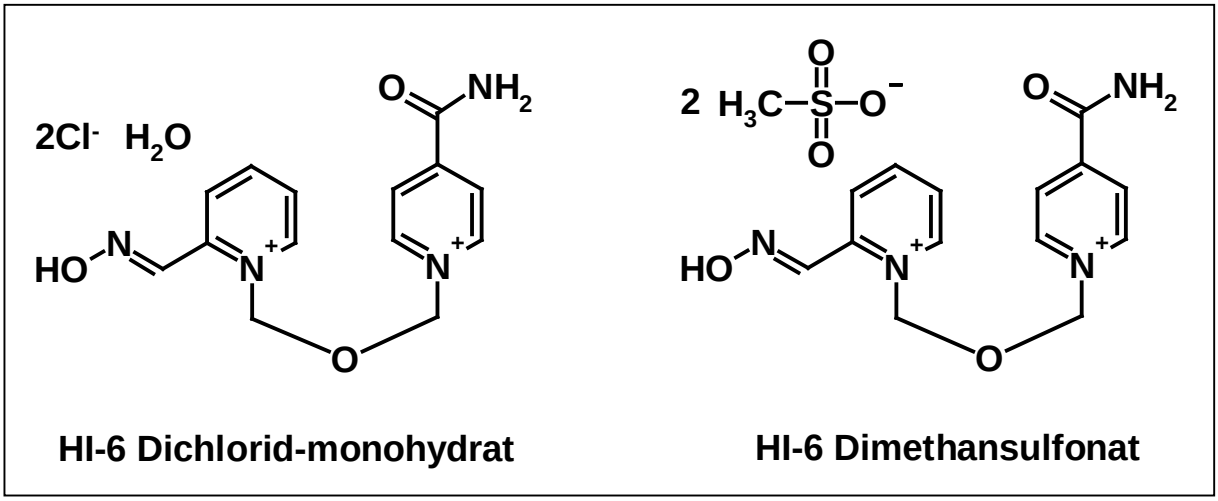
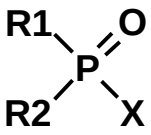


Abb. 1-1 HI-6 Salze

Der skrupellose Einsatz solcher stark wirksamen Nervengifte in größerem Stil blieb vielen Menschen in der jüngeren Geschichte nicht erspart. Im Iran-Irakkrieg 1980 - 1988 wurden Tabun und Sarin eingesetzt (MacIlwain 1993). Sarin verwendete z. B. die Aum-Sekte 1995 in terroristischer Absicht gegen Fahrgäste der Tokyoter U-Bahn (Ricordel and Meunier 2000).
Seit dem 11. September 2001 läßt die mit der schrecklichen Zerstörung des World Trade Centers dargebotene menschenverachtende Kälte vermuten, daß sich der international organisierte Terror künftig auch der Nervenkampfstoffe bedienen wird.

Per se sind Organophosphate gegenüber Vertebraten und Insekten systemisch hochwirksame Substanzen. Seit der systematischen chemischen Bearbeitung dieser Stoffklasse durch den Chemiker Schrader ab den 30ern des 20. Jahr-

hunderts wird die gemeinsame Struktur der Verbindungen mit der sogenannten Schraderformel beschrieben (Schrader 1957).



R = Alkyl, Alkoxy, Dialkylamid, Amino, Thioalkyl

X= "Acyl"-Rest (Halogen, Cyano, Thioalkyl, Phenoxy...)

Abb. 1-2 Schraderformel (Sauerstoff kann generell durch Schwefel ersetzt sein)

Die als Kontakt- und Fraßgifte gegen Insekten und andere Parasiten gut wirksamen, aber hydrolyseempfindlichen Organophosphate haben das persistente DDT verdrängen können. Ihre damit gute Umweltverträglichkeit birgt aber den Nachteil großer akuter Giftigkeit. Ihre Lipophilie läßt diese Stoffe auch über die Haut in den menschlichen Organismus leicht eindringen. Mitunter kommt es deshalb weltweit im Agrarbereich zu entsprechenden Unfällen. In Sri Lanka wurden z. B. jährlich Tausende von Vergiftungsfällen bekannt, darunter viele auch in suizidaler Absicht (Eddleston, Singh et al. 2002).
Die WHO schätzte 1990 die noch heute diskutierte Zahl der jährlichen Todesopfer durch Organophosphatpestizide auf weltweit insgesamt 200.000, die der Vergiftungen auf 3 Millionen pro Jahr (WHO in collaboration with UNEP 1990).

Die Symptome der Vergiftungen sind für die als Pestizide verwendeten Verbindungen wie für die Nervenkampfstoffe prinzipiell gleich. Da Organophosphate das aktive Zentrum von z. B. Serinhydrolasen kovalent je nach Phosphorsäurederivat durch Phosphorylierung, Phosphonylierung oder Phosphinylierung (Oberbegriff „Phosphylierung“: de Jong and Ceulen 1978; Hanke and Overton 1991) blockieren, zeigt sich ihre Wirkung an besonders empfindlicher Stelle, am synaptischen Spalt. Die nicht kompetitive, fast irreversible Hemmung dortiger Acetylcholinesterase führt an muscarinergen und nicotinergen Rezeptoren, peripher wie zentral, zu einem Überangebot an

Acetylcholin (Abb. 1-3). Mit steigender Konzentration resultiert zunächst eine Überstimulierung beider Rezeptorentypen.

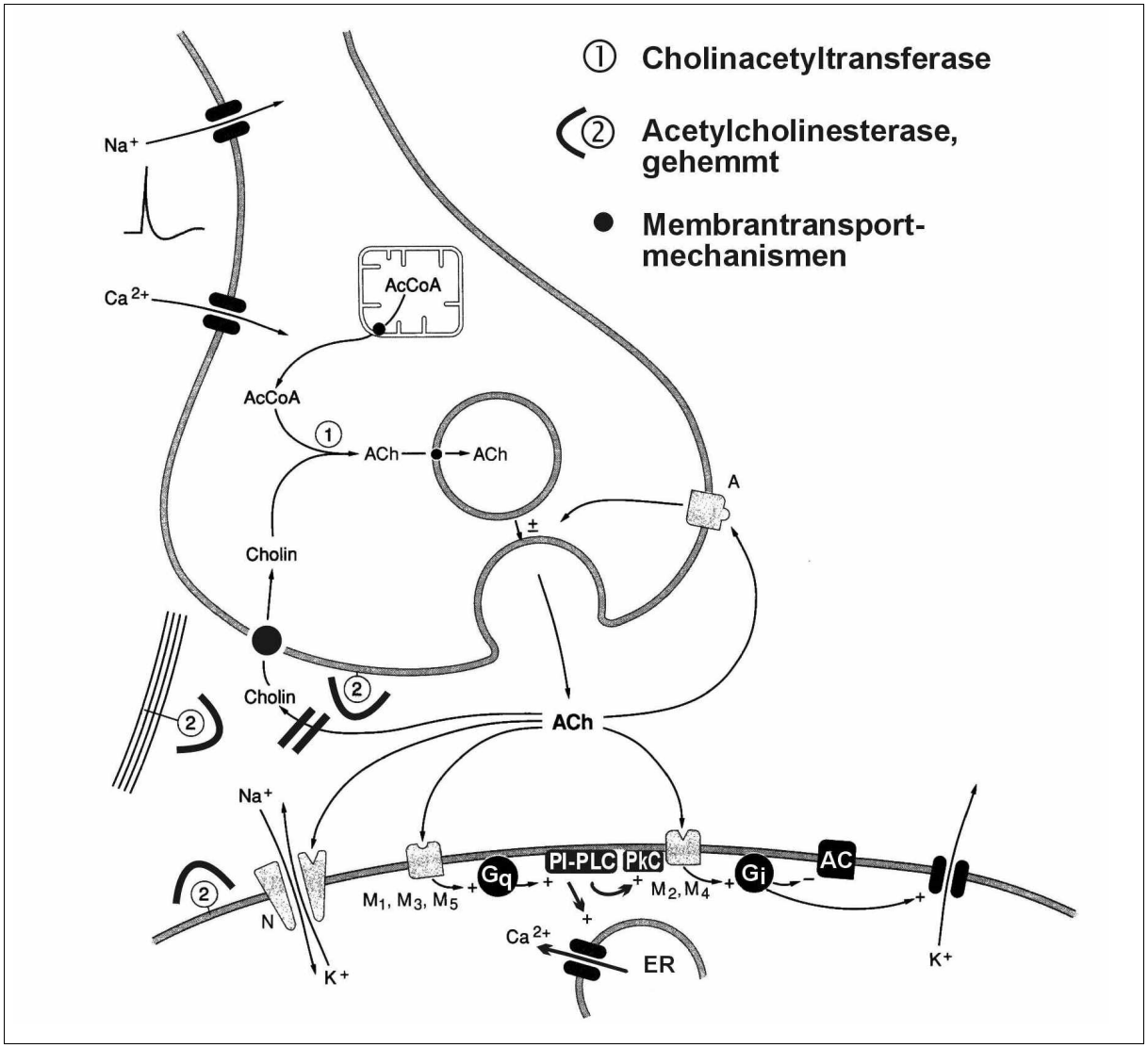


Abb. 1-3
Schema synaptischer Angriffspunkte von Acetylcholin und Orte der Hemmung der Acetylcholinesterase durch Organophosphate. (Starke 2001; Oberdisse 2002: mod.)

(N) postsynaptischer, nicotinerger Rezeptor; neuronaler oder neuromuskulärer Typ; neuronal zentral wie ganglionär vorkommend. ($M_{1\text{-}5}$) muscarinerger, G-Protein gekoppelter Rezeptor, vorwiegend postsynaptisch; zentral (M_1), ganglionär und postganglionär vorkommend. (A) präsynaptischer Autorezeptor (z. B. M_2). (G_q, G_i) G-Proteine der q- bzw. i-Familie. (PI-PLC) Phosphatidyl-Inositspezifische Phospholipase C. (AC) Adenylylcyclase. (PkC) Phosphokinase C. (ER) Endoplasmatisches Reticulum.

Im Unterschied zu den muscarinergen Rezeptoren kann bei steigender Konzentration an den nicotinergen Rezeptoren (zentral, ganglionär, neuromuskulär) ein Depolarisationsblock auftreten (Abb. 1-4).

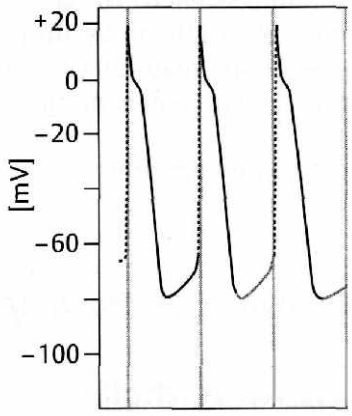
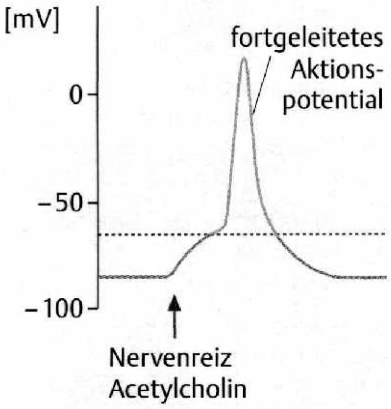
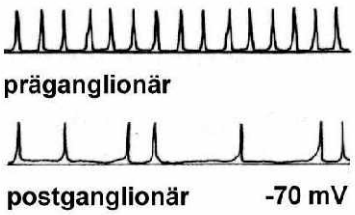
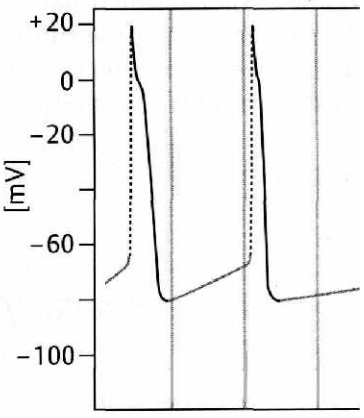
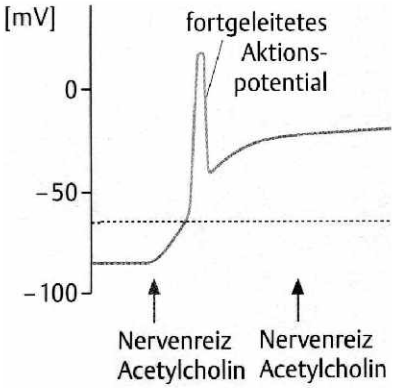
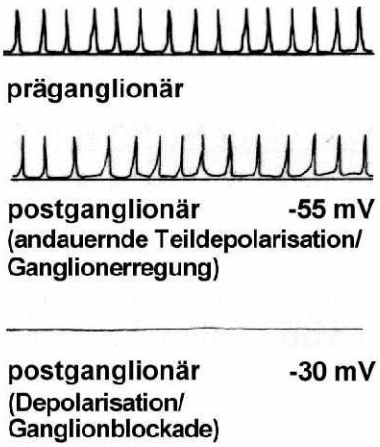
Muscarinerg	**Nicotinerg**	
Herz	Muskel	Ganglion
Intakte Acetylcholinesterase		
		
normales Aktionspotential	normales fortgeleitetes Aktionspotential	normale fortgeleitete Aktionspotentiale
Gehemmte Acetylcholinesterase		
		
Kaliumkanal, G-Protein gekoppelt: Öffnung gefördert	cholinerger Natrium-Kalium-Kanal initial geöffnet, dann Anstieg des Ruhepotentials und Desensitisierung	cholinerger Natrium-Kalium-Kanal initial öfter geöffnet, dann Anstieg des Ruhepotentials und Desensitisierung

Abb. 1-4
Beispiele elektrophysiologischer, postsynaptischer Konsequenzen der Stimulation bis Überstimulation nicotinerger und muscarinerger Rezeptoren mit Acetylcholin (Lüllmann, Mohr et al. 1994; Lüllmann, Mohr et al. 1999: mod.).

Aufgrund der Vielzahl der durch die Stimulation erreichten nervalen Steuerungsebenen und Organsysteme sind die symptomatischen Ausprägungen gift- und konzentrationsabhängig recht heterogen:

Tabelle 1-1
Einteilung von Symptomen einer Vergiftung mit Organophosphaten nach Rezeptortyp und -lokalisation (Schlagmann, Ulbrich et al. 1990; Taylor 1990; Marrs, Maynard et al. 1996; Lüllmann, Mohr et al. 1999; Dekant, Vamvakas et al. 2001; Oberdisse 2002).

Symptome durch muscarinerge Stimulation	
peripher	Drüsige Sekretionen (M_3- bzw. M_1-Rezeptoren) Bronchorrhoe, Transpiration, Rhinorrhoe, Lacrimation, Salivation, Magensaftsekretion Kontraktionen glatter Muskulatur (M_3-Rezeptoren) Bronchokonstriktion, verminderte Sicht (M. sphincter pupillae), Akkomodationsstörungen (M. ciliaris), Magen-Darm-Motilität / Spasmen (Koliken, Durchfälle, Erbrechen) Herz-Kreislauf Dämpfung (M_2- bzw. M_3-Rezeptoren) Bradykardie, neg. Inotropie (Atrium) und Dromotropie, Blutdruckabfall (EDRF-vermittelte Gefäßdilatation)
präsynaptisch	Neurotransmitterausschüttung gedämpft (M_2-Autorezeptoren) an cholinergen und adrenergen Neuronen (1. Neuron)

Symptome durch nicotinerge Stimulation	
peripher	gestreifte Muskulatur (motorische Endplatte, rel. unempfindlich) Faszikulationen, Tremor, Zuckungen, Schmerzen am Auge, später Muskelschwäche bis zur Paralyse (Diaphragma!)
ganglionär	Autonome Ganglien Sympathische oder parasympathische Reaktionen durch Symptome muscarinerger Stimulation am Effektororgan in der Regel überkompensiert. Überreizung bis zur Ganglienblockade möglich Nebennierenmark (neuronaler Typ nicotinerger Neurone, rel. hohe Giftdosen nötig) Initiale, catechlolaminvermittelte Tachykardie, Mydriasis (M. dilatator pupillae) sowie Hypertonie möglich. In der Regel durch Symptome muscarinerger Stimulation rasch überkompensiert.

Symptome durch vorwiegend muscarinerge Stimulation	
zentral	Atmungsantriebshemmung Sprachstörungen, Müdigkeit, Bewußtseinsstörungen, Verwirrtheit, tonisch-klonische Krämpfe, Koma

Die wichtigsten Vergiftungserscheinungen äußern sich peripher in Bronchorrhoe, Bronchokonstriktion, Schwitzen, Muskelfaszikulationen und -krämpfen mit darauffolgender Muskelschwäche und -lähmung, Bradykardie, Kopf-, Augenschmerzen und zentral in Bewußtseinstrübungen bis hin zu Krampfauslösung und Atemlähmung.

Vor allem ist mit einem lebensbedrohlichen Ausfall der Atmung zu rechnen. Für die zeitliche Abfolge der Symptomatik ist unter anderem die höhere Ansprechempfindlichkeit muscarinerger Rezeptoren auf Acetylcholin von Bedeutung (Oberdisse 2002). Eine Einteilung nach dem Schweregrad der Vergiftung gibt untenstehende Tabelle.

Tabelle 1-2
Symptome einer Organophosphatvergiftung nach Schweregrad (EMEA 2003)

Schweregrad	**Gering**
Patientenbild	Fähig zu laufen
Klinische Symptome	Lakrimation, Salivation, Miosis, unscharfes Sehen und Augenschmerzen, Husten, leichte Bradykardie, Schwitzen, Nausea, Erbrechen, abdominale Schmerzen

Schweregrad	**Mittel**
Patientenbild	Nicht mehr fähig zu laufen, aber noch spontan atmend
Klinische Symptome	Wie geringer Schweregrad plus: Dyspnoe, Schnaufen / Keuchen, Enge in der Brust, Zittern, Diarrhoe, Harn- und Stuhlinkontinenz, Koma

Schweregrad	**Schwer**
Patientenbild	Keine Spontanatmung mehr
Klinische Symptome	Wie mittlerer Schweregrad plus: peripherer und zentraler Atmungsblock, epileptiforme Krämpfe, Muskelschwäche bis -lähmung

Je nach Menge des Gifts und in Abhängigkeit von frühzeitigem Handeln ist die Prognose unter Therapie mit Atropin, Oximen, gelegentlich Benzodiazepinen, Bicarbonat und künstlicher Beatmung gut (Johnson, Jacobsen et al. 2000). Atropin wird hierbei vor allem symptomatisch kompetitiv gegen das Anfluten von Acetylcholin gegen Bronchokonstriktion, Bronchorrhoe und die zentrale Atmungshemmung eingesetzt.

Oxime, die einzigen kausalen Agenzien, sollen vor allem an der motorischen Endplatte gegen die sonst unweigerlich drohende periphere Atemlähmung wirken. Benzodiazepine und Bicarbonat als unterstützende Wirkstoffe können praktisch nur unter Fremdhilfe wiederum symptomatisch Krampfanfälle bzw. die respiratorische Acidose unter Kontrolle halten.
Die Auswertung von Vergiftungsfällen ergab, daß die Symptome bald nachließen, wenn die Aktivität der Acetylcholinesterase nach Reaktivierung (Dephosphylierung) durch Oxime wieder über 20% der Normalaktivität stieg (Thiermann, Szinicz et al. 1999). Es gibt also eine kritische Schwelle für die Mindestaktivität der Acetylcholinesterase.

In diesem Zusammenhang darf auch die sogenannte Alterung phosphylierter Acetylcholinesterase und ihre Kinetik als wichtige Gegenreaktion nicht vergessen werden, da sie die Wirkung von Oximen zunichte macht. Denn wenn ein weiterer organischer Alkoholrest vom Phosphylrest des blockierten Enzyms abhydrolysiert, wird im Gegenzug die Phosphylat-Serinbindung unerwünscht stark stabilisiert. Das Enzym ist dann nicht mehr mit Oximen regenerierbar (reaktivierbar). Es ist „gealtert“ und muß durch langsame de-novo Synthese ersetzt werden.
Bei Dimethylphosphoryl-Verbindungen beispielsweise kann von einer Alterungshalbwertszeit von rund 4 Stunden (Worek, Diepold et al. 1999), bei Diethylphosphoryl-Verbindungen mit rund 31 Stunden ausgegangen werden

(Mast 1997; Worek, Bäcker et al. 1997). Bei Nervenkampfstoffen, die Phosphonsäureester darstellen, reicht dagegen die Spanne von 2 min (Soman) bis zu 48 Std (VX) (Szinicz and Baskin 1999).

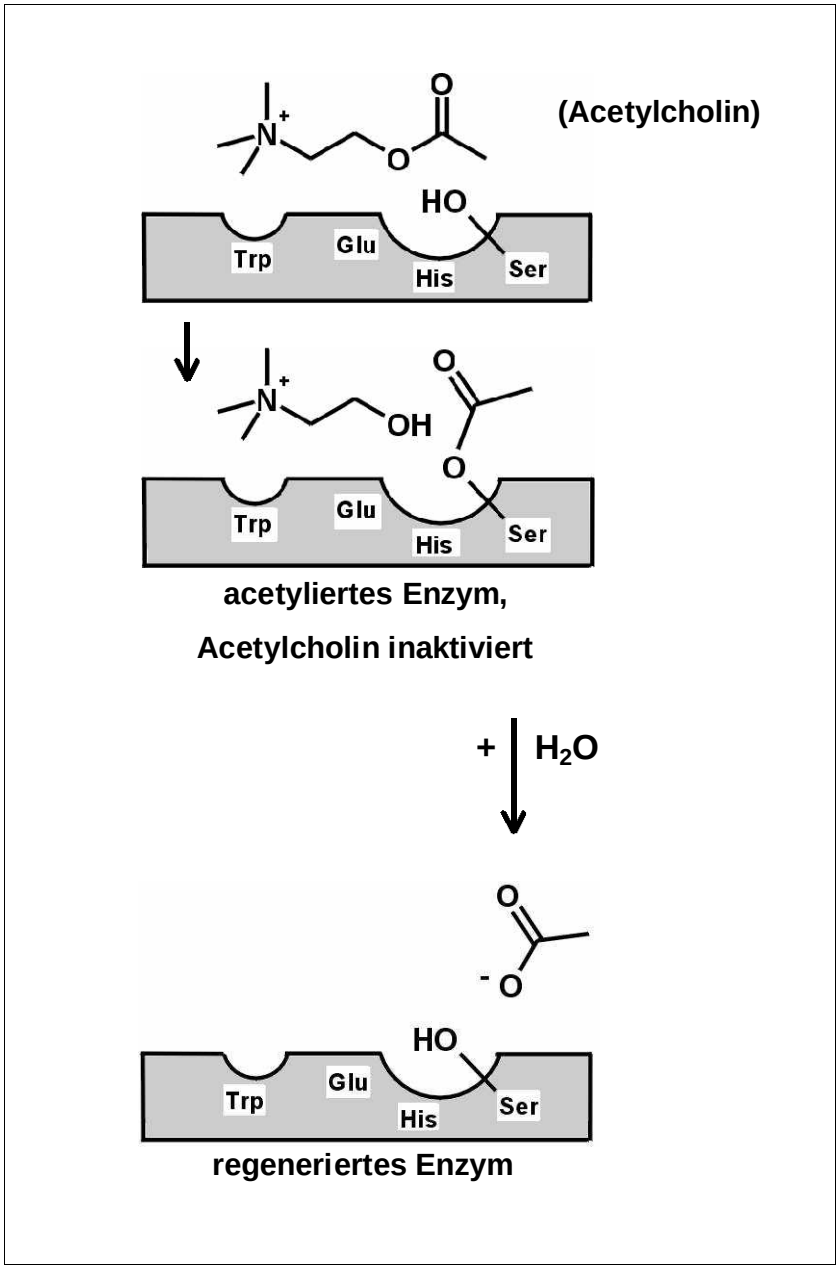


Abb. 1-5
Schema der physiologischen Funktion der Acetylcholinesterase. Aminosäuren des esteratischen Zentrums: Glu, His, Ser. Prominente Aminosäure des sogenannten „anionischen“ Zentrums: Trp. (Eyer 1996; Starke 2001; Oberdisse 2002: mod.)

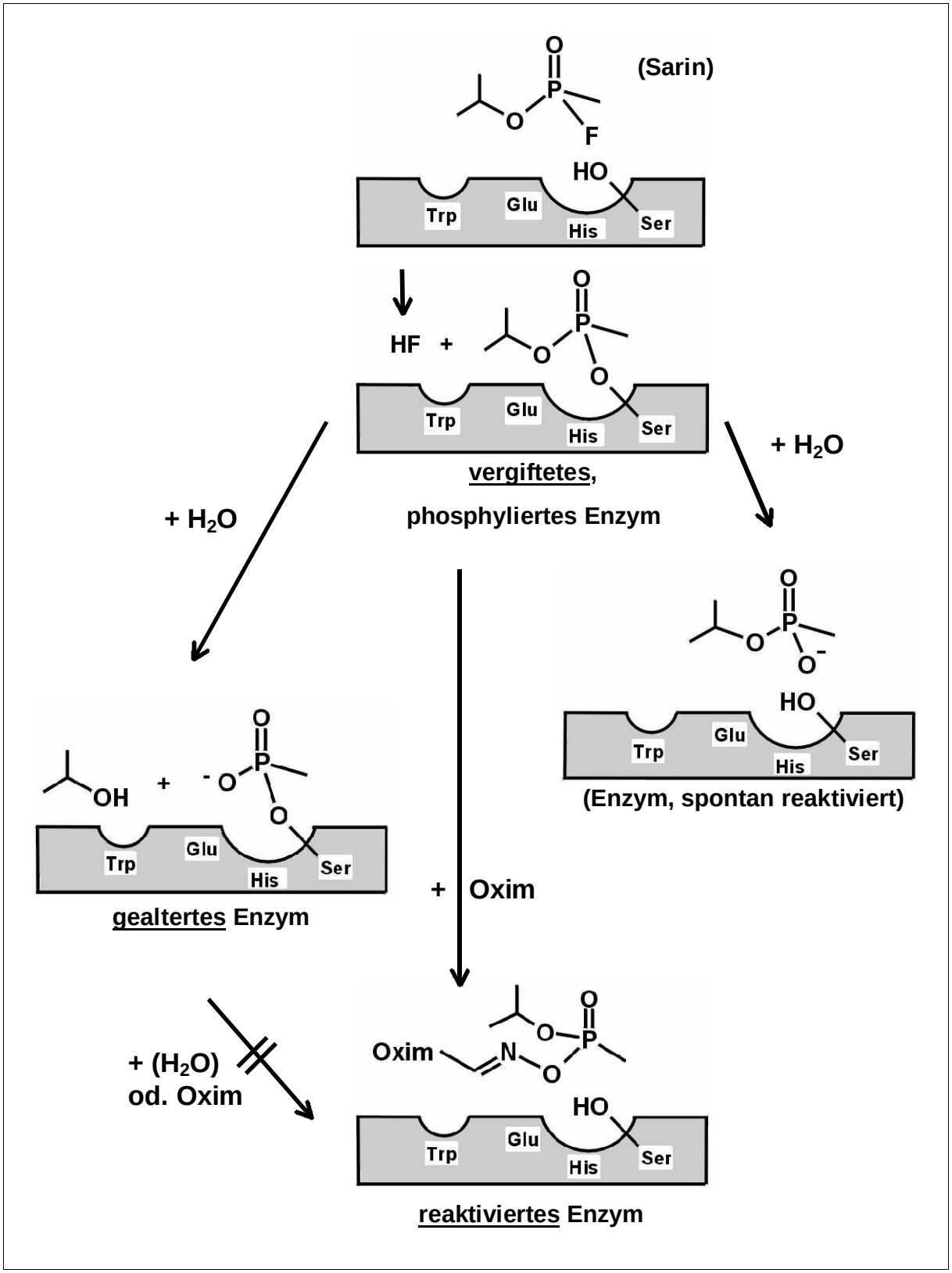


Abb. 1-6
Schema der Vergiftung, Alterung, Reaktivierung und Spontanreaktivierung der Acetylcholinesterase am Beispiel von Sarin. Aminosäuren des esteratischen Zentrums: Glu, His, Ser. Prominente Aminosäure des sogenannten „anionischen“ Zentrums: Trp. (Eyer 1996; Starke 2001; Oberdisse 2002: mod.)

Sarin, Cyclosarin, Soman, VX, Tabun, Kampfstoffe mit einem Molekulargewicht von ca. 150 - 250 sind bei Raumtemperatur flüssig und sehr lipophil. Gut in Wasser löst sich nur Sarin. Die Stoffe weisen in reiner Form kaum einen warnenden Geruch auf. Sie gelangen oft gleichzeitig über Haut und Lunge in den Organismus oder an das Auge und werden rasch bis ins ZNS verteilt. Sie wirken in deutlich kleineren Dosen und schneller als die verwandten Phosphorsäureester-Pestizide. Ihre tödliche Dosis wird beim Erwachsenen auf 1-10 mg resorbierten Giftes geschätzt (Thiermann, Seidl et al. 1995). Symptome sehr unterschiedlicher Stärke treten in der Regel schnell, innerhalb weniger Minuten, aber auch erst nach bis zu 4 Stunden auf (Szinicz 1994).

Gegen Vergiftungen mit solchen Stoffen sind die verbreiteten Oxime Obidoxim (Toxogonin) und Pralidoxim nicht effektiv genug. Besonders gegen VX, Sarin oder Cyclosarin ist inzwischen das ausgiebig untersuchte und viel besser wirksame Oxim HI-6 für den breiten Einsatz verfügbar. Übertroffen wird es nur noch vom weniger beforschten HLö7, einer weiteren sogenannten Hagedorn-Verbindung (Eyer, Hagedorn et al. 1992; Worek, Widmann et al. 1999; Worek, Reiter et al. 2002).

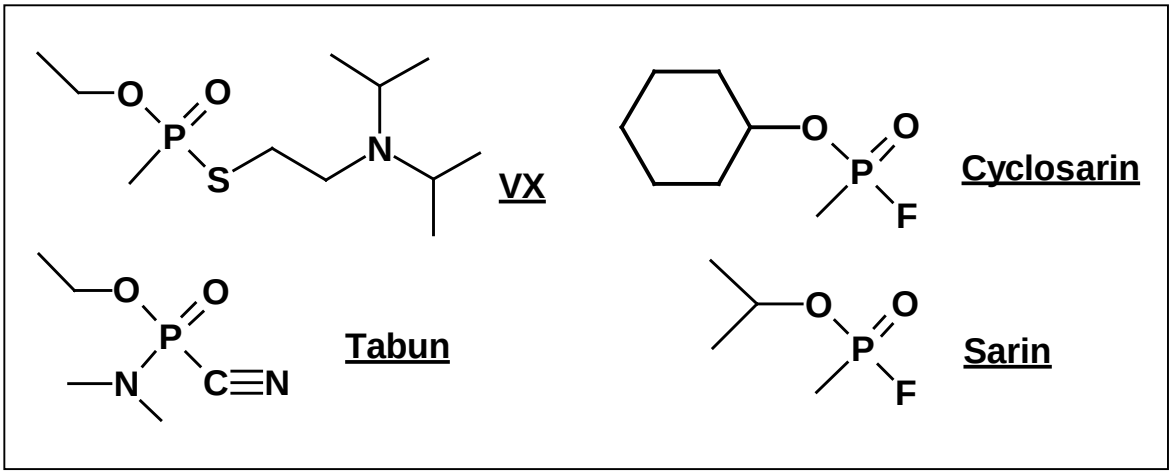


Abb. 1-7
Strukturformeln wichtiger Nervenkampfstoffe

Wie Pralidoxim wird HI-6 mit einer Atropinlösung (2 mg Atropin) kombiniert in Autoinjektoren für die Applikation in den lateralen Teil der Oberschenkelmuskulatur angeboten. HI-6 besitzt allerdings gegenüber dem schlechter wirksamen Pralidoxim den galenischen Nachteil, sich in wässriger, konzentrierter Lösung schnell eigenkatalytisch zu zersetzen (Ellin 1982; Eyer, Hagedorn et al. 1988). Dieses Problem wurde durch die Konstruktion von 2-Kammer- oder auch sogenannten binären Autoinjektoren umgangen. Sie sehen HI-6 in Form von trockenem Kristallpulver vor, das vor der Ejektion durch Verschütteln in einer Atropinlösung aus der zweiten, abgetrennten Kammer gelöst werden muß.

Zur Beherrschung von Organophosphatvergiftungen ist eine schnelle Antidotverabreichung eine überlebensentscheidende Forderung. Deshalb wurden bisher maximal 5 Sekunden für das Lösen eines festen Oximreaktivators (HI-6 Salz) und maximal 5 Sekunden für das Ejizieren der fertigen Lösung veranschlagt.

Nachdem aber Untersuchungen mit dem Dichloridsalz von HI-6 (HI-6 2Cl) gezeigt hatten, daß dessen Löslichkeit und vor allem Lösegeschwindigkeit in der Kälte nicht ausreichten, war eine Alternative notwendig. Der Anionentausch von Chlorid gegen Methansulfonat zum HI-6 Dimethansulfonat (HI-6 DMS) verbesserte die Löslichkeit bei 5°C um das Fünffache (Thiermann, Seidl et al. 1996).

Fragestellungen

Die Löslichkeit bzw. Lösegeschwindigkeit der Reaktivatorsalze berührt einen von drei Themenkomplexen, mit denen sich die vorliegende Arbeit auseinandersetzte.

Funktion der Autoinjektorsysteme: Schnelligkeit und Vollständigkeit der Abgabe von HI-6 und Atropin.

Unter Laborbedingungen sind 5 Sekunden für das Lösen des Reaktivatorsalzes plus 5 Sekunden für die Ejektion der Atropin-/HI-6-Lösung eine lange Zeit.

Aber, nach der Wahrnehmung cholinerger Symptome bei einer Nervenkampfstoffexposition und dem Entschluß zum Einsatz eines Autoinjektors vergehen für einen trainierten Anwender mit kühlem Kopf vielleicht 15 s, bis die lebensrettende Injektion aus dem bereits in einigen Armeen eingeführten Astra-Injektor (Thiermann, Seidl et al. 1995) abgeschlossen ist. Im Ernstfall werden allerdings Angst und Panik sowie eine beginnende Inkapazitierung diese Zeit erheblich verlängern. Findet dann auch noch eine Fehlbedienung auf Grund einer komplizierten Handhabung statt, ist die nutzbare Zeit für gezieltes Handeln vielleicht überschritten und eine Rettung aus eigener Kraft nicht mehr möglich.

Hieraus ergaben sich folgende Einzelfragen:

- Ist HI-6 Dimethansulfonat dem Dichloridsalz für die Applikation unter extremen Bedingungen in jedem Fall überlegen?
- Ist die bisherige Mindestapplikationszeit von 10 Sekunden ohne Einbußen an anderer Stelle reduzierbar?
- Können die getesteten Autoinjektoren den vermuteten Widerstand angespannter (Angst) oder krampfhaft verhärteter Oberschenkelmuskulatur (Giftwirkung) überwinden?

  Beispielsweise einen Gegendruck von 1,5 bar, ein Wert, der bislang nur orientierenden Charakter besitzt. Er wurde bei Versuchen an einem Oberschenkel eines frisch geschlachteten Schweines und an Beagle-Hunden gemessen (Spöhrer, Thiermann et al. 1994; Thiermann, Spoehrer et al. 1994).

Haltbarkeit von HI-6 Kristallpulver in Autoinjektoren

Einen kritischen Punkt stellt die Abtrennung zwischen Pulverbett und wäßriger Atropinsulfatlösung dar. Sie war in den zu prüfenden Injektorsystemen entweder mit einer aufgeschweißten, kunststoffkaschierten Aluminiumfolie (Fa. Astra Tech, Fa. Survival Technology Inc.) oder mit einer Mikrogummischeibe (Fa. Meridian Medical Technologies) vorgenommen worden. Die langfristige Dichtigkeit der Folienversiegelung in Astra-Autoinjektoren stand in Frage, als Inspektoren der OPCW mit HI-6 2Cl gefüllte Injektoren im Nahen Osten vorführten und einige Exemplare eine dunkelgrüne, statt wie erwartet, eine farblose Lösung ejizierten (Davey 2001). Nach bisherigen Erkenntnissen kann vermutet werden, daß die Farbe von polymerisierenden, schließlich teerartigen Abbauprodukten stammt (Eyer and Hell 1985; Eyer, Hell et al. 1986).

Ob der Fehler bei der Herstellung erfolgt war oder bei Transport und Lagerung nach extremen Temperaturgängen auftrat, bleibt noch zu untersuchen. Eine Korrosion der Aluminiumfolie mit anschließendem Atropinlösungsdurchtritt wäre bei fehlerhafter Kunststoffkaschierung ebenfalls denkbar. Eine Diffusion von Wasserdampf durch die Kunststoffteile der Ampulle von außen ist schon schwerer vorstellbar, aber bei langer Lagerung nicht ausgeschlossen. Kondensat auf den HI-6 Kristallen in den 2-Kammer-Ampullen der Injektoren hätte jedenfalls hoch konzentrierte HI-6 Lösungen auf den Kristalloberflächen zur Folge.

Bei HI-6 2Cl gefüllten Astra-Injektoren, die 6 Monate bei 25°C/60% r.F. oder 40°C/75% r.F. gelagert worden waren, konnte z. B. eine Verfärbung des Salzes von altweiß bis grau oder grün beobachtet werden (Clair, Wiberg et al. 2000). Eine Beteiligung von in die Pulverkammern gelangtem Wasserdampf könnte hierbei eine Rolle gespielt haben. Eine Zersetzung trockenen HI-6 Pulvers innerhalb von 6 Monaten, ob als 2Cl- oder als DMS- Salz, bei 50°C

in Glas unter Schutzgasatmosphäre aufbewahrt, war jedenfalls in einer früheren Untersuchung nicht beobachtet werden (Schreiner 1998).

Die in dieser Arbeit untersuchten Injektorengehäuse boten zumindest keine Möglichkeit eine Verfärbung der Reaktivatorsalzfüllung durch Sichtprüfung festzustellen.

Hieraus entwickelten sich folgende Fragen:

- Worauf ist bei der Herstellung von HI-6 Dimethansulfonat zu achten, um eine stabile Lagerform des Salzes zu erhalten?
- Welche chemischen Veränderungen sind in welcher Geschwindigkeit zu erwarten, wenn die beiden untersuchten HI-6 Salztypen, Dichlorid Monohydrat und Dimethansulfonat, schon lange vor der Applikation gewollt oder ungewollt bereits in konzentrierter, nicht gepufferter Lösung vorliegen?

<u>Änderung der pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften von HI-6 während der Zersetzung in konzentrierter, ungepufferter Lösung</u>

Ein Literaturbericht von Clement et al. (1988) erinnerte an möglicherweise antagonistische Wirkungen gefundener Zersetzungsprodukte. Besonders, als dort von einem bräunlich gefärbtem HI-6 2Cl Salz die Rede war, das zwar auch eine höhere Toxizität, vor allem aber eine geringere therapeutische Wirkung zeigte. So lag die ED_{50} bei Sarin-vergifteten Mäusen um den Faktor 6 höher! Diesem alarmierenden Befund wurde in der Folgezeit erstaunlich wenig Beachtung zuteil.

Damit war zu prüfen:

- Hat die berichtete Wirkungseinbuße etwas mit den gefundenen Zersetzungsprodukten zu tun?
- Entfalten sie einzeln oder in Mischung eine drastische Einschränkung der HI-6 Wirkung?

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Standards

Sofern nicht anders angegeben, waren alle Reagenzien von p. a. oder besserer Qualität und kamen von Merck, Darmstadt, Deutschland.

HI-6 Dichlorid Monohydrat (HI-6 2Cl), Goldstandard des Arbeitskreises (DRES - Defense Research Establishment Suffield - Ralston, Alberta) Gehalt 99,6%. MW 377,2. Molarer Extinktionskoeffizient 12,14 x 10^3 cm^{-1} M^{-1} (Spöhrer 1994). Arbeitsstandard **HI-6 2Cl**, Ch.: S/02/94, mit 99,6% Gehalt (STI, International Ltd in Rochester, Kent, England). Wäßrige, 2,5 mM oder 200 µM Lösungen davon waren bei -20°C 1/2 Jahr haltbar.

Isonicotinsäure, (INS), Standardsubstanz, MW 123,11, 98% (EGA-Chemie, Steinheim/Albuch, Deutschland). **Isonicotinsäureamid**, (INA), Standardsubstanz, MW 122,13, 99%; **2-Pyridinaldehyd**, (2-PA), Standardsubstanz, MW 107,11, 99% (Aldrich, Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland). **2-Pyridon,** (2-PO), Standardsubstanz, MW 95,1, 97%; **2-Pyridinaldoxim**, (2-PAO), Standardsubstanz, MW 122,13, 98%; **2-Pyridinnitril,** (2-PCN), Standardsubstanz, MW 104,11, 99% (Merck, Darmstadt, Deutschland).
30 mM methanolische Stammlösungen der aufgeführten Standardsubstanzen waren bei -20°C 1,5 Jahre haltbar, wobei speziell INS in 30 mM methanolischer NaOH aufgelöst worden war.

In-situ-Standards für Identifizierungszwecke: M1, 2-Pyridinon,1-(((4-carbamoylpyridinio)methoxy) methyl)chlorid, das „Pyridonamid“ von HI-6 und **M2,** 2-Pyridinon,1-(((4-carboxypyridinio)methoxy)methyl)chlorid, die „Pyridonsäure“ von HI-6 sowie in Spuren **M3,** Pyridinium,1-(((4-carboxypyridinio)methoxy)methyl-2-(hydroximino-methyl)dichlorid, die sogenannte „HI-6 Säure“, bildeten sich in 1 mM wäßrigen Lösungen von HI-6 2Cl bzw. DMS in 0,1 M Phosphatpuffer bei pH 9,0, in 5,5 Stunden Inkubation bei 37°C. Anhand der Peak-Lage in einem zu den hier verwendeten M3/HI-6 Methoden ähnlichen HPLC-System und anhand ihrer DAD-Spektren konnten die drei Verbindungen den Peaks zugeordnet werden (Eyer, Hell et al. 1986).

Verdünnungen in bidest. Wasser oder in diversen mobilen Phasen der HPLC-Methoden von 30 mM bis hinunter zu 5 µM waren in Kunststoffgefäßen bei -20°C bis zu 1,5 Jahre haltbar.

2.2 Verwendete HI-6 Salze

2.2.1 HI-6 Dichlorid Monohydrat (HI-6 2Cl)

Survival Technology Inc. (STI)

Die Verbindung wurde freundlicherweise von G. Ritson (STI International Ltd in Rochester, Kent, England) zur Verfügung gestellt und stammte von Phoenix Chemicals (s. u.). Chargen-Nr.: S/02/94. MW 377,2, theoretischer Kristallwassergehalt 4,8%.
STI-Analysenwerte 09.04.99: mäßig weiße Kristalle, Reinheit per HPLC 99,6%, Verunreinigungen per HPLC max. 0,2%, Trocknungsverlust 0,5% und Wasser nach Karl-Fischer 6%.
Eigene Analysenwerte: IR-Spektrum, mit dem des Goldstandards identisch. UV-Intensität des Maximums bei 217 nm und der Schulter 273 nm im Verhältnis zum typischen Maximum bei 300 nm der Oximfunktion mit 1,28 / 1,29 und 0,75 / 0,76 im Vergleich zum Goldstandard fast identisch. Schmelzpunkt 137°C unter Zersetzung, ohne großen Unterschied zur Literaturangabe von 135-136°C (Clement, Lockwood et al. 1988). Photometrisch bestimmter Gehalt bei 300 nm, 99,6% (Goldstandard, 100,5%). Verunreinigung per HPLC nach der Methode bei Schreiner 0,26% gegenüber 0,07% für den Goldstandard (Schreiner 1998). Eine Siebanalyse mit Korngrößen hauptsächlich im Bereich von 140 - 500 µm war bereits beschrieben (Schreiner 1998).

Phoenix Chemicals

Weiteres Material von gleicher Färbung und augenscheinlich nicht anderer Körnung stammte dankenswerterweise von G. Bishop (Phoenix Chemicals, Bromborough, England), Chargen-Nr.: S/02/94/2. Im Vergleich zum STI-Material zeigte sich ein bei 300 nm photometrisch bestimmter Mindergehalt von lediglich minus 0,3%, n = 1. Die Identität wurde über vergleichende IR-Spektrometrie gesichert.

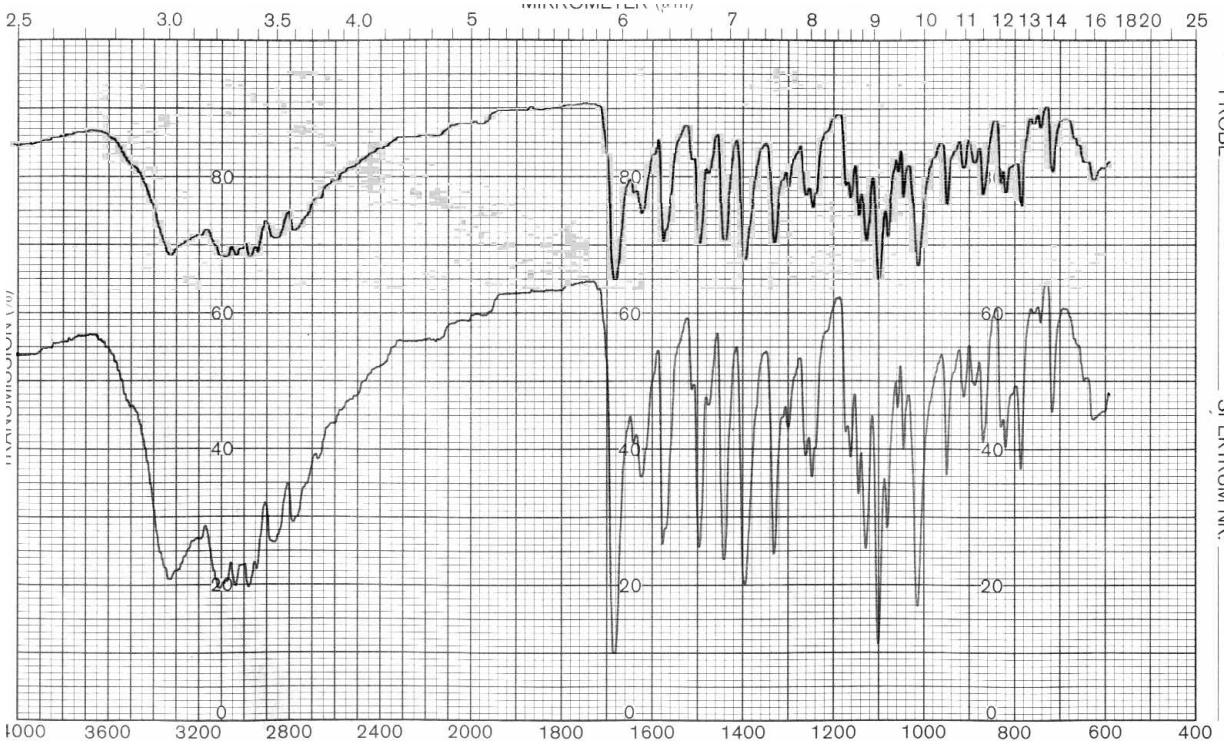


Abb. 2-1

Überlagerte IR-Spektren von KBr-Presslingen. HI-6 2Cl von Phoenix (oberes Spektrum) und STI (unteres S.). Skala unten: Wellenzahl in cm^{-1}. Skala oben: Wellenlänge in µm.

Die IR-Spektren waren absolut identisch. Im Bereich von 2700 - 3400 cm^{-1} präsentierten sich Streckschwingungen der Oxim O-H, der Amid N-H und der C-H Bindungen der Oxydimethylenbrücke. Die Bande um 1685 cm^{-1} war in der Literatur der C=O Carbonylstreckschwingung zugeordnet worden (Korte and Shih 1993). Die Bande um 1645 cm^{-1} könnte die N-H Biegeschwingung des primären Amids darstellen. Die C=N Bindung im aromatischen Aldoxim könnte die Bande um 1615 cm^{-1} verursacht haben. Von 1600 - 1500 cm^{-1} tauchten für aromatische Systeme charakteristische C=C Streckschwingungen auf. Die starke Bande um 1015 cm^{-1} könnte der N-O Streckschwingung des Aldoxims angehören (Pouchert 1981).

2.2.2 HI-6 Dimethansulfonat (HI-6 DMS)

Das zum HI-6 2Cl analoge Salz ließ sich durch Austausch der Chlorid- gegen Methansulfonat-Ionen herstellen. MW 478,5.

Herstellung

Methansulfonsäure (MSA), 70%ige bzw. 99%ige wäßrige Lösung und Ionentauscherharz Dowex 1 x 2-200 (Dowex-1-Chlorid, stark basisches Anion, 2% cross-linking, 100-200 mesh), Aldrich, Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland.

Natriumhydroxid reinst, Ph. Eur., Ethanol 96% DAB, 100% vol. Merck, Darmstadt, Deutschland bzw. Ethanol 92% und 95% vol., redestilliert aus den vorgenannten. Wasser, demineralisiert und anschließend in einer Quarzapparatur doppelt destilliert (Aqua bidest.).
Die Ausgangssalze von STI oder Phoenix Chemicals wurden nicht gemischt, sondern getrennt verarbeitet.
Eingesetzt wurden 225 g Ionentauscherharz. Nach Überführen in die Methansulfonatform und Equilibrieren mit 3,5 mM wies der Ablauf aus dem Gelbett (60 x 105 - 130 mm) eine Leitfähigkeit von 1,4 mS/cm und einen pH von 2,5 auf. Für die Chromatographie wurden je Lauf 50 g HI-6 2Cl ad 700 ml bidestilliertem Wasser (189 mM) gelöst, wobei die Lösung merklich abkühlte. Gelöst nahm das Salz ein Volumen von 0,77 ml/g Substanz ein. Nach Aufgeben auf die Säule wurde mit ca. 5 ml/min 3,5 mM Methansulfonsäure chromatographiert. Zum Ende der HI-6 Elution zeigte sich eine deutliche pH-Absenkung, die im Anhang kommentiert ist. Nach Detektion von HI-6 auf Filterpapier mit Natriumboratlösung 0,2 M, pH 9,2 (Gelbfärbung durch Oximatbildung) und argentometrischer Prüfung auf Chloridfreiheit konnten die 20 ml-Fraktionen mit HI-6 DMS vereinigt werden. Nach Lyophilisation wurde das gelblich glasartige bis großvolumig weiße, amorphe Produkt ad 80-90 ml (ca. 1,3-1,4 M) in bidestilliertem Wasser gelöst. Je 4 solcher Ansätze wurden vereinigt und das 6,9-fache Volumen 96%igen Ethanols (bzw. 6,8-fach für 100% Ethanol) bei Raumtemperatur zugegeben. Nach fraktionierter Abkühlung zunächst bei 6°C zur Bildung von Kristallkeimen, dann -20°C zur Nachkristallisation, wurde die Kristallsuspension auf der Glasfritte D4 abgesaugt und mit wenig 6°C kaltem Ethanol 96% (bzw. 100%) nachgewaschen. Das noch feuchte Produkt wurde bei ca. 28°C im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Primär- und Sekundärkristallisat (Plättchen) fielen mit einer Ausbeute von 87% (93% mit 100%igem Ethanol) der Theorie an. Nach Zerkleinerung im Mörser wies die Siebfraktion 355-101 µm als frei fließendes, gut verdichtbares Pulver die besten Eigenschaften auf (Kreßner-Sieb, 20 cm, Siebeinlagen mit Kunststoffgewebe nach DIN 4195/4197: 0,355 und 0,1 mm). Diese und die Fraktion unter 101 µm wurden bis zur Verwendung bei 6°C gelagert.

Wurde statt mindestens 96%iger 92%iger Ethanol für die Kristallisaton verwendet, resultierte eine andere Kristallform. Neben wenig plättchenartigem Kristallmaterial entstand eine etwa 20-fach voluminösere, nadelige

Kristallmasse, die umgearbeitet werden mußte. Die verschiedenen Kristallformen von HI-6 DMS oder 2Cl werden im Anhang abgehandelt.

HI-6 DMS mit der Ch.-B.: 1099-1 bzw. 1099-2

Gewonnen aus HI-6 2Cl von STI. Siebfraktion 101 µm - 355 µm. Schüttdichte 0,71 g/ml, Stampfdichte 0,88 g/ml, Reinheit per HPLC (254 nm) 99,9%, Gehalt per UV (300 nm bei pH 2 mit $\varepsilon_{mM/cm}$= 12,14) 100,3%, vorherrschend rechtwinklige Plättchen, in mitteleuropäischem Klima bei Raumtemperatur oder 6°C keine Anzeichen für Hygroskopizität.
Dieses Material wurde zur Füllung der Autoinjektoren der Firma Astra und ein kleinerer Teil der Firma Meridian Medical Technologies übergeben.

HI-6 DMS mit der Ch.-B.: 0601-1

Gewonnen aus HI-6 2Cl von Phoenix Chemicals. Siebfraktion 101 µm - 355 µm. Reinheit per HPLC (300 nm) 99,9%, Gehalt per UV (300 nm bei pH 2 mit $\varepsilon_{mM/cm}$= 12,14) 98,0%, vorherrschend rechtwinklige Plättchen. Das Material wurde zur Füllung der Autoinjektoren der Firma Meridian Medical Technologies übergeben.

Photometrische Bestimmung von Chloridspuren in HI-6 DMS

Die Bestimmung erfolgte nach der modifizierten photometrischen Methode von Williams (Iwasaki and Utsumi 1952) im Bereich von 50-350 µM Cl^- in der Probelösung, angepaßt an HI-6-haltige Lösungen. Hierbei reagiert $Hg(SCN)_2$ mit Cl^- in $HClO_4$-saurer Lösung zu unlöslichem $Hg(Cl)_2$. Freigesetzte SCN^--Ionen bilden mit Fe^{3+}-Ionen einen farbigen Komplex, der bei 460 nm photometriert werden kann (Williams 1979):

(1) $2Cl^- + Hg(SCN)_2 \rightarrow HgCl_2 + 2\ SCN^-$ (niedrige Cl^- Konzentration).
(2) $SCN^- + Fe^{3+} \rightarrow Fe(SCN)^{2+}$ (vorwiegend).

Zur Kalibration wurden Verdünnungen handelsüblicher HCl 0,1 M Titrierlösung verwendet. Gemessen wurde gegen wasser- oder methansulfonsäurehaltige Matrixkontrollen. In den Reaktionsansatz wurden nacheinander in eine Halbmikro-Einmalküvette pipettiert und anschließend gemischt: 200 µl Aqua bidest. oder Matrixlösung, 200 µl Probelösung, 225 µl 60%ige $HClO_4$, 90 µl

0,3%ige $Hg(SCN)_2$ in 95% v/v Ethanol, 135 µl $Fe(NO_3)_3$*9 H_2O, 6,9 g/100 ml $HClO_4$ 4M. Nach 10 Minuten wurde photometriert.

Der Blindwert erzeugte eine Absorption von 85 mE, eine Lösung mit 350 µM Cl^- im Mittel 336 mE (n=2) ohne Blindwertabzug. Die Geradenanpassung an 8 Kalibrationswerte mit dem Achsenabschnitt 85 mE lieferte einen Korrelationskoeffizienten von 0,9980. Der VK für die Werte betrug 4,4 %.

2.3 Verglichene Autoinjektoren (Charakteristika)

Herkunft der geprüften Injektoren

Die Injektoren von Astra Tech (Astra), befüllt mit HI-6 DMS Ch.-Nr.: 1099-1, wurden von K. Wellenstam zur Verfügung gestellt (Astra Tech AB, Mölndal, Schweden). Die Injektoren von Meridian Medical Technologies (MMT), befüllt mit HI-6 DMS, Ch.-Nr.: 1099-2/0601-1 und mit HI-6 2Cl nicht bekannter Herkunft, wurden von B. Hill übergeben (Meridian Medical Technologies, Columbia, USA). Bis zur Untersuchung wurden alle Injektoren bei 6°C gelagert. Technische Daten finden sich im Anhang.

Die zu Vergleichszwecken ebenfalls erwähnten STI-Injektoren (Spöhrer 1994; Schreiner 1998) stammten damals von STI International Ltd., Frindsbury, Rochester Kent ME2 4DP, UK (STI).

Auflöseprinzip und -vorgang

Alle miteinander verglichenen Injektoren zeichneten sich durch 2 verschiedene Auflöseprinzipien für HI-6 Salze, durch 3 Ampullen- sowie Injektorbauweisen und jeweils unterschiedliche Anwendungsvorgänge aus (Tabelle 2-1).

Tabelle 2-1
Auflösetechnik verschiedener HI-6 Autoinjektortypen.

	Astra Tech	**STI[1)]**	**Meridian Medical Technologies**
Start der Auflösung	Zerstören einer Aluminiumlaminat-Membran: Pulverteilchen fallen ins Solvent	Zerstören einer Kunststoffmembran: Solvent gelangt durch ein Metallsieb an das Pulver	Öffnen eines Gummi-mikrostopfens: Solvent gelangt durch ein 10 µm Filter (Flußver-teiler) in das Pulverbett
Mischkammer	ungeteilt	mit Metallsieb geteilt	ungeteilt
Auflöseprinzip	turbulentes Schütteln von Teilchen im Solvent mit Luftblasen[2)]	turbulentes Schütteln von Teilchen im Solvent mit Luftblasen[2)]	Pulverbett, das ohne Schütteln von Solvent durchströmt und dabei aufgelöst wird
Partikelrückhal-tung bei Ejektion	keine	Metallsieb in Mischkammer	10 µm Filter vor Kanülenausgang

1) Von Spöhrer 1994 und Schreiner 1998 untersucht. 2) Mischkugelartiger Effekt.

Befüllung

In den Untersuchungen wurde der geringe Atropingehalt vernachlässigt. Wie die Tabelle 2-2 unter anderem zeigt, sollten die Injektoren rund 85%-90% der eingefüllten HI-6 Dosis bei Raumtemperatur abgeben können.

Tabelle 2-2
Gefundene Füllmengen und spezifizierte Abgabemengen der verglichenen Autoinjektoren bei Raumtemperatur.

	Astra Tech		**STI [1)]**		**Meridian Medical Technologies**	
Salztyp	DMS	2Cl [1)]	DMS	2Cl	DMS	2Cl
mg HI-6 Salz eingefüllt	513 ± 5	500 ± 25	750	600	691 ± 3	577 ± 5
mg HI-6 Salz, spezifizierte Abgabemenge	-	-	-	500	625 ± 60	500 ± 50
spezifizierte HI-6 Abgabemenge in % der Füllmenge	-	-	-	83,3	90,5	86,7
mg Atropin, Füllmenge	2	2	2 [2)]	2 [2)]	2	2
ml wäßrige Atropin-sulfatlösung, eingefüllt	2,9	3,0 [3)]	2,4	2,4	2,5	2,9
pH der Atropinlösung	-	3,9	6,5	6,5	-	-

1) Spöhrer 1994; Schreiner 1998. 2) Abgabespezifikation. 3) In Citratpuffer.

Messung der Federkonstanten der Injektorenfedern

Zur Messung der Kraft wurde eine Oberschalenwaage benutzt. Die Feder wurde hierzu auf die Oberschale gestellt, ein oben verschlossenes, kürzeres Rohr als Führung mit Anschlag darübergestülpt und auf Null tariert. Nach schrittweisem Zusammendrücken der Feder entsprechend jeweils 50 g abgelesener, zusätzlicher Masse mittels des Rohres wurde die Verkürzung der Feder in cm im Bereich von 0 - 250 g gemessen.
Nach Umrechnung der Masseschritte in Gewichtskraftschritte mit Hilfe der Erdbeschleunigung und der jeweiligen Federverkürzung, in m ausgedrückt, konnte die Konstante in N / m berechnet werden. Die Reibung der Feder an dem Führungsrohr wurde hierbei vernachlässigt.

Aufbau der Meridian Autoinjektoren

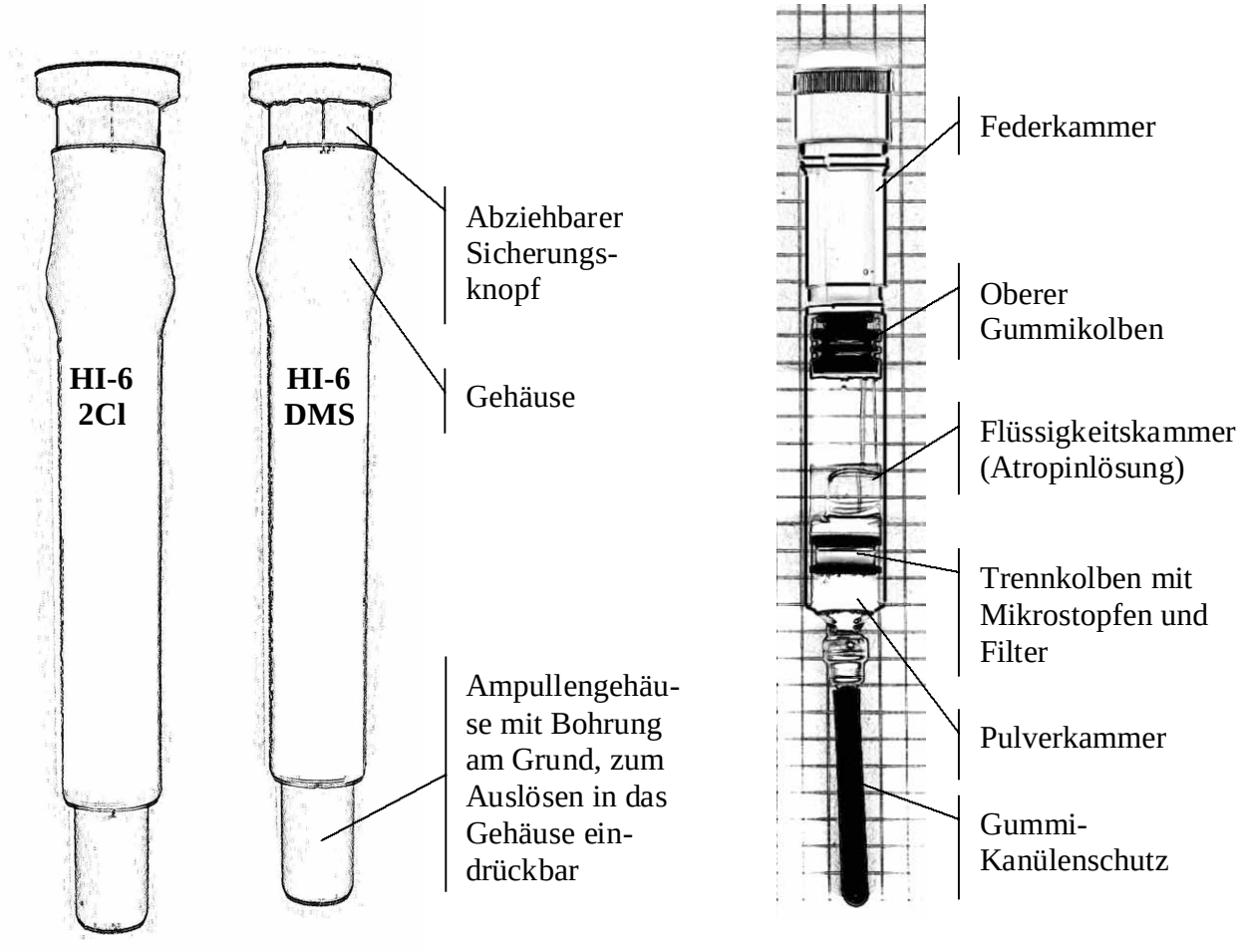


Abb. 2-2
Gehäuse und Innenleben der Injektoren von Meridian Medical Technologies.

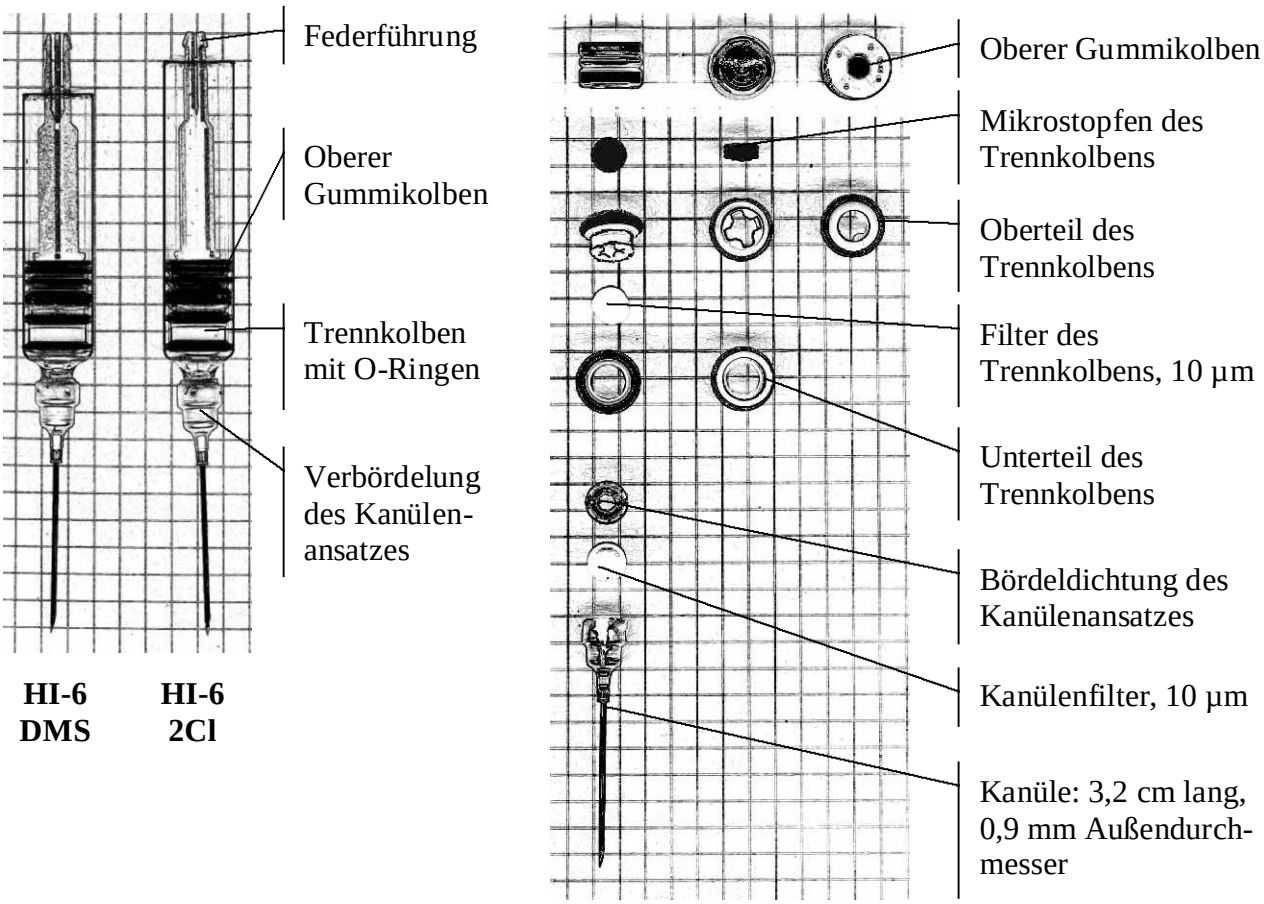


Abb. 2-3

Ampullen der Autoinjektoren von Meridian Medical Technologies.
Weite des Untergrundrasters: 5 mm. Links: nach Abschuß des Injektors. Rechts: Einzelteile im Explosionsschema von oben nach unten aus unterschiedlicher Sicht.

2.4 Häufig verwendete Meßeinrichtungen und -geräte

Infrarotspektroskopie

IR-Spektrometer, PE 710B IR (Perkin Elmer Analytical Instruments, Shelton, USA). KBr-Preßlingtechnik, in der Regel 1,5 mg Substanz / 300 mg KBr.

Mikroskopische Untersuchungen

Mikroskop mit Photographiereinrichtung, Zeiss Axioskop mit Pl 10 x/20 Zeiss-Okularen, 10 x, 20 x und 40 x, Neofluar Objektiven (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Objektmikrometer, 1 mm in 0,01 mm Teilung, OMO-Y 4.2, Serie N 740147 (Russland).

Schmelzpunktbestimmungen

Heiztisch-Mikroskop, Leitz Wetzlar 350, Vergrößerung: 6 x 8, Aufheizgeschwindigkeit ca. 2-4 °C / min. (Leitz, Wetzlar, Deutschland). Kalibration mit Schmelzkörpern (Merck, Darmstadt, Deutschland).

Dichtebestimmung im Mikromaßstab bei Raumtemperatur

Gilson Luftpolsterpipetten verschiedenen Volumens (Gilson Medical Electronics S. A., Villiers-le-Bel, Frankreich). Kalibriert mit Aqua bidest. zur Verwendung als variable Mikropyknometer.

Lösungsabmessung bzw. -dosierung in Reihenverdünnungen

Gilson Luftpolsterpipetten und Direktverdrängerpipetten verschiedenen Volumens (Gilson Medical Electronics S. A., Villiers-le-Bel, Frankreich); Dispenser 25 ml (Brand, Wertheim, Deutschland). Kalibration jeweils mit Aqua bidest..

Messungen des pH-Werts

pH-Meßgerät, Knick Digital-pH-Meter, Typ 647 (über Bachhofer, Reutlingen, Deutschland). pH-Elektrode, Mettler Toledo Inlab 423 (Mettler Toledo, Deutschland). Kalibrierung mit Puffer pH 4,00 und Puffer pH 7,00 (Merck, Darmstadt, Deutschland).

Leitfähigkeitsmessungen

Konduktometer, Schott CG 858 (Schott, Hofheim a. T., Deutschland). Leitfähigkeitszelle, Schott LF 3100 T, K = 0,96 (wie eben). Schraubdeckelvials, 5 ml und 1,5 ml mit Teflon-Silikonseptum (Zinsser-Analytik, Frankfurt am Main, Deutschland).

UV/VIS-Photometrie

Spektrophotometer, Shimadzu UV 265 und UV 2401 PC (Shimadzu Deutschland-GmbH). Polystyroleinmalküvetten, makro oder halbmikro (Brand, Wertheim, Deutschland oder Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Quarz-Küvetten, mikro oder halbmikro (Hellma, Freiburg i. Br., Deutschland).

HPLC-Untersuchungen

DAD-System: Software Shimadzu Class LC-10 1992, Diodenarraydetektor Shimadzu SPD-M6A, Shimadzu-Detektorzelle, 10 mm, 8 µl (Shimadzu Deutschland GmbH). 1 1/2 Kopf-Pumpe mit Niederdruckgradientenformer, Merck Hitachi L-6200 intell. Pump (Merck, Darmstadt, Deutschland). Injektorventil Rheodyne 7125 mit 1000 µl Probenschleife (Rheodyne, Cotati, USA).
Festwellenlängensystem: Merck Hitachi D2500 Chromato-Integrator, Merck Hitachi L-6200A intell. Pump (1 1/2 Kopf-Pumpe mit Niederdruck-gradientenformer) Merck Hitachi AS 4000A Autosampler (Merck, Darmstadt, Deutschland). Shimadzu SPD-10A vp UV-VIS-Detektor, Shimadzu 10 mm, 8 µl Detektorzelle (Shimadzu Deutschland GmbH), Rheodyne 7125 Injektorventil mit 200 µl Probenschleife (Rheodyne, Cotati, USA). Alternativ Shimadzu SPD-6AV UV-VIS-Detektor (Shimadzu Deutschland GmbH).

2.5 Häufig verwendete analytische Methoden

Photometrische HI-6 Bestimmung oder Aufnahme von Spektren

Lösen des Materials in 20 mM H_3PO_4. Berechnung der Konzentration mit dem molaren Extinktionskoeffizienten für beide Salze und M3 bei 300 nm von 12,14 x 10^3 cm^{-1} M^{-1} (Korte and Shih 1993; Spöhrer 1994).

HPLC-Bestimmung von HI-6 und M3 („HI-6 Säure“): <u>HI-6/M3 300nm</u>

Die Proben wurden in Aqua bidest. gelöst bzw. damit verdünnt. 5-1000 µM Lösungen wurden zu 100 µl injiziert. Eluent A bestand aus einer 5 mM wäßrigen Lösung von mit H_3PO_4 auf pH 3,3 eingestelltem Ionenpaarreagenz Waters PIC B7 Low UV (Heptansulfonat Natrium: Waters, Milford, England). Eluent B enthielt gleichviel Reagenz wie A, war aber 50%ig (v/v) methanolisch. Pumpenprogramm: 1,4 ml/min, t: 0-7,5 min/B: 4-56%, t: 7,5-14 min/B: 56%, t: 14-15 min/B: 56-4%, t: 15-18 min/B: 4%. Laufzeit: 18 min. Säule: PurospherStar Rp 18e, 55 mm/4 mm/3 µm: Merck, Darmstadt, Deutschland. Detektorwellenlänge: 300 nm, Festwellenlängendetektor. Kalibration mit externem Standard: 5, 200, 500 µM HI-6 2Cl. Für M3 wurde die response von HI-6 verwendet, denn bei 300 nm absorbiert nicht die Säure-/Säureamidgruppe, sondern die Aldoximfunktion beider Verbindungen,

deren Extinktionskoeffizient als identisch angenommen wurde (Korte and Shih 1993).

Alternative HPLC-Bestimmung von HI-6, M3 („HI-6 Säure"), 2-PAO, 2-PCN: HI-6/M3 250nm

Die Methode basiert auf der vorgenannten. Gemessen wird aber bei 250 nm. Die letzte Probenverdünnung findet in Eluent A statt. Mit der Methode können HI-6, PAO und PCN gleichzeitig bestimmt werden. Nicht identifizierte Peaks wurden als HI-6 berechnet. Gemessene INA- und INS-Konzentrationen waren etwa doppelt bis 4fach zu hoch, weshalb unter den Peaks weitere nicht identifizierte Stoffe vermutet wurden. Nach Abzug der Konzentrationswerte von INA und INS aus der INA/INS Methode und Division des Restes durch 2 wurden die Werte den nicht identifizierten zugerechnet.
Proben, etwa 350 mM an HI-6 wurden in Aqua bidest. zu 3,5 mM Stammlösungen (20 µl / 2000 µl) gelöst und anschließend mit Eluent A auf 525 bzw. 1050 µM verdünnt. Von diesen analysefertigen Verdünnungen wurden 100 µl injiziert.
Für einen externen Kombinationsstandard wurden wäßrige, 2 mM Referenzlösungen von HI-6, PAO, PCN, INS und INA gemeinsam in Eluent A auf 20 µM (PAO, PCN, INA), 60 µM (INS) oder 190 µM (HI-6) verdünnt und ebenfalls 100 µl injiziert.

HPLC-Bestimmung von 2-Pyridinaldoxim (2-PAO) und 2-Pyridinnitril (2-PCN): PAO/PCN

Isokratischer Eluent: 5%ige (v/v) methanolische Lösung eines 50 mM Natriumphosphatpuffers, pH 6,0. Spülen mit Acetonitril 70% v/v. Fluß: 0,7 ml/min. Laufzeit: 15 min. Säule: PurospherStar Rp 18e, 55 mm-4 mm-3 µm. Detektorwellenlänge: 225 nm, Festwellenlängendetektor. Injektionsvolumen 50 µl ca. 1-100 µM an 2-PAO/2-PCN, verdünnt mit bidest. Wasser. Kalibration mit externem Standard: 1, 5, 50, 100 µM 2-PAO und 0,5, 1, 5, 50, 200 µM 2-PCN.

HPLC-Bestimmung von INA (Isonicotinsäureamid) und INS (Isonicotinsäure): INA/INS

Isokratischer Eluent, mit Ionenpaarreagenz: 1%ige (v/v) methanolische Lösung einer 2,5 mM wäßrigen Lösung von Waters PIC A low UV (Tetra-

butylammoniumhydrogensulfat: Waters, Milford, England), pH 7,4. Fluß: 0,7 ml/min. Laufzeit: 19 min. Säule: PurospherStar Rp 18e, 55 mm-4 mm-3 µm. Detektorwellenlänge: 260 nm, Festwellenlängendetektor. Injektionsvolumen 40 µl ca. 1-200 µM an INS/INA, verdünnt mit bidest. Wasser. Kalibration mit externem Standard: 1, 5, 10, 50, 100 µM INA und 1, 5, 10, 75, 200 µM INS.

HPLC-Bestimmung von HI-6, M3 („HI-6 Säure“), 2-PAO, 2-PCN, INA, INS, 2-Pyridon (2-PO), 2-Pyridinaldoxim (2-PA): HI-6/UW (und weitere)

Die Methode gleicht der HI-6/M3 300 nm Methode. Sie konnte bei Wellenlängen < 300 nm verwendet werden, wenn 2-PA keine hohen Konzentrationen aufwies. Die Proben und Standards wurden statt in bidest. Wasser in Eluent A gelöst, damit INA und M3 keinen Doppelpeak ausbildeten. Detektiert wurde bei 225, 250, 260 oder 300 nm. Die Methode eignete sich vor allem für einen schnellen Überblick.

Enzymatische Bestimmung von Restethanol in HI-6 Salzen

$Na_4P_2O_7$ * 10 H_2O, NaOH, Semicarbazid HCl stammten von Merck, Darmstadt, Deutschland. Glycin und ADH Lyophilisat Nr. 7011 von Sigma, Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland. NAD stammte von Boehringer, Mannheim, Deutschland. Als Standard wurde Ethanol 100% für die Kalibriergerade verwendet.
Aus wäßriger Lösung per Mikrodestillation in eine gekühlte, wäßrige Vorlage gebracht, wurde der Alkohol enzymatisch nach dem Verfahren von Bergmeyer (Bergmeyer 1970) ohne Enteiweißung bestimmt.

Photometrische Cyanidbestimmung aus HI-6 Salzen

Die modifizierte Bestimmung erfolgte nach Mikrodiffusion und Zincke-König Reaktion nach Nagashima (Eyer, Kawan et al. 1987). Nach Ansäuerung der Probe mit TCA 0,6 M diffundierte HCN in separat vorgelegte NaOH-Lauge in einem Fernbachfläschchen. Ein Aliquot wurde nach Reaktionsansatz mit Puffer pH 5,2, Chloramin-T und Isonicotinat-Barbiturat-reagenz bei 600 nm im Photometer vermessen. Kalibriert wurde gegen frische KCN-Verdünnungen in 0,1 M NaOH.

2.6 Testverfahren für Astra Autoinjektoren

2.6.1 Mechanische Verschüttelung

Standardisierter Schüttelprozeß

Für die Versuche wurde die im Arbeitskreis konstruierte Schüttelmaschine mit den gleichen Einstellungen verwendet, mit der schon STI-Injektoren und HI-6 2Cl gefüllte Astra-Injektoren untersucht worden waren (Schreiner 1998). Sie bildete die menschliche Schüttelbewegung nach, reduzierte ihre Variabilität und imitierte die notwendigen Bedienungsschritte am jeweiligen Injektor. Das nachgeschaltete Filtersystem sollte auch diesmal noch ungelöstes Material vom Auffangvial fernhalten, um das Gesamtergebnis nicht zu verfälschen.

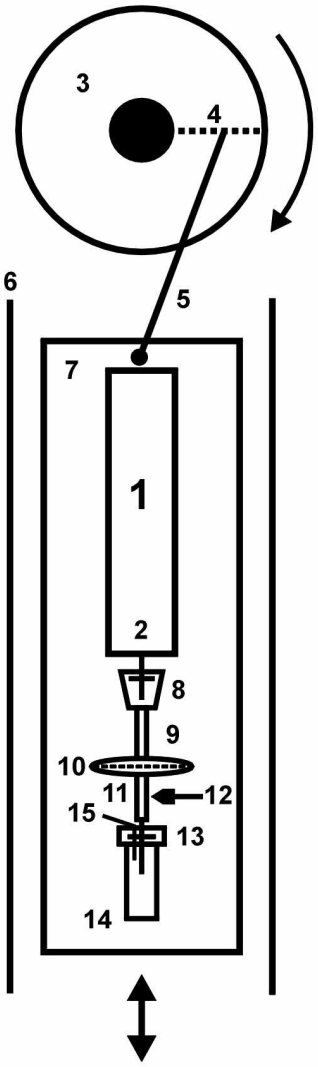


Abb. 2-4
Schemazeichnung der Schüttelmaschine.

1: Autoinjektor; 2: Kanüle; 3: Schwungrad;
4: Auslenkungsjustierung; 5: Pleuel;
6: Führung; 7: Montageplatte/Schlitten.

Filtersystem:
8: Auffangtrichter mit Septum; 9: Schlauch;
10: Filter (0,22 µm); 11: Schlauch mit Kanüle; 12: Sperrschieber

Auffangvorrichtung:
13: Schraubkappe mit Septum; 14: Auffangvial; 15: Entlüftung.

Ablauf

Für die Versuche wurde die Dichtigkeit des Filtersystems gegen stärkere Ausstoßdrucke der Injektoren erhöht (Schreiner 1998). Halbautomatisch wurden folgende Schritte durchlaufen: Membran zwischen Pulverkammer und Atropinlösung zerstören, Pulver durch Verschütteln in Lösung bringen, Ejektion auslösen und den Ausstoß mittels Schieber unterbrechen.

Fraktionen

- Ejektat im Vial
- Ejektat im Filtersystem
- Nicht ausgestoßener Rest in der Injektorampulle

Lösungsreste im Injektorgehäuse bei gelegentlichen Undichtigkeiten der Kanülenverbördelung wurden dem Material im Schlauchsystem rechnerisch zugeschlagen.

Umgebungs- und Versuchsparameter:

5°C, Neigung 45°, Hub 12 cm, Frequenz 180/min, Abstand Injektorboden zum Septum 6 mm, Schüttelzeit nach Aktivierung des Injektors 5 sec bzw. 2 sec, Flußunterbrechung 1-2 sec nach Auslösen, Filtersystem mit Silikon-Teflon-Septen im Kanülentrichter abgedichtet, entlüftetes 5 ml Zinsser-auffangvial mit Septum. Filter im Schlauchsystem: Millex-GS Einmalfilter, 0,22 µm, 25 mm Durchmesser (Nr.: SLGS 025 BS, Millipore S. A., Molsheim, Frankreich).

2.6.2 Manuelle Verschüttelung

Versuchsanordnung

Eine rohrförmige Injektorführung aus Kunststoff, eine Halterung für den Kanülentrichter und das daran befestigte Filtersystem mit Auffangvial wurden in gleicher Anordnung wie auf der Schüttelmaschine montiert. Ein Helfer ahmte nach kurzem Training die Maschinenbewegung möglichst gut nach. Die Ejektionsunterbrechung wurde vom 2. Helfer manuell vorgenommen.
Eine Versuchsreihe wurde mit, eine ohne Filtersystem durchgeführt und eine ohne Filtersystem mit luftdichtem Vial, um den Gegendruck messen zu können.

In Analogie zum Schütteln mit der Maschine wurden auch hier drei Fraktionen gebildet. Undichtigkeiten an der Kanülenverbördelung traten in diesen Experimenten nicht auf.

Umgebungs- und Versuchsparameter:

5 °C, Neigung im Mittel 45° (ca. 5-80°), Hub im Mittel 12 cm (ca. 10-14 cm), Frequenz im Mittel 180/min (ca. 160-200/min), Abstand Injektorboden zu Septum 7 mm, Schüttelzeit nach Aktivierung des Injektors 5 sec bzw. 2 sec. Beim Arbeiten mit Filtersystem Flußunterbrechung 1-2 sec nach Auslösen. In den Gegendruckversuchen Ejektion direkt in das mit zwei Septen luftdicht verschlossene Auffangvial (5 ml) dessen Luftvolumen durch Wasservorlage variiert werden konnte; selbst endende Ejektion bei Erreichen des Gleichgewichtsgegendrucks.

2.6.3 Mess- und Auswertemethoden

Die Massen aller Fraktionen wurden erfaßt. Die Dichte des Ejektats wurde mittels einer mit Wasser kalibrierten Luftpolsterpipette als variabler Mikropyknometer bestimmt. Die Konzentration in den Fraktionen ergab sich photometrisch. Die Fraktion im Schlauchsystem wurde mit bidest. Wasser ad 10 ml, die Fraktion des nicht ausgestoßenen Ampullenrestes ad 5 ml ausgespült. Der Gleichgewichtsgegendruck konnte über die Kompression der Luft im dichten Vial mit Hilfe des Boyle'schen Gesetzes berechnet werden. Praktisch ideales Gasverhalten bei Raumtemperatur konnte hierbei vorausgesetzt werden (Spöhrer 1994).

Berechnung des Gleichgewichtsgegendrucks:

$$pi = po * \left(\frac{Vo}{Vo - Vi} - 1 \right)$$

wobei Vo = Luftvolumen im leeren Vial (zu 4,87 ml bestimmt, n = 3)
Vi = injiziertes Flüssigkeitsvolumen
po = Atmosphärendruck (1 bar)
pi = Gegendruck nach Injektion

2.7 Testverfahren für Meridian Autoinjektoren

2.7.1 Versuchsanordnung zur Fraktionssammlung

Speziell für diesen Injektortyp war im Ejektat eine zeitabhängige Konzentrationsänderung ungefähr in Art einer Bateman-Funktion zu erwarten. Um es portioniert auffangen zu können, wurde ein schneller, linearer Fraktionssammler konstruiert.

Der spindelgetriebene Schlitten in einer Schwalbenschwanzführung wurde durch eine handelsübliche Handbohrmaschine angetrieben. An beiden Enden der Spindel war das Gewinde abgedreht, weswegen der Schlitten jeweils zwangsläufig zum Stehen kam (Rechts-, Linkslauf). Tarierte, handelsübliche 1 x 1 cm Polystyrolmakroküvetten, Kopf an Kopf in dem Schlitten positioniert, dienten als Sammelgefäße. Die Injektoren waren in einem durchbohrten Haltezylinder so angeordnet, daß die herausschnellende Kanüle 0,5 cm über den Küvetten zum Stehen kam.

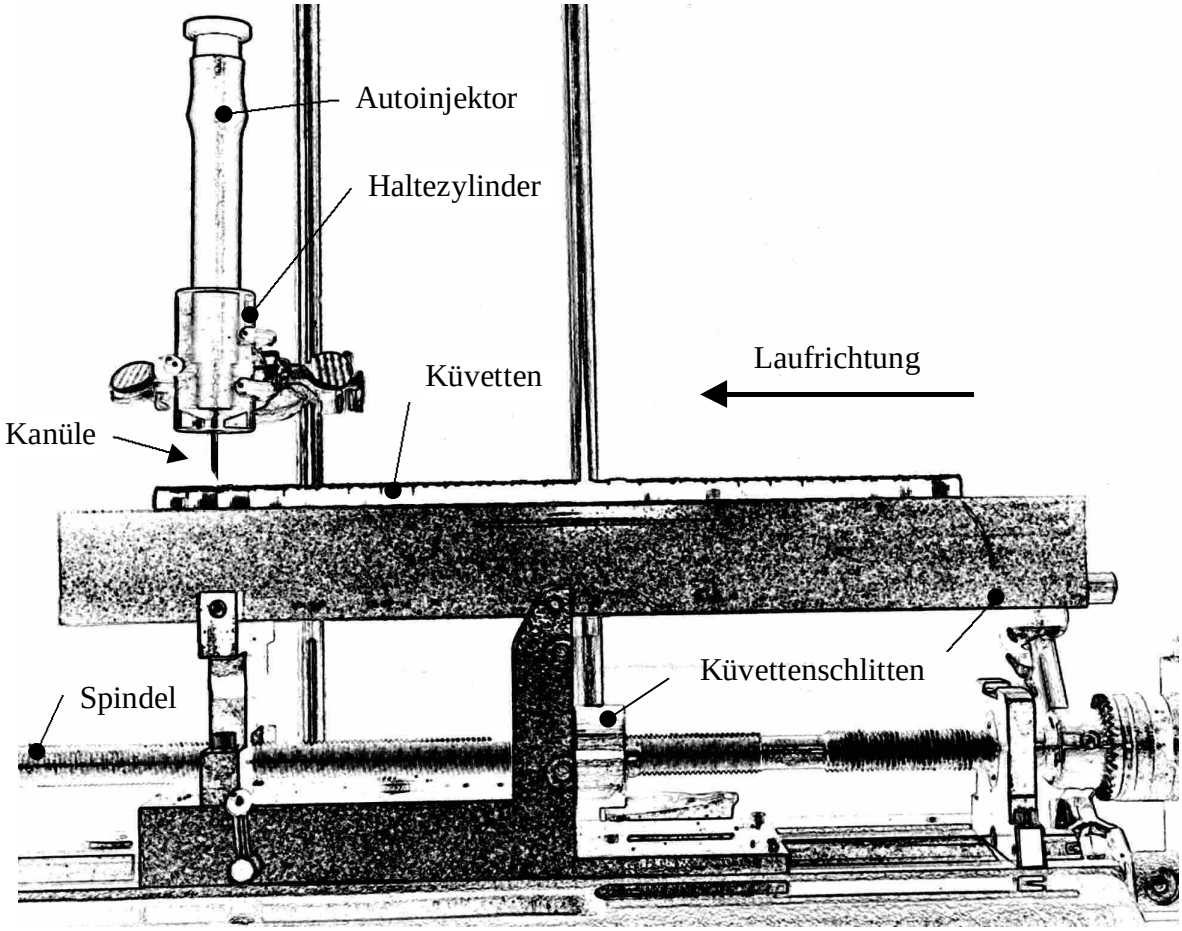


Abb. 2-5
Linearer Fraktionssammler mit Spindelantrieb, Küvettenschlitten und MMT Autoinjektor von der Seite.

Nach Entfernung des Sicherungsknopfes vom Injektor und Starten des Fraktionssammlers konnte die Ejektion durch schnellen Druck von oben auf den Injektor bei Vorbeilaufen der ersten Küvette gestartet werden.
Fraktionen fielen in zeitlichem Abstand von 0,5-0,6 Sekunden an. Nach Ende der Ausstoßphase hielt der Schlitten nach 14,5 Sekunden bei Küvette 25 an, der letzten im Schlitten. Dort konnte der Injektor bis zur 75. Sekunde nachtropfen, bevor der Injektor dem Haltezylinder entnommen wurde. Bis zum Aufsägen des Injektors und damit Entspannen der Feder kam nur noch selten ein Tropfen aus dem Injektor und wurde aufgefangen.

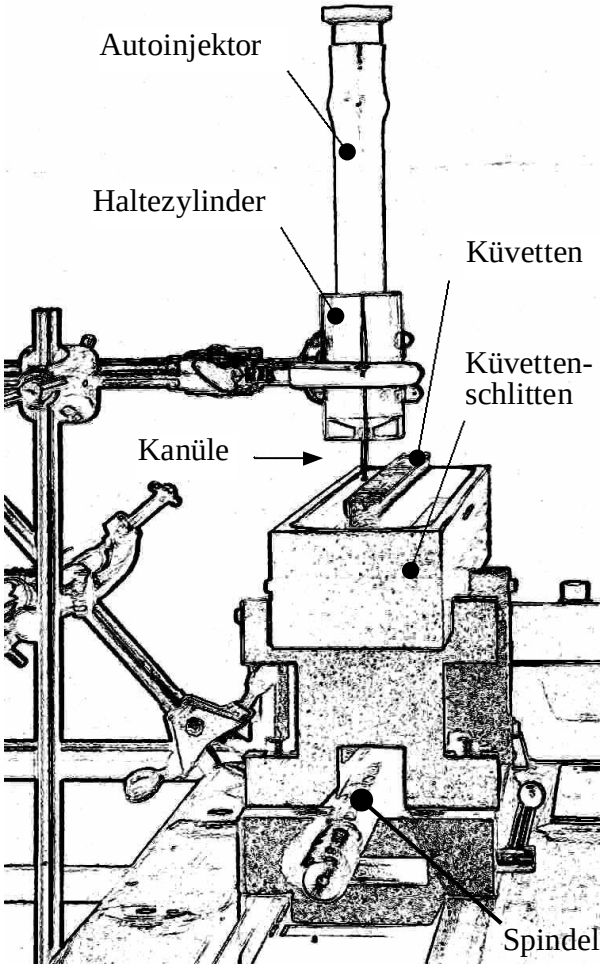


Abb. 2-6
Linearer Fraktionssammler mit Spindelantrieb, Küvettenschlitten und MMT Autoinjektor von vorne.

Umgebungs- und Versuchsparameter:

5°C oder 24°C; Ejektion ohne Gegendruck.

Messung und Auswertung

Zunächst wurden die Massen der Einzelfraktionen bestimmt. Dann wurde die einzelne Küvette in 25 bzw. 50 ml 20 mM H_3PO_4 aus einem mit bidest. Wasser kalibrierten Dispenser getaucht. Das Fraktionsvolumen, mit einer durchschnittlichen Dichte von 1,04 g/ml (300 mM 2Cl, 400 mM DMS) berechnet, wurde zu dem Vorlagevolumen addiert. Daraus und aus der photometrisch bestimmten Konzentration ergab sich die Masse an HI-6 pro Fraktion. Von der gesamten Fraktionsmasse abgezogen, blieb die Masse der Atropinsulfatlösung übrig. Für ihre Volumenberechnung wurde die Dichte von lufthaltigem Wasser bei 23°C (0,99754) angesetzt. Das berechnete Fraktionsvolumen resultierte schließlich aus der Addition dieses Volumens und des Volumens von HI-6, das es gelöst einnimmt.
Dieses partielle Massenvolumen (in Anlehnung an das partielle Molvolumen), war zuvor bestimmt worden. Für HI-6 DMS galt der Wert 0,66 ml/g. Für HI-6 2Cl ergab sich eine Spanne von 0,73-0,81 ml/g in einem Konzentrationsbereich von 300-550 mM bei 23°C. Gerechnet wurde mit dem Mittelwert 0,77 ml/g. Angesichts eines Anteils von max. 50% HI-6 Masse an der jeweiligen Fraktion konnte ein geschätzter Maximalfehler von rund 5% für das Fraktionsvolumen von einigen wenigen DMS-Fraktionen in Kauf genommen werden.

Darüber hinaus wurden die Massen der Injektoren bestimmt und der nicht ejizierte Rest der Lösung im Injektor analog vermessen.

2.7.2 Versuchsanordnung und Auswertung für Kontrollen und Versuche mit Gegendruck

Kontrollen

Die Kontrollinjektoren wurden bei 5°C in ein entlüftetes 5 ml Schraubdeckel-Vial mit Teflon-Silikon-Septum, abgefeuert und nach 75 Sekunden zurückgezogen. Ejektat und Rest in der Ampulle wurden nach Masse und Konzentration vermessen. Für die exakte Volumenbestimmung des Ejektates (n = 3)

bei 22°C wurde eine mit bidest. Wasser kalibrierte Glaspräzisionsspritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) als Pyknometer benutzt.
Als zusätzliche Größe konnte wiederum das von HI-6 befreite Volumen der Atropinsulfatlösung berechnet werden.

Gegendruckversuche

Die Gegendruckexperimente wurden bei 5°C und bei 24°C durchgeführt. Ein Überdruck von ca. 2 bar sollte erreicht werden.
Um jeweils den gleichen Enddruck zu erreichen, war eine Wasservorlage in den verwendeten 5 ml Schraubdeckelvials mit Septum nötig, da das Füllvolumen der Injektoren unterschiedlich war: 2Cl Injektoren enthielten 2,9 ml, DMS Injektoren 2,5 ml Atropinsulfatlösung (vgl. Tabelle 2.5-2).

In die einzeln volumenkalibierten Vials wurden die Injektoren abgeschossen und nach 5 bzw. 10 Sekunden zurückgezogen. Anschließend austretende Lösung wurde unmittelbar oberhalb des Vials aufgefangen und dem Ampullenrest zugerechnet.
Mit den gemessenen Massen, Dichten und Konzentrationen konnten wieder der Überdruck nach dem Boyle'schen Gesetz und das von HI-6 befreite Volumen der Atropinsulfatlösung berechnet werden.

2.8 Alterung konzentrierter, ungepufferter HI-6 Lösungen

Wäßrige Testlösungen aus HI-6 2Cl (Ch.-Nr.: S/02/94, 405 mM) und HI-6 DMS (Ch.-Nr.: 1099-1, <100µm, 394 mM) wurden je in Zinsser-Vials (Borosilikatglas) und in Eppendorf Cups (Polypropylen) gegeben. Insgesamt lagerten sie bei 37°C ± 0,5°C 22 Wochen. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden die Testgefäße umgeschüttelt, Aliquots entnommen und bei -20°C bis zur Untersuchung gelagert. Später wurde ihr pH und ihr Abbauprofil mittels HPLC bestimmt. UV/VIS Spektren möglichst unverdünnter Lösung im Bereich 360-800 nm wurden mit 2 mm Quarzküvetten, 10 mm Lichtweg (Hellma, Freiburg, Deutschland) aufgezeichnet. War die Absorption außerhalb des Meßbereiches, konnte mit Dünnschichtküvetten (Lichtweg 1 mm) gemessen werden. In seltenen Fällen mußte mit bidest. Wasser verdünnt gemessen werden (1:170). Die Verdünnung beeinflußte die Bandenlage bei 400 nm kaum.

Nach dem gleichen Protokoll wurden 408 mM HI-6 DMS und 409 mM HI-6 2Cl Lösungen in D_2O hergestellt, gelagert und untersucht.

Zur Überprüfung der Aussagekraft der Modelle wurden später 6 Astra HI-6 DMS Injektoren aktiviert, die Atropinsulfatlösung mit HI-6 gebrauchsfertig gemischt, aber nicht ejiziert. Sie lagerten 32 Wochen bei 25°C ± 2°C und 60% r. F.. 200 - 250 µl Proben wurden nach 1, 2, 3, 4, 8, 12, 19, 25, 32 Wochen mittels Insulinspritzen über den Kanülenausgang der Ampullen entnommen. Nach Probennahme wurde der Zugang mit einem PP-Stopfen und Parafilm bis zum nächsten Zeitpunkt verschlossen. Die in Eppendorf-Vials abgefüllten Proben lagerten bei -20°C bis zur Untersuchung. Gemessen wurde der pH, visuell die Färbung beurteilt sowie HI-6, M3, PAO, PCN nach der gemeinsamen HI-6/M3 250 nm (HPLC) Methode und INA, INS nach der INA/INS (HPLC) Methode bestimmt.

2.9 „HI-6 Säure" (M3)

2.9.1 Herstellung und Isolierung aus gealterter HI-6 Lösung

Zur Herstellung der „HI-6 Säure“ waren 10,01 g HI-6 2Cl (Phoenix Chemicals) zu 413 mM in bidest. Wasser gelöst worden. Der pH betrug 3,29. Nach 9 Wochen bei 37°C in Braunglas gelagert, hatten sich 0,14 M M3 gebildet (HPLC). HCN-Geruch, ein Hinweis auf den Abbau der Oximfunktion, war deutlich wahrnehmbar. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die Lösung bei -20°C gelagert.

Die chromatographische Isolierung von M3 wurde nach einer adaptierten Methode nach Eyer durchgeführt (Eyer, Hell et al. 1986). Eingesetzt wurden 39 ml der aufgetauten Abbaulösung. Mit peroxidfreiem Diethylether wurde die auf 5,8 mM verdünnte Lösung (pH 4,0) weitgehend von lipophilen Abbauprodukten wie 2-Pyridinaldoxim und 2-Pyridinnitril befreit. Die gereinigte Lösung wurde an SP-Sephadex C-25 (Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Schweden) in einem Ammoniumformiatpuffer, pH 3,5, von 5 nach 100 mM hyperbolisch gradienteneluiert. Bei 254 nm detektiert, erschien M3 nach INS bei einer Ammoniumformiatkonzentration von etwa 100 mM. Photometrisch und HPLC-chromatographisch vermessen, konnten die Einzelfraktionen zu zwei Hauptfraktionen vereinigt werden.

Mit Ameisensäure auf pH 2,0-3,0 gebracht, konnten sie ohne große Sekundärabbaureaktionen in 2 Stufen lyophilisiert werden. Das in wenig Wasser aufgenommene Material kristallisierte nach Versetzen mit 100%igem Ethanol bei 6°C, dann zur Ausbeuteerhöhung bei -20°C nach. Getrocknet wurde bei Raumtemperatur bei 10 mbar. Die Hauptfraktion zwei ergab 2,8 mmol Substanz, photometrisch bei 300 nm in 20 mM H_3PO_4 mit dem Extinktionskoeffizienten von HI-6 bestimmt.

2.9.2 Untersuchung mittels Kernresonanz- und Massenspektroskopie

Kernresonanzspektren

Die Spektren wurden mit einem JEOL Eclipse +400 von Jeol Ltd., Tokyo, Japan, aufgenommen. Verwendet wurde die JEOL Delta Software von Jeol USA Inc., Peabody, Maryland, USA. Als Lösemittel diente D_2O, die Meßfrequenz für ^{13}C betrug 100 MHz, für ^{1}H 400 MHz.

Massenspektren

Die Spektren wurden mit einem API 2000 von Applied Biosystems, Foster City, California, USA, im ESI+- oder ESI- Modus aufgenommen. Als Probenlösemittel diente Methanol.

2.9.3 Biochemische Charakterisierung

Reaktivierung gehemmter Ery-AChE

5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellman's Reagenz) und Acetylthiocholin (ASCh) stammten von Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, Deutschland.

Das Testsystem, mit Soman, Sarin, Cyclosarin oder VX vollständig gehemmte humane Erythrozytenacetylcholinesterase, durch Waschen von überschüssigem Gift befreit, war freundlicherweise von der Sanitätsakademie der Bundeswehr in München zur Verfügung gestellt worden.

Die Erythrozytensuspensionen wurden unmittelbar vor dem Ellman-Test mit Reaktivator inkubiert. Gemessen wurde die Initialgeschwindigkeit der Spaltung von DTNB zu TNB^- in Polystyroleinmalküvetten bei 37°C: im Einstrahlphotometer bei 436 nm oder im Zweistrahlphotometer bei 436 nm und 546 nm zur Kompensation der Hämoglobinabsorption (Ellman, Courtney et al. 1961; Worek, Mast et al. 1999).

HI-6 2Cl-, M3-Lösungen und die für die Isolierung von M3 gealterte HI-6 2Cl Lösung wurden als Reaktivatorlösungen eingesetzt. Die Blankreaktion wurde berücksichtigt. Die Reaktivatorkonzentrationen betrugen im Reaktivierungsansatz 5, 10 und 100 µM. Mischungen zu 5+5 oder 10+10 µM ausgewählter Kombinationen wurden ebenfalls getestet.

Tabelle 2-3
Reaktivierungsansatz, 37°C.

Reagenz bzw. Probe	Konzentration	ml in Eppendorff-Cup	Ansatzbehandlung
Erythrozytensuspension in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4	1,5 g Hb/dl	0,120	5 min temperieren
Reaktivatorlösung bzw. Aqua bidest. als Kontrolle	(0-100 µM im ges. Ansatz)	0,005	10 min inkubieren

Tabelle 2-4
Meßansatz mit Indikatorreaktion, 37°C.

Reagenz bzw. Probe	Konzentration	ml in Küvette	Ansatzbehandlung
Reaktivierungsansatz	1,44 g Hb/dl	0,100	
Phosphatpuffer, pH 7,4	0,1 M	2,900	
DTNB	10 mM	0,100	10 min inkubieren
ASCh	28,4 mM	0,050	Reaktionsstart

Hemmung der Ery-AChE Aktivität durch „HI-6 Säure“ (M3)

Gemessen wurde nach Ellman im Einstrahlphotometer bei 436 nm und 37°C. Die Erythrozytensuspension mit 3,0 g% Hb war zum Abreagieren unspezifischer SH-Gruppen zuvor 10 min bei 37°C mit DTNB-Lösung 10 mM im Verhältnis 10 + 1 inkubiert und bis zum Test auf Eis gelagert worden. Verwendet wurde das M3 Isolat aus der Ionenaustauschchromatographie.

Das Meßansatzvolumen betrug 1 ml und war jeweils 0, 50, 100, 200, 400 bzw. 700 µM an M3. Gestartet wurde mit je 100, 200, 400, 700 bzw. 1000 µM an ASCh in der Küvette. Jeder Punkt in der Ansatzmatrix wurde dreifach bestimmt. Die Meßwerte wurden um die Blankreaktion und die durch M3 induzierte chemische ASCh-Hydrolyse korrigiert.

Tabelle 2-5
Hemmansatz mit Indikatorreaktion, 37°C.

Reagenz bzw. Probe	Konzentration	ml in Küvette	Ansatzbehandlung
Phosphatpuffer, pH 7,4	0,1 M	ad 1,000	
DTNB	10 mM	0,100	10 min inkubieren
Erythrozyten/DTNB (10+1)	2,73 g Hb/dl	0,015	
M3 Lösung	Reihe	Reihe	2 min inkubieren
ASCh	28,4 mM	Reihe	Reaktionsstart

2.10 Untersuchung pharmazeutisch-technologischer Eigenschaften beider HI-6 Salze

Kristallisation

Für die Kristallisationsversuche wurden wäßrige HI-6 DMS-Lösungen (Chargen 1099-1, bzw. -2 mit einer Korngröße ≤ 100 µm) mit Methanol, Ethanol oder Isopropanol versetzt und in Aceton/Trockeneismischung (-40°C), Kaliumchlorid/Eis- (-8°C), Kochsalz/Eismischungen (-9°C) oder in einem Kryostaten (Colora WK3, Lorch/Württemberg) mit Methanolfüllung (-17°C, -24°C) bzw. einem Kühlraum (6°C) unterschiedlich schnell abgekühlt und anschließend auf -20°C bzw. -24°C gelagert. Die erhaltenen Kristalle wurden abgesaugt und mit sehr wenig kaltem organischem Lösemittel gewaschen oder die Mutterlauge nach Zentrifugieren abdekantiert und Reste mit Filtrierpapier abgesaugt. Vorgetrocknet wurde das Material zunächst bei 30°C im Vakuum bei ca. 100 µbar, nachgetrocknet im Wasserstrahlvakuum über Siccapent-Trockenmittel (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Kristallisate wurden zwischen den Untersuchungen bei 6°C gelagert.

Hygroskopizität

Über Siccapent-Trockenmittel (Merck, Darmstadt, Deutschland) im Vakuum vorgetrocknete HI-6 Salze wurden in PCR-Cups 200 µl (Eppendorf-GmbH, Hamburg, Deutschland) in Fernbachfläschchen getrennt von gesättigten Hygrostatensalzlösungen im Gleichgewicht mit ungelöstem Salz gebracht. Relative Feuchte bei 25°C in Klammern (Stahl 1980): NaJ (38,4%), $Na_2Cr_2O_7$ * 2 H_2O (53,6%), $NaNO_2$ (64,3%), $NaNO_3$ (73,8%), NaCl (75,5%), KBr (80,7%), KCl (84,3%), $BaCl_2$ * 2 H_2O (90,2%), K_2SO_4 (97,2%).
In den verschlossenen Fläschchen konnte Wasserdampf aus der Hygrostaten-flüssigkeit in das HI-6 Salz diffundieren. Die Fläschchen wurden auf einem Gyrotory Wasserbad (G 76, New Brunswick Co. Inc., New Brunswick, USA) auf 25 +/- 1°C unter Schwenken temperiert. In möglichst wöchentlichen bzw. monatlichen Abständen wurde die Wasserzunahme der HI-6 Salze in den Cups ausgewogen.

Bestimmung der hygroskopischen Grenzfeuchte

Die Messungen wurden mit einem mit feuchtem NaCl kalibrierten Feuchte-stabmeßgerät H270 von Dorstmann, Wertheim, Deutschland durchgeführt. Auflösung 0,1 % r. F., Präzision +/- 3% r. F. bei 25 °C. Als hygroskopische Grenzfeuchte galt diejenige relative Luftfeuchte, ab der die Salze aus der Gasphase so viel Wasser aufnahmen, daß sie sich auflösten. Das entspricht der Feuchte über noch nicht vollständig gelöstem Salz: Verfahren nassen Salzes (Stahl 1980).

DSC-Untersuchungen (Differentielle Scanning Calorimetrie)

Verwendet wurde eine DSC 204 cell mit TASC 414/3A- und CC 200 L-Controller, die TA Software für MS Windows und die DCS-Software DSC 204 V. 3.6 von Netzsch, Selb, Deutschland. Als Probentiegel wurden Alu DSC crucibles und Alu DSC lids derselben Firma verwendet. Bei kontrollierter Aufheizung mit festgelegter Temperaturrate wurde der Unterschied von Wärmeaufnahme und -abgabe zwischen dem leeren Vergleichstiegel und dem Probentiegel aufgezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Funktionsprüfung von Astra Tech und Meridian Autoinjektoren, befüllt mit HI-6 Dichlorid oder HI-6 Dimethansulfonat

3.1.1 HI-6 Dimethansulfonat in Astra Tech Autoinjektoren bei 5°C

Die Versuchsdurchführung erfolgte in Anlehnung an Schreiner, 1998, so daß die Ergebnisse mit den damals erzielten (HI-6 2Cl) verglichen werden können. Die Füllspezifikationen und die theoretisch erreichbaren Zielkonzentrationen sind in Tabelle 3-1 aufgeführt.

Tabelle 3-1
Zielkonzentrationen und Sollfüllmengen der Astra-Injektoren.

	HI-6 DMS	HI-6 2Cl [1)]
Zielkonzentration bei 20°C [M]	0,33 ± 0,005 [2)]	0,40 ± 0,004 [3)]
HI-6 [mmol]	1,07 ± 0,01	1,33 ± 0,07
HI-6 Salz [mg]	513 ± 5	500 ± 25
Atropinsulfatlösung [ml]	2,9	3,0

1) Schreiner 1998. 2) Berechnung aus den Sollmengen mit 0,657 ml/g für gelöstes HI-6 DMS (partielles Massenvolumen). 3) Messungen mit n = 4.

Die Menge an eingefüllter Atropinsulfatlösung lag bei den HI-6 DMS Injektoren nur um 3% niedriger als bei den damaligen HI-6 2Cl Injektoren. Die HI-6 Salzmassen waren praktisch gleich. Die Zielkonzentration von HI-6 DMS war damit um rund 20% niedriger. Ein kleiner Vorteil für die Lösegeschwindigkeit von HI-6 DMS war deshalb wahrscheinlich. Die Korngrößenverteilung des Dimethansulfonats war derjenigen des damals beschriebenen Dichlorids sehr ähnlich (Schreiner 1998).

Auflöseverhalten

Im Vergleich zu den Ergebnissen für HI-6 2Cl (Thiermann, Schreiner et al. 1998) genügten für HI-6 Dimethansulfonat Injektoren jetzt 2 Sekunden, um knapp die Zielkonzentration zu erreichen.

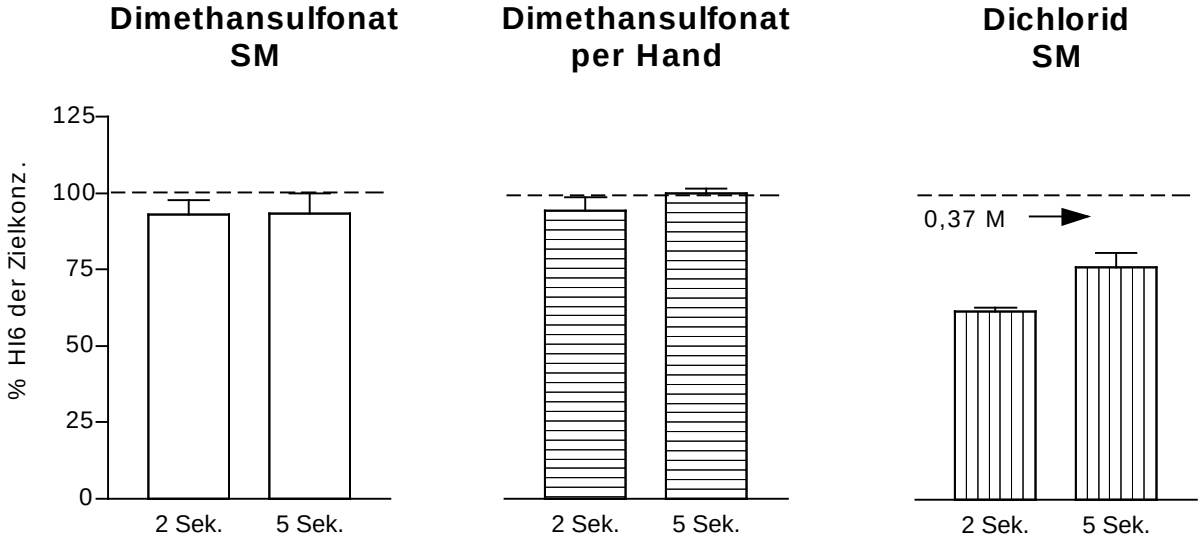


Abb. 3-1
Mittlere Auflöseleistung bei 5°C bei zwei Schüttelzeiten. Per Schüttelmaschine (SM) oder Handverschüttelung. Fehler als 95% VB des Mittelwertes. Der Pfeil deutet die maximale Löslichkeit von HI-6 2 Cl an. Werte in Tabelle 3-2.

Nach 5 Sekunden war die Auflösung praktisch abgeschlossen, was frühere Ergebnisse an Injektormodellen bestätigte (Thiermann, Schreiner et al. 1998). Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Schüttelzeiten sowie der Verschüttelung per Hand und derjenigen per Maschine war nicht zu erkennen. Die 95%-Vertrauensbereiche überlappten sich trotz 6% höherer Konzentration beim Übergang von 2 auf 5 Sekunden für die Verschüttelung von Hand. Ein Unterschied, der bei höherer Versuchszahl womöglich kleiner ausgefallen wäre.

Tabelle 3-2
HI-6-Konzentration im Ejektat bei 5°C in % der jeweiligen Zielkonzentration (DMS: 0,33 M, 2Cl: 0,40 M).

	DMS Schüttelmaschine		DMS Handverschüttelung		2Cl Schüttelmaschine*)	
Schüttelzeit	2 Sek.	5 Sek.	2 Sek.	5 Sek.	2 Sek.	5 Sek.
MW	92,9	93,2	94,2	99,9	61,6	75,8
VK	7,0%	6,9%	4,6%	1,4%	0,8%	2,6%
VB (p=0,05)	88,3 - 97,6	86,5 -100,0	89,6 - 98,7	98,4 -101,3	60,3 - 62,8	70,9 - 80,7
Spanne	86-110	83-101	89-101	97-101	61-62	74-76
n	10	6	6	6	3	3

*) Schreiner 1998.

Der theoretische Vorteil für DMS aufgrund der kleineren Zielkonzentration von 0,33 M statt 0,4 M wie beim Dichlorid wirkte sich im 5-Sekunden Fenster vermutlich kaum aus. In früheren Versuchen ergaben Astra-Injektor-imitate mit einer Zielkonzentration von 0,4 M fast die gleichen 5-Sekunden Ergebnisse. Bei 2 Sekunden lagen sie mit 84% allerdings um rund 10% niedriger (Schreiner 1998).

Die mit 7% etwas großen Streuungen bei der maschinellen Verschüttelung überraschten angesichts der Vergleichszahlen (Schreiner 1998). Dafür könnten leichte Verwindungen der Injektoren bei ihrer Aktivierung durch die Schüttelmaschinenmechanik verantwortlich gewesen sein.

Die angegebene HI-6 DMS Menge konnte anhand der Rückwägung der nach Abschuß entleerten und getrockneten Injektoren (n = 41) mit 99,3% ± 1,4% VK bestätigt werden.

Leistung gegen einen simulierten Gewebewiderstand - Überwindbarer Gegendruck

Die Schüttelzeit betrug 5 Sekunden, die sich selbst begrenzende Entleerungsphase wie in den Versuchen von Spöhrer mit HI-6 2 Cl ebenfalls ca. 5 Sekunden (Spöhrer 1994). Der Datenvergleich zeigte keine signifikanten Unterschiede und ließ damit analog zu damals eine ausreichende Druckentwicklung gegen Muskelwiderstände vermuten (Thiermann, Spoehrer et al. 1995). Diesmal sogar bei 5°C.

Tabelle 3-3
Gegendruckergebnisse von Astra-Autoinjektoren mit 2 verschiedenen HI-6-Salzen.

	HI-6 DMS, 5°C	HI-6 2Cl, RT (Thiermann, Spoehrer et al. 1995)
mittlerer Druck [bar] ± SE	1,4 ± 0,03	1,5
n =	6	6
mittleres Anfangsluftvolumen [ml]	4,87	4,65
Mittelwert Ejektat [ml] ± SE	2,82 ± 0,03	2,78 ± 0,03

Ejizierbare Mengen unter Gegendruckbedingungen

Das System lieferte bei 5°C 88 - 89% sowohl der eingefüllten HI-6- als auch der Atropinlösungsmasse. Die im Injektor verbleibende Menge von rund 10% beider Größen (Totvolumen) bestätigte die Firmenspezifikation, die Homogenität der erzeugten Lösung und die komplette Auflösung des Salzes.

Tabelle 3-4
Ejizierte Mengen bei 5°C unter Gegendruck (n = 6). Mittelwerte, 95%-VB in Klammern.

	Wert	% der Füllmenge	Füllmenge
gesamte Lösung	3,00 g	88 (85,8 - 91,4)	3,41 g
davon HI-6 DMS	455 mg	89 (85,7 - 89,8)	513 mg
davon Atropinlösung *)	2,54 g	88 (85,5 - 89,8)	2,90 g

*) Differenz der oberen Massen.

3.1.2 Prüfung von Meridian Injektoren mit HI-6 2Cl bzw. HI-6 DMS bei Raumtemperatur und bei 5°C

Statt einer verbesserten Version der kompliziert zu bedienenden STI-Injektoren (Schreiner 1998) übergab uns die Nachfolgefirma von STI, Meridian Medical Technologies, einen Prototyp, der ein völlig anderes Auflöseprinzip nutzte und ein anderes Vorgehen für die Prüfung erforderte:
HI-6 Pulver sollte ohne Schütteln in Lösung gebracht werden, indem Atropinlösung durch das Pulverbett gedrückt wird, was die gesamte Handhabung auf drei Schritte reduzierte.

Tabelle 3-5
Handhabung der verglichenen, binären Autoinjektoren.

<table>
<tr><th></th><th colspan="2">Astra</th><th>STI</th><th>Meridian</th><th></th></tr>
<tr><td>1.</td><td colspan="2">-</td><td>Sicherungslasche entfernen</td><td>Sicherungsknopf entfernen</td><td>1.</td></tr>
<tr><td>2.</td><td colspan="3">Zerstören einer Trennmembran zwischen Pulverkammer und Flüssigkeit (Aktivierung)</td><td rowspan="4">Den Injektor wie links andrücken, dann 5 Sek. in Position halten</td><td rowspan="4">2.</td></tr>
<tr><td>3.</td><td colspan="3">5 Sekunden Schütteln, um das HI-6 aufzulösen</td></tr>
<tr><td>4.</td><td colspan="3">Den Injektor an den lateralen Teil der Oberschenkelmuskulatur drücken und erste (Astra) bzw. zweite (STI) Sicherung entfernen</td></tr>
<tr><td>5.</td><td colspan="3">Den Auslöseknopf drücken sowie den Injektor 5 Sekunden lang in Position halten</td></tr>
<tr><td>6.</td><td colspan="3">Die Kanüle aus dem Muskel ziehen</td><td>Kanüle aus dem Muskel ziehen</td><td>3.</td></tr>
</table>

Das Andrücken des entsicherten Injektors an das Bein löst eine Feder aus. Sie treibt eine Kanüle durch ihren Gummischutz aus dem Gehäuse durch etwaige Kleidung in den Oberschenkelmuskel. Der gleichzeitig in der Atropinlösung entstehende Druck soll den Trennstopfen zur Pulverkammer aufdrücken, die Flüssigkeit durch einen Filter in das Kristallpulverbett und die in situ entstandene Lösung durch einen weiteren Filter aus der Kanüle in den Muskel drücken (vgl. Abb. 2-2).

Damit entfiel die Anwendung der Schüttelmaschine. Zur zeitlichen Auflösung der Änderungen im Ejektat wurde allerdings ein schneller linearer Fraktionssammler benötigt und konstruiert, mit dem Fraktionen im 0,5 - 0,6 Sekundenintervall aufgefangen werden konnten.

Die nur geringe Anzahl an Prototypen verlangte ein straffes Testprotokoll:

Ejektion ohne Gegendruck bis 75 Sekunden:

- 24°C, fraktioniert aufgefangen, n = 2.
- 5°C, fraktioniert aufgefangen, n = 6.
- 5°C, als Ganzes aufgefangen, n = 2.

Ejektion mit Gegendruck, bis 5 bzw. 10 Sekunden:

- 24°C, als Ganzes aufgefangen, n = 2.
- 5°C, als Ganzes aufgefangen, n = 2.

In den Versuchen, in denen das Ejektat als Ganzes gesammelt wurde, konnte die Zielkonzentration als Leistungskriterium herangezogen werden.

Tabelle 3-6
Bezugsgrößen für Meridian-Injektoren: Sollfüllmengen.

	HI-6 DMS		HI-6 2Cl	
	Soll	MMT *)	Soll	MMT *)
Zielkonzentration bei RT [M]	0,49	-	0,46	-
Theor. Volumen fertiger Lösung [ml]	2,95	-	3,34	-
Salz [mmol]	1,44	-	1,52	-
Salz [mg]	690	691	575	577
(Spanne)	-	(689 - 696)	-	(572 - 582)
Atropinsulfatlösung [ml]	2,5	2,51	2,9	2,91
(Spanne)	-	(2,50 - 2,53)	-	(2,89 - 2,94)

*) Meßwerte aus der Abfülldokumentation von Meridian Medical Technologies.

Zielkonzentration und theoretisches Volumen fertiger HI-6 Lösung wurde wiederum mit dem durchschnittlichen Volumen von gelöstem HI-6 berechnet: 0,765 ml/g für HI-6 2Cl und 0,657 ml/g für HI-6 DMS.

Die Füllvolumina der Atropinsulfatlösungen waren so unterschiedlich, daß die Dichlorid Glasampullenlängen um 0,65 cm länger waren.

Tabelle 3-7
Gemessene Füllmengen der Meridian-Injektoren, n = 10.

	HI-6 DMS	HI-6 2Cl
Salz [mg] (VB 95%)	676 (669 - 683)	575 (573 - 578)
Atropinsulfatlösung [ml] (VB 95%)	2,53 (2,51 - 2,56)	2,96 (2,88 - 3,05)

Die Abweichung der DMS Menge um 2% vom Soll nach unten und für das Volumen der Atropinlösung im 2Cl-Injektor um 2% nach oben wurde im Rahmen der Auswertegenauigkeit als vernachlässigbar eingeschätzt.

Freisetzung bei Raumtemperatur ohne Gegendruck

Die Experimente fanden bei 24°C statt. Die Hauptmenge an Lösung war in allen Fällen in etwa 5 Sekunden ejiziert. Ein geringes Nachtropfen konnte noch bis zu 11 Sekunden festgestellt werden.

HI-6 Konzentration

Das Auflöseverhalten beider Salze war in je 2 Versuchen gut reproduzierbar. Beide Konzentrations-Zeit Diagramme zeigten ein anfängliches Maximum (Abb. 3-2).

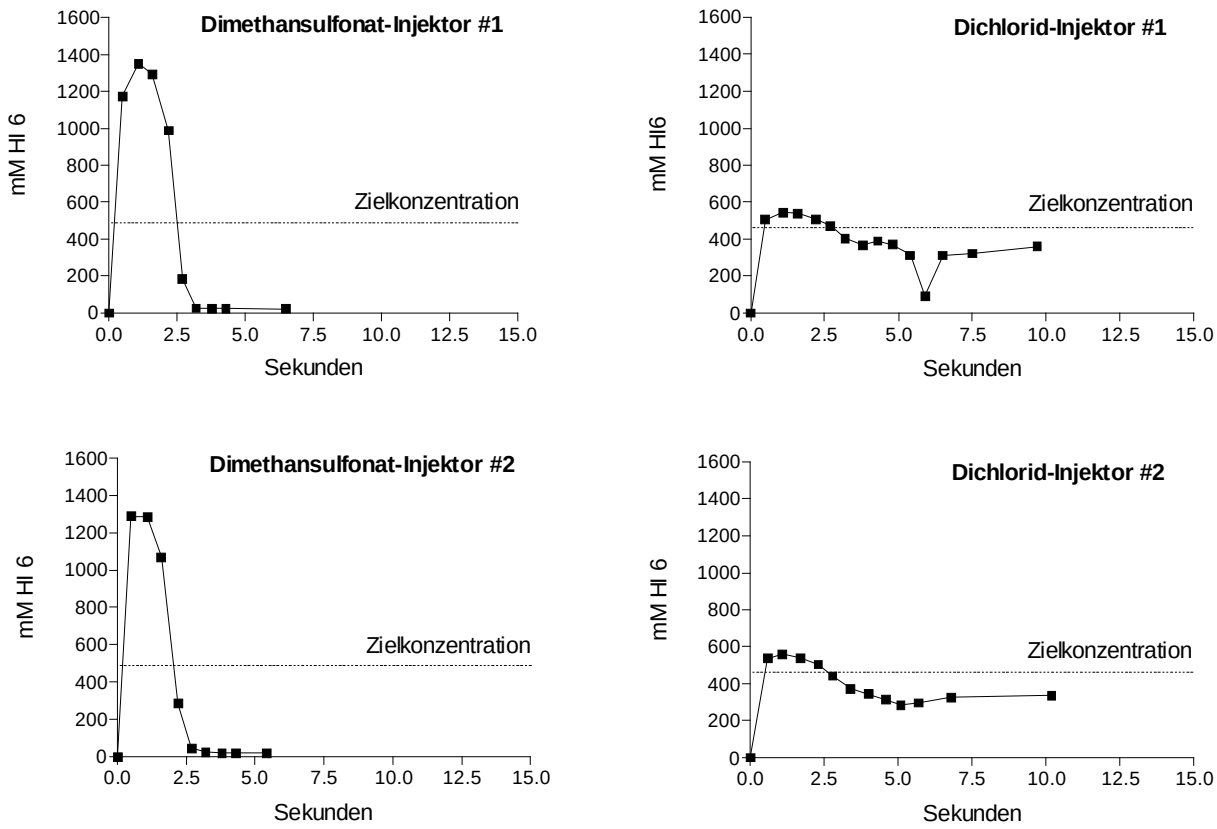


Abb. 3-2

Konzentrations-Zeit-Profile für ejizierte HI-6 DMS- bzw. 2Cl-Lösung. MMT-Injektoren. Geschlossenes Symbol: Konzentration HI-6 pro Fraktion zur Zeit t. Zielkonzentration gestrichelt angedeutet.

Das DM S löste sich so rasch, daß die Abgabe bereits nach ca. 3 Sekunden vollständig war. Dagegen lag im Fall von HI-6 2Cl die Konzentration der letzten Tropfen immer noch bei ca. 350 mM.

HI-6 Masse

Die kumulative Darstellung der ejizierten HI-6 Masse in der folgenden Abbildung zeigt die zeitabhängige Auswurfleistung. Während es bei DMS-Injektoren zu einer Kinetik hoher Anfangssteilheit mit einer Art Gauss'schem Peak kam, war sie bei 2Cl zwar auch anfangs steil, bot dann aber das Bild

eines tailenden Peaks. DMS Injektoren hatten nach ca. 3 Sekunden praktisch alles HI-6 ejiziert, bei 2Cl Injektoren dauerte es rund doppelt so lange.

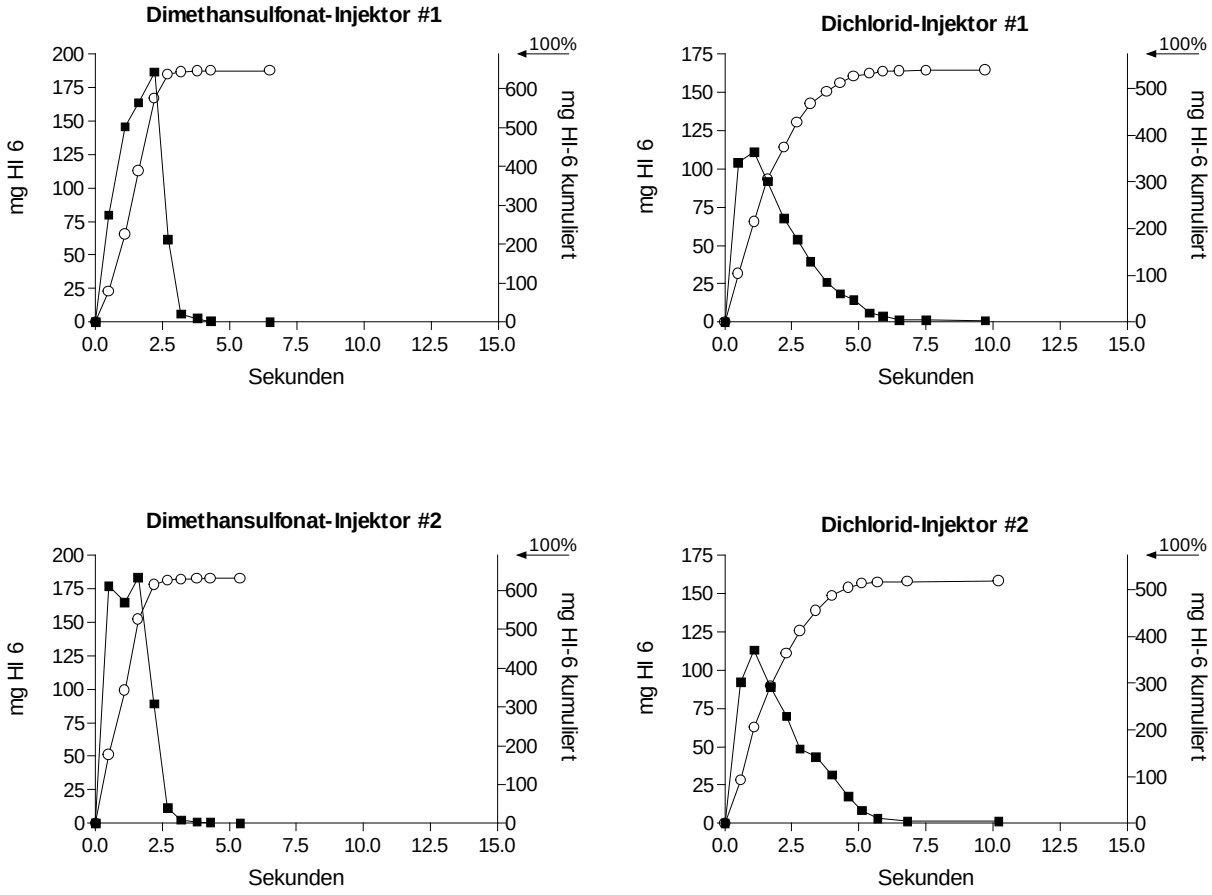


Abb. 3-3
Massen-Zeit-Profile für ejiziertes HI-6 DMS bzw. 2Cl. MMT-Injektoren.
Geschlossene Symbole: Masse HI-6 pro Fraktion zur Zeit t. Offene Symbole: Masse HI-6, kumuliert zur Zeit t.

Rechnerisch von HI-6 befreite, ejizierte Atropinsulfatlösung

Die Auswirkungen der Lösegeschwindigkeiten der einzelnen Salze auf den Ausstoß der reinen Atropinsulfatlösung waren an ihrer Kinetik zu erkennen. Vom Volumen der ejizierten Lösung wurde dabei der Volumenanteil, den gelöstes HI-6 rechnerisch einnimmt, abgezogen.

Da das große Volumen an gelöstem HI-6 DMS die Atropinlösung anfangs verdrängte, hinkte das Maximum der Atropinejektion dem von HI-6 DMS um ca. 2,5 s hinterher, wie der Vergleich mit den Diagrammen der HI-6 Massen zeigt. Außerdem waren die ersten Fraktionen ölig-viskös, was die Strömungs-

geschwindigkeit durch Filter und Kanüle verlangsamen dürfte. Nach beendeter HI-6 DMS Ejektion sank dann die Viskosität drastisch, so daß die Atropinejektion jetzt schneller erfolgte als bei den HI-6 2Cl Autoinjektoren, was an der Anstiegssteilheit der kumulativen Kurven zu erkennen ist (Abb.3-4). So war die Abgabe von Atropin aus den HI-6 DMS Autoinjektoren etwas früher (4 s) beendet als bei den HI-6 2Cl Autoinjektoren (6 s).

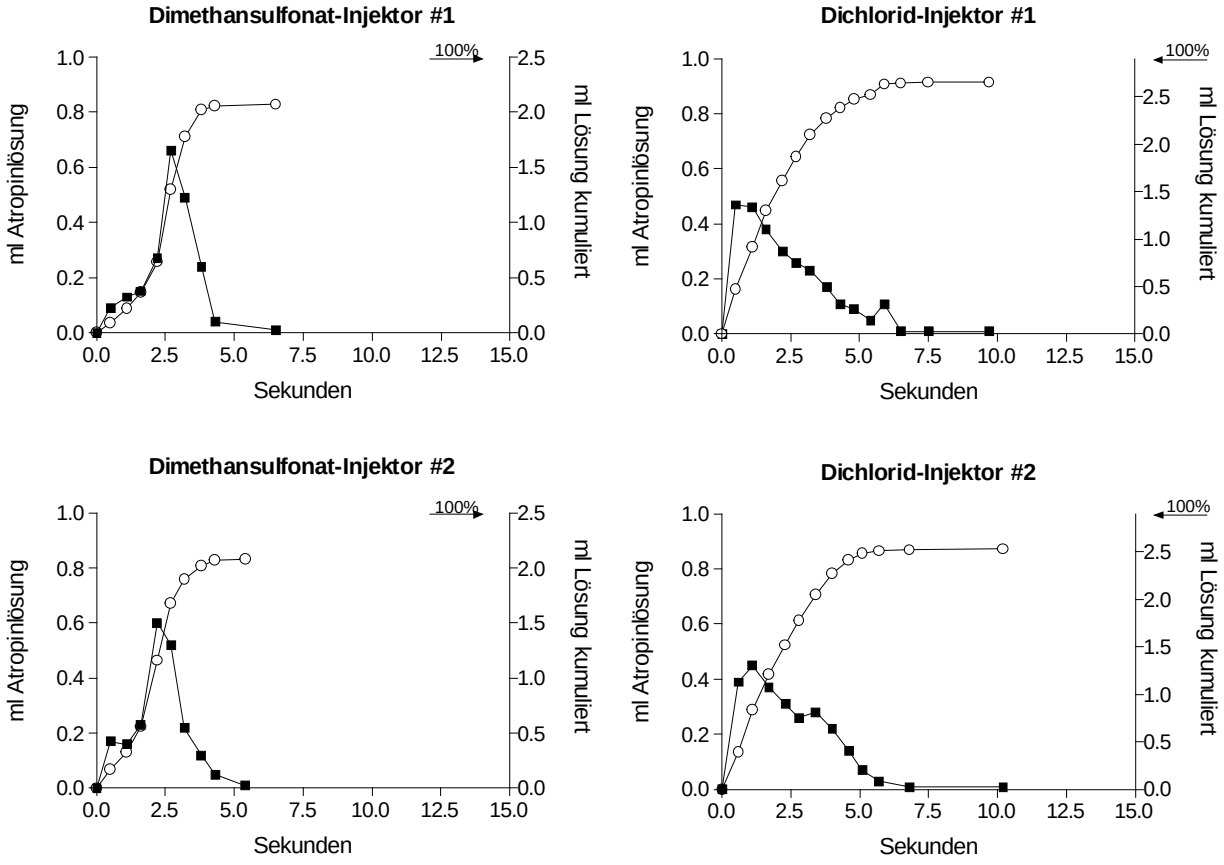


Abb. 3-4
Volumen-Zeit-Profile für ejizierte Atropinlösung (berechnet) aus HI-6 DMS-bzw. 2Cl-Injektoren (MMT).
Geschlossene Symbole: ml Atropinlösung pro Fraktion zur Zeit t. Offene Symbole: Volumen Atropinlösung, zur Zeit t kumuliert.

Nicht ejizierbare Residualmassen

Im Mittel verhielten sich beide Injektoren bezüglich HI-6 gleich. Etwa 95% der Füllmasse war unabhängig vom Salztyp nach 75 s abgegeben worden. Das Totvolumen im DMS Injektor lag um ein Drittel höher. Mit der im Vergleich zu 2Cl Injektoren um 14% kleineren Füllmenge an Atropinsulfat-lösung setzten die DMS-Injektoren ca. 4% der Atropindosis weniger frei.

Tabelle 3-8
Nicht ejizierbare Residualmassen 75 Sekunden nach Abschuß der Injektoren (n = 2).

	HI-6 DMS		HI-6 2Cl	
	mg	mg eingefüllt	mg	mg eingefüllt
HI-6 Masse	35	691	37	577
Gesamtlösungsmasse	413	3191	348	3477
Atropinlösungsmasse (Differenz)	378	2500	311	2900
Totvolumen [%] *)	13,6	-	10,1	-

*) Berechnet mit 0,765 ml/g für HI-6 2Cl und 0,657 ml/g für HI-6 DMS.

Insgesamt machte der neue Injektor einen guten ersten technischen Eindruck. Unabhängig vom Salztyp waren rund 85% m/m an fertiger Lösung in 4-7 Sekunden ejiziert worden, wobei das Volumen reiner Atropinlösung bei DMS mit 82% etwas diskriminiert war. HI-6 DMS konnte 1-2 Sekunden schneller aufgelöst werden als HI-6 2Cl.

Freisetzung bei 5°C ohne Gegendruck

Ejektionscharakteristika

Bei 5 ± 0,5°C dauerte die Ejektion im Mittel 7 Sekunden, das Nachtropfen bis zu 14 Sekunden. Die HI-6 Maximalkonzentrationen waren bei DMS auf 2/3 gefallen, bei 2Cl auf 2/5, der HI-6 DMS Peak war verbreitert. Die Streuungen der DMS-Konzentrationswerte waren vergleichsweise groß und wiesen auf stärkere individuelle Unterschiede der einzelnen Lösekurven hin. Einige

Fraktionen aus den 2Cl Injektoren waren mit bis zu 0,43 M gegenüber der maximalen Löslichkeit von 0,37 M übersättigt, die Zielkonzentration von 0,46 M wurde aber nicht erreicht.

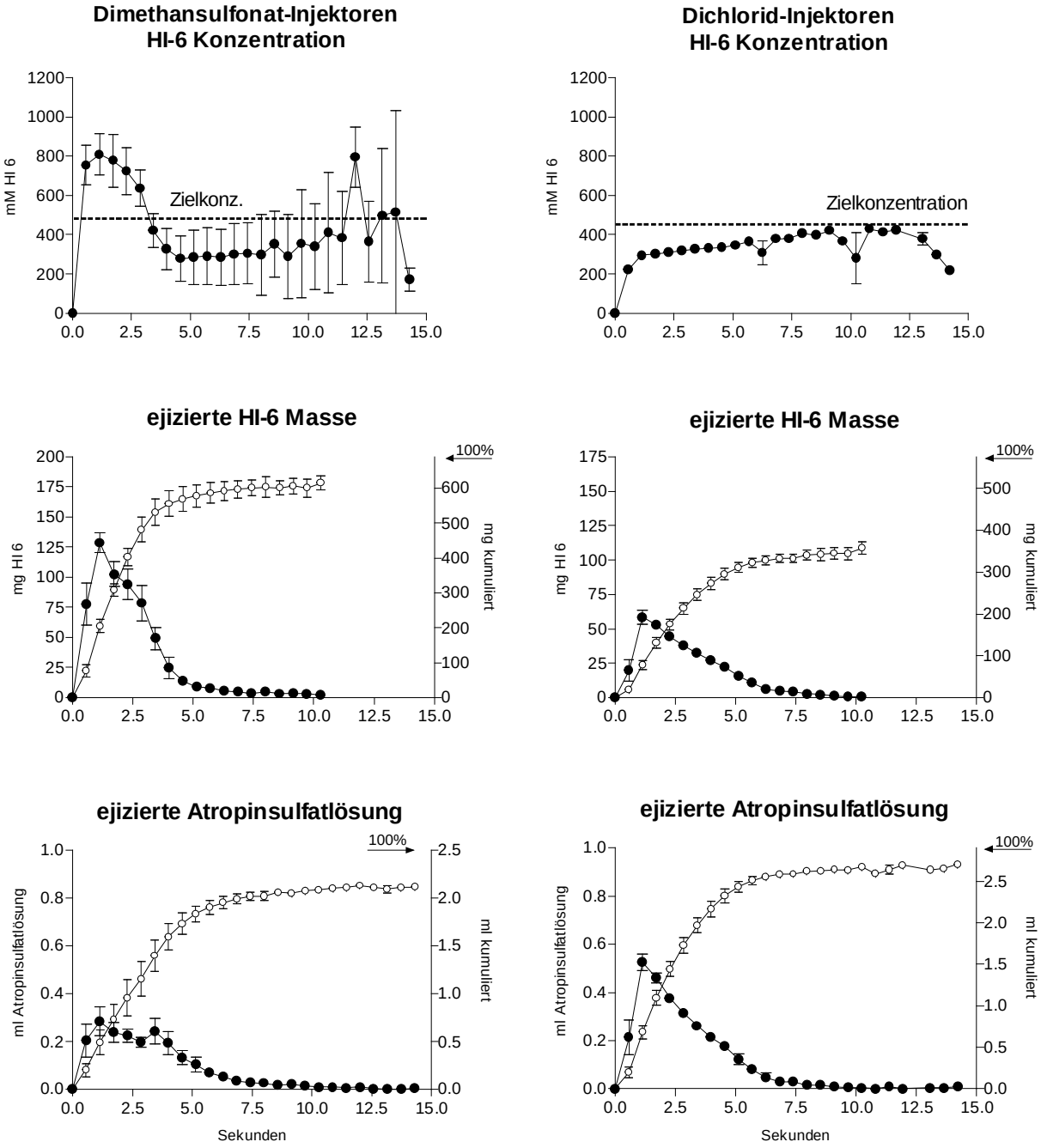


Abb. 3-5

Zeitabhängige Ejektionsprofile für HI-6 Konzentration, HI-6 Masse und Volumen der Atropinsulfatlösung (rechnerisch von HI-6 befreit) aus MMT-Injektoren.
N = 6, Schwankungen als SEM per Fraktion, symbolisiert durch Fehlerbalken. Geschlossene Symbole: Wert der Fraktion zur Zeit t. Offene Symbole: kumulierter Wert zur Zeit t. Zielkonzentration gestrichelt angedeutet.

Die Profile der ejizierten HI-6 Massen hatten für beide Salze jetzt fast die gleiche Form. Die sehr hohe DMS Lösegeschwindigkeit war gesunken, die Ausstoßzeit etwa verdoppelt. Wie erwartet, war die ejizierte HI-6 2Cl Gesamtmenge deutlich reduziert und lag bei 2/3, während diejenige von HI-6 DMS nahezu unverändert 95% vom Soll ausmachte.

Der Ausstoß der Atropinlösung hinkte dem DMS-Ausstoß kaum noch nach. Die Ejektion der DMS-Lösung dauerte 3,5 Sekunden länger, die der 2Cl-Lösung eine Sekunde länger als bei Raumtemperatur.

Die Erhöhung innerer Widerstände hatte die Ausstoßgeschwindigkeit erwartungsgemäß gesenkt. Bezogen auf 5 Sekunden bei Raumtemperatur sank die DMS-Ejektion auf rund 90%, die von 2Cl auf 60%. Das Volumen ejizierter reiner Atropinlösung der 2Cl-Injektoren fiel auf 98%.

Kontrolle

Da Ejektate, die bewußt als Ganzes aufgefangen wurden, keine größeren Unterschiede als 4% zur Summe der Einzelfraktionen zeigten, konnten beide Verfahren zur Ermittlung der Ejektionsleistung herangezogen werden.

Tabelle 3-9
Kontrollen ohne Gegendruck, n = 2; fraktioniertes Sammeln, n = 6; Sammelzeit 0-75 s.

	HI-6 DMS		HI-6 2Cl	
	Kontrolle	fraktioniert	Kontrolle	fraktioniert
mg HI-6-Salz ejiziert	646	625	354	347
ml ejizierte Lösung	2,6	2,5	2,9	2,9

Freisetzung unter Gegendruckbedingungen bei Raumtemperatur sowie bei 5°C

Da keine Erfahrungen mit den neuen Injektoren vorlagen, wurden 5 bzw. 10 Sekunden als Zeit für die Ejektion in die luftdicht verschlossenen Vials festgelegt. In dieser Zeit stellte sich zwar kein stabiler Enddruck von ca. 1,35 bar ein (siehe später), der Unterschied zur Gesamtfüllmenge belief sich aber auf unter 5% der Gesamtfüllmenge. Insgesamt resultierten 2^3 Versuchsgruppen mit zwei Salztypen, zwei Temperaturen (5°C, 25°C) und den zwei Ejektionszeiten (Abb. 3-6).

Ejektionsleistung unter Gegendruck

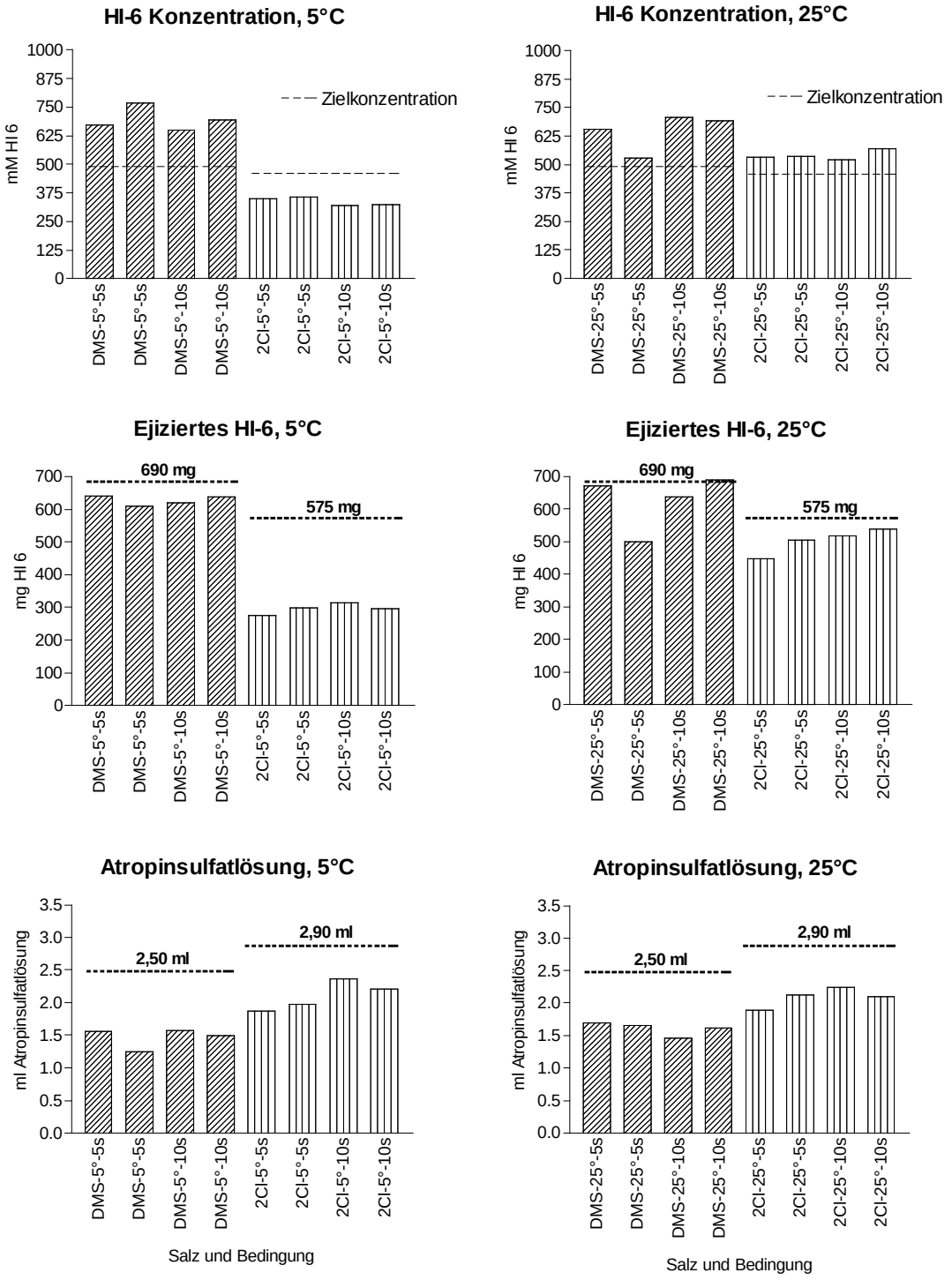


Abb. 3-6

Gegendruckversuche an MMT-Injektoren. Einzelresultate mit n = 2 pro Ejektionszeitgruppe: HI-6 Konzentration, HI-6 Masse und Masse an rechnerisch von HI-6 befreiter Atropinsulfatlösung im Ejektat. DMS-Injektoren schräggestreift, 2Cl-Injektoren vertikal gestreift. Erwartete Zielkonzentration bzw. spezifizierte Füllmengen gestrichelt angedeutet.

Die individuellen Injektoren sind in den Diagrammen als Säulen in stets gleicher Reihenfolge angeordnet. Gestrichelte Linien geben spezifizierte Füllungs- oder Erwartungswerte wieder.
Die Unterschiede zwischen den 5- und 10-Sekunden Gruppen waren klein. Für HI-6 2Cl war eine leichte Tendenz zu einer ca. 5% besseren Leistung nach 10 Sekunden zu erkennen. Die beiden Zeitgruppen wurden bei solch geringen Unterschieden für die Auswertung zusammengefaßt.

Relativ zur Füllmenge hatten die DMS-Injektoren ca. 10% weniger Atropinlösung abgegeben als die 2Cl-Injektoren.

Tabelle 3-10 Ejektat unter Gegendruck. Mittelwerte aus n = 4 in % der Sollfüllmenge. 5- und 10-Sekundenwerte zusammengefaßt (n = 4 + 4), Streuung als VK.

	HI-6 DMS		HI-6 2Cl	
	5°C	25°C	5°C	25°C
Lösungsmasse	66 (± 8%)	70 (± 6%)	69 (± 10%)	74 (± 7%)
davon HI-6 Masse	91 (± 2%)	91 (± 14%)	51 (± 6%)	87 (± 8%)
davon Volumen Atropinsulfatlösung *)	59 (± 11%)	64 (± 6%)	73 (± 11%)	72 (± 7%)

*) Rechnerisch von HI-6 befreit.

Bezogen auf die Füllung konnten nur rund 70% der Lösungsmasse, unabhängig von Temperatur, Salztyp oder Ejektionszeit, unter simuliertem abgegeben werden. Die Auswurfleistung für die reine Atropinlösung mit 60% - 70% war darüber hinaus generell sehr unbefriedigend.

Vergleichsergebnisse ohne Gegendruck

Hierzu wurden die einzelnen Werte aus den Versuchen mit fraktionierter Sammlung bis zu möglichst 10 Sekunden kumuliert. Das rechnerische Injektionsende lag damit zwischen 5,4 und 10,2 Sekunden.

Tabelle 3-11
Vergleichswerte aus Fraktionsdaten ohne Gegendruck. Mittelwerte in % der Füllmenge. 5- und 10-Sekundenwerte zusammengefaßt, Streuung als VK. 5°C: n = 6; 25°C: n = 2.

	HI-6 DMS		HI-6 2Cl	
	5°C	25°C	5°C	25°C
Lösungsmasse	84 (± 1%)	85	85 (± 2%)	90
davon HI-6 Masse	89 (± 6%)	93	59 (± 7%)	92
davon ml Atropinsulfatlösung *)	83 (± 2%)	83	91 (± 2%)	90

*) Rechnerisch von HI-6 befreit.

Die Masse der ejizierten fertigen Lösung lag um 17-20% höher als unter Gegendruck und zeigte den deutlichen Einfluß auf die Gesamtleistung. Bei den DMS-Injektoren war der geringere Ausstoß an rechnerisch reiner Atropinlösung dafür verantwortlich, bei den 2Cl-Injektoren eine Kombination aus geringerem HI-6- und Atropinausstoß.

Überwindbarer Gegendruck

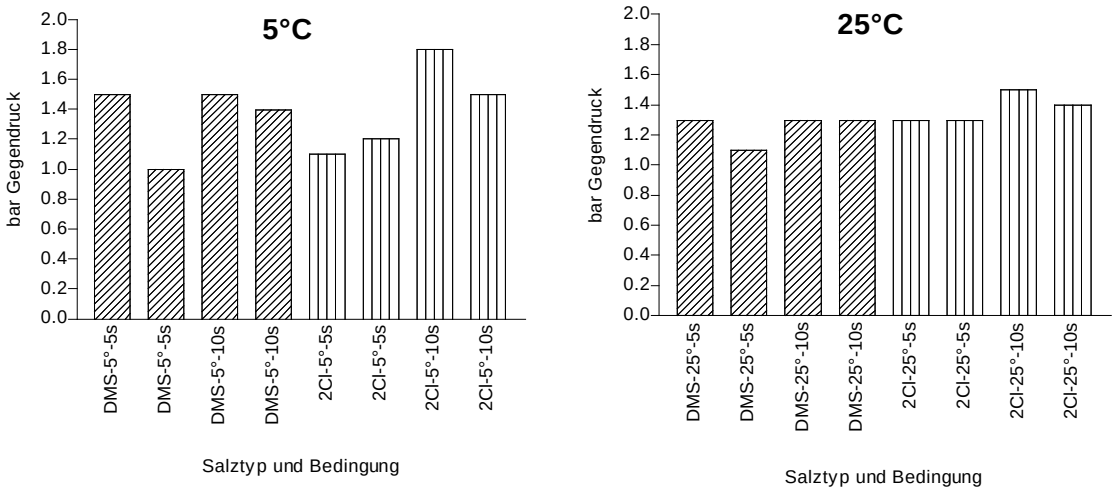


Abb. 3-7
Gegendrucke der einzelnen MMT-Injektoren mit n = 2 je Ejektionszeitgruppe. DMS-Injektoren schräg gestreift symbolisiert, 2Cl-Injektoren vertikal gestreift.

Ein Temperatureffekt zeigte sich für den mittleren Enddruck nicht. Daher kann, unabhängig vom Salztyp für 5 Sekunden Ejektionszeit ein erzeugbarer Druck (n = 8) von 1,22 bar angegeben werden, für 10 Sekunden 1,46 bar. Damit verhielten sich die Meridian Injektoren nicht schlechter als die untersuchten HI-6 DMS Astra-Injektoren, die 1,37 bar erzeugen konnten.

Mechanische Unterschiede und Unzulänglichkeiten der Prototypen

Sie wurden besonders unter Gegendruckbedingungen sichtbar. Die obere Filtereinheit von 3 Injektoren hatte eine kleinere Öffnungsweite und somit u. U. einen höheren Strömungswiderstand. In 4 von 16 Fällen war das obere Filterscheibchen einseitig aus seinem Sitz gedrückt. Die Verteilung des Flüssigkeitsstromes über das Pulverbett war damit nicht mehr gleichmäßig.

Tabelle 3-12
Beobachtungen an MMT-Injektoren während der Ejektion mit Gegendruck.

5°C									25°C							
DMS-5s	DMS-5s	DMS-10s	DMS-10s	2-Cl-5s	2-Cl-5s	2-Cl-10s	2-Cl-10s		DMS-5s	DMS-5s	DMS-10s	DMS-10s	2-Cl-5s	2-Cl-5s	2-Cl-10s	2-Cl-10s
		x	x					oberer Filter zur Hälfte aus seinem Sitz gedrückt				x	x			
		x						undichte Verkrimpung an der Kanüle			x	x				
	x							obere Filtereinheit mit kleinerer Bohrung		x				x		

Wegen mangelnder Festigkeit konnten im Einzelfall etwa bis zu 0,1 ml Lösung an der Kanülenverbördelung austreten.

Die inneren Reibungswiderstände, um den Gummikolben zu bewegen, waren in den 2Cl Injektoren offensichtlich höher. In einem Versuch, in dem auf

abgefeuerte Injektoren über die Kanüle ein steigender Gasdruck gegen die Feder aufgegeben wurde, stieg der Kolben in drei 2Cl-Injektoren bei 3,3 bar und in drei DMS-Injektoren bei 3,0 bar wieder an. Daher kann vermutet werden, daß in 2Cl-Injektoren insgesamt etwas weniger Federkraft zur Verfügung stand. Dies hing womöglich mit Unterschieden im Gummimaterial für die Stempel, der Stempelsilikonisierung oder der Stempeldimension zusammen.

3.2 Alterung konzentrierter, ungepufferter HI-6 Lösungen

Wäßrige Testlösungen, 400 mM an HI-6 2Cl bzw. DMS wurden in Borosilikatglas oder Polypropylen bei 37 ± 0,5°C 22 Wochen gelagert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden nach Umschütteln Proben gezogen, mittels UV/VIS Photometrie, HPLC untersucht und der pH bestimmt.

Neben den bereits bekannten Abbauprodukten, die auf eine untergeordnete primäre Spaltung der Aminal-Acetal-Brücke verwiesen (s. a. Zerfallsschema, Abb. 3-13), trat als Hauptprodukt M3 oder „HI-6 Säure“ auf, welches in verdünnten Lösungen nur in geringer Menge beobachtet werden konnte (Eyer, Hell et al. 1986).

3.2.1 Charakterisierung der „HI-6 Säure“ (M3)

Das durch Kationenaustausch-Chromatographie isolierte und mit Ameisensäure angesäuerte Material fiel nach Lyophilisation und Kristallisation aus wäßrigem Ethanol in Form braunrosafarbener Flitter an.

Photometrische Untersuchung

Das UV-Spektrum von M3 im Sauren zeigte nur kleine Unterschiede zu HI-6.

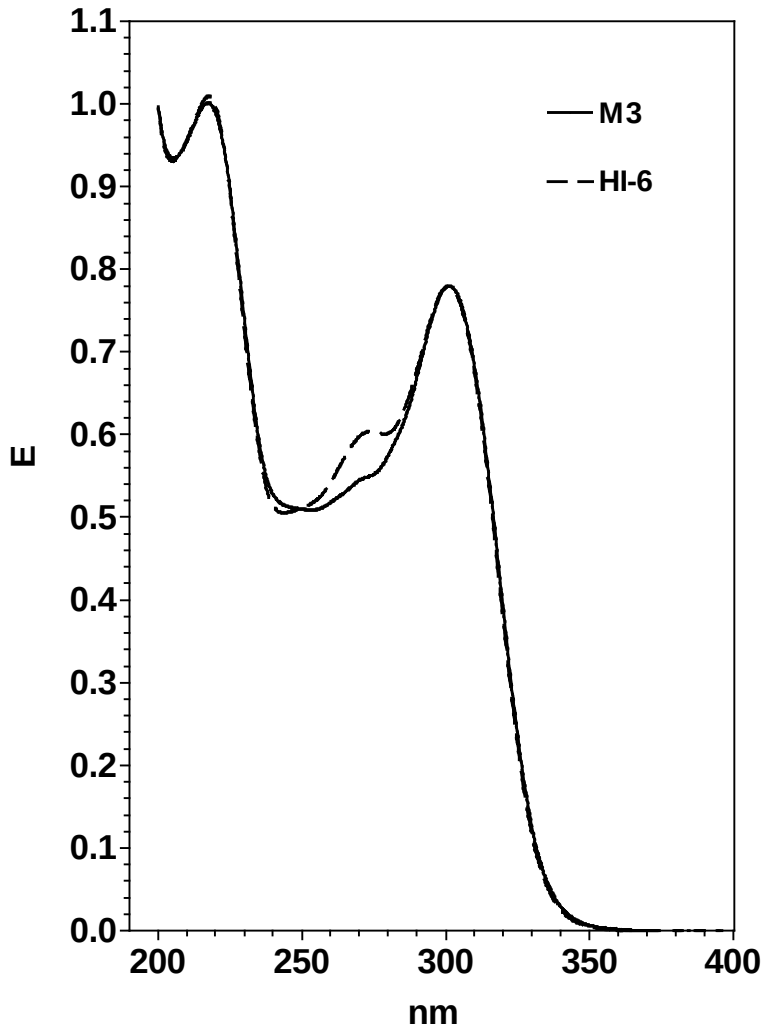


Abb. 3-8
Bei 300 nm auf gleiche Intensität normalisierte UV Spektren von M3 (64,2 µM) und HI-6 (61,3 µM) in 20 mM H_3PO_4, d = 1 cm.

Allerdings war die ausgeprägte Schulter von HI-6 bei 273 nm bei dem neuen Produkt nur sehr schwach zu erkennen. Dieses Charakteristikum diente bereits früher als Strukturhinweis auf die „HI-6 Säure“, da 1-Methyl-isonicotinsäure Iodid in diesem Bereich schwächer absorbiert als 1-Methyl-isonicotinamid Iodid (Eyer, Hell et al. 1986). Aus der Absorption bei 300 nm

errechnete sich aus der Einwaage unter Zugrundelegung des identischen Extinktionskoeffizienten des Pyridinium-2-aldoxim-Ringes wie bei HI-6 ein scheinbares Molekulargewicht von 399, was dem Molekulargewicht eines Bisformiats der „HI-6 Säure“ annähernd entsprach (397,3). Dieses Salz war aufgrund der Herstellungsbedingungen zunächst erwartet worden.

HPLC-Untersuchung

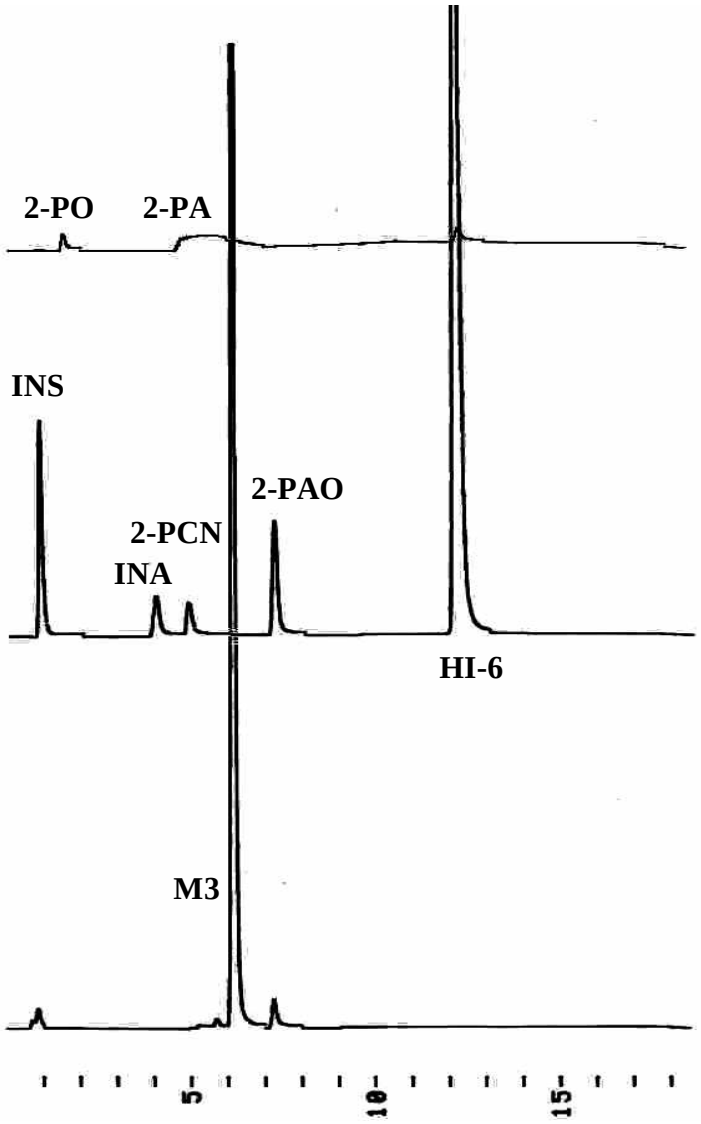


Abb. 3-9

HPLC-Chromatogramme von M3 (200 µM) und authentischen Standards. Methode M3/HI-6 UW 250 nm. M3 = "„HI-6 Säure“", INS = Isonicotinsäure, INA = Isonicotinamid, 2-PCN = 2-Pyridinnitril, 2-PAO = 2-Pyridinaldoxim, 2-PA = 2-Pyridinaldehyd, 2-PO = 2-Pyridon

Das HPLC-Chromatogramm (Abb. 3-9, untere Spur) wies geringe Verunreinigungen an Isonicotinsäure und 2-Pyridinaldoxim auf (jeweils ca. 2,6 mol%), was bei einem geringen Zerfall von „HI-6 Säure“ bei der Aufarbeitung erwartet werden konnte.

Kontrollierter Abbau

In einem chemischen Abbauexperiment wurde „HI-6 Säure“ oder HI-6 in 0,1 M Phosphatpuffer bei pH 4 und 92°C für 6,5 h inkubiert und die jeweiligen Zerfallsprodukte wurden verglichen. Das Zerfallsmuster in den folgenden Chromatogrammen zeigt, daß aus HI-6 vor allem INA (Rt = 2,89 min) gebildet wurde und kaum INS (Rt = 8,10 min), während der Zerfall von „HI-6 Säure“ INS (Rt = 8,10 min) aber keinerlei INA freisetzte. Die mit den authentischen Isonicotinsäurederivaten aufgestockten Proben zeigen die oberen Chromatogramme. Damit war der Strukturvorschlag der Verbindung als „HI-6 Säure“ zunächst erhärtet (Abb. 3-10).

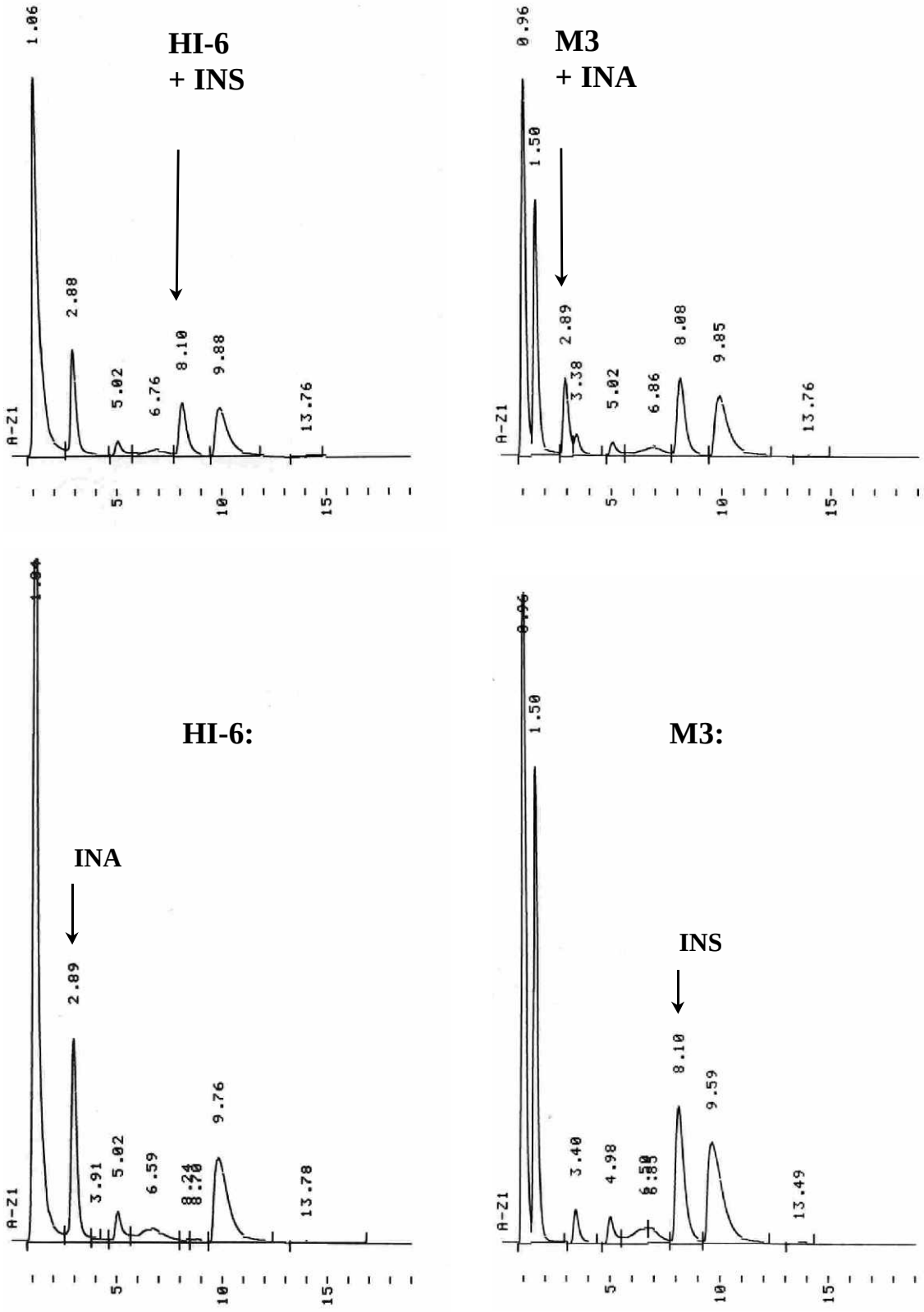


Abb. 3-10

Unterschiedliche Zerfallsmuster von HI-6 und M3. HPLC-analytischer Beleg (Methode INA/INS 260nm). Retentionszeit in min.

Untere Spur: Jeweils 2 mM Lösungen bei pH 4 in 0,1 M Phosphatpuffer 6,5 Stunden bei 92°C inkubiert. Obere Spur: HI-6 mit aufgestockter INS, M3 mit aufgestocktem INA.

Titration der Säure- und Oximfunktion

Die hierzu hergestellte wäßrige Lösung des Präparates (M3) wies eine Konzentration von 11,5 mM auf, die photometrisch über die Absorption seiner Oximfunktion berechnet worden war. Die Titration eines 10,4 µmol Aliquots ergab einen Laugenverbrauch von 11,7 µmol NaOH im Sauren (pH 3,6 - 5,5), was für das Vorliegen von einer Carboxylgruppe im Molekül sprach. Der Verbrauch von 10,3 µmol NaOH im Neutralen bis Alkalischen (pH 5,5 - 9,5) unter Gelbfärbung der Lösung deutete auf die erwartete Oximfunktion im Molekül hin. Der aus der Titrationskurve berechnete pK_S-Wert der Oximfunktion lag mit 7,4 sehr nahe bei dem für HI-6 bestimmten: 7,28 (Hagedorn, Stark et al. 1972).

Das Ergebnis im Sauren war zwar als Hinweis auf eine Carbonsäurefunktion zu werten, erlaubte aber noch keine eindeutige Zuordnung zur noch zu beweisenden Isonicotinsäurefunktion. Denn dazu war der pH von 3,6 bei Beginn der Titration offensichtlich zu hoch. Dies zeigt ein Vergleich mit den Eigenschaften von 4-Carboxy-1-methyl-pyridinium Betain.

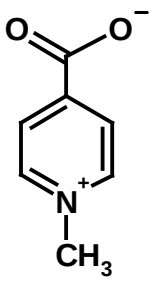


Abb. 3-11
Chemische Formel von 4-Carboxy-1-methyl-pyridinium Betain.

Wegen der starken Ähnlichkeit seiner funktionellen Umgebung eignet sich dieses innere Salz als Modell für den Isonikotinsäurering in M3. Mit einem pKs von 1,72 ist die Carbonsäurefunktion dieser Verbindung so stark sauer, daß sie bei pH 3,6 zu über 99% dissoziiert vorliegt (Black 1955). D. h. eine 11,5 mM Lösung erzeugte rechnerisch einen pH von 1,8. Damit stellte sich die Frage, welche Säurefunktion eigentlich titriert worden war.

Chloridsalz der „HI-6 Säure“

Für massenspektroskopische und NMR-Untersuchungen erschien ein formiathaltiges Präparat weniger geeignet, deshalb wurde das Bisformiat mit HCl versetzt und anschließend aus Ethanol kristallisiert. Das nach Einwaage photometrisch ermittelte scheinbare MG lag mit 369 höher als das berechnete (360,2), was zunächst auf Verunreinigungen zurückgeführt wurde. Bei der Mikrotitration mit NaOH fand sich zwar eine ganze Oximfunktion aber nur eine halbe Säurefunktion pro Molekül im pH-Bereich von 2-4. Dieser Befund war zunächst schwer zu deuten.

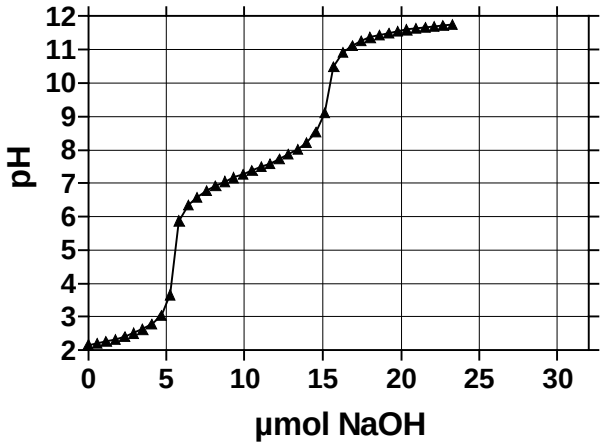


Abb. 3-12
Potentiometrische Mikrotitration von M3 2Cl. 10,2 µmol entsprechend 11,3 mM in 50 mM KCl mit 1,16 M NaOH. M3 photometrisch bestimmt, als HI-6 berechnet.

Massenspektroskopische Untersuchung

Die Analyse von „HI-6 Säure–Dichlorid“ (ESI^+ - Modus, gesättigte Lösung in Methanol) mit HI-6 2Cl als Standard ergab folgende Resultate (Tabelle 3-13):

Tabelle 3-13
Massenspektroskopische Meß- und Literaturdaten zu M3 2Cl, HI-6 2Cl. ESI+ -MS. M/z-Verhältnis, relative Intensität in % in Klammern.

	M3 2Cl	HI-6 2Cl	HI-6 2Cl *)
(Dikation) $^{2+}$= Molekülion	144,6	144,1	144,0
	(100)	(100)	(100)
(Dikation - H^+)$^+$	288,0	287,0	287
	(35)	(14)	(13)
(Dikation - H^+ - CH_2O)$^+$	258,1	257,0	257
	(160)	(48)	(29)
1: $(X)^+$	165,2	165,2	-
	(73)	(30)	
2: (X - CH_2O)$^+$	**137,2**	**136,1**	-
	(85)	(108)	

*) CAD-MS (D'Agostino, Provost et al. 1996).

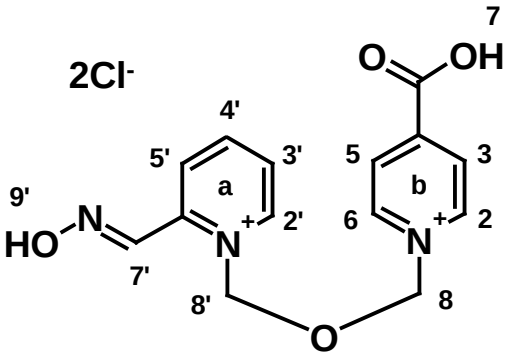
Die Daten aus der Literatur stimmten mit den erhaltenen für HI-6 sehr gut überein. Die Stickstoffregel für einfach geladene Molekülionen war für die zweifach geladenen (m/2z) Ionen der beiden Verbindungen analog erfüllt (Hesse, Meier et al. 1979). Mit drei Stickstoffen (ungerade) zeigte M3 eine halbierte ungerade Masse. HI-6 mit 4 Stickstoffen (gerade) dagegen eine halbierte gerade Massenzahl.

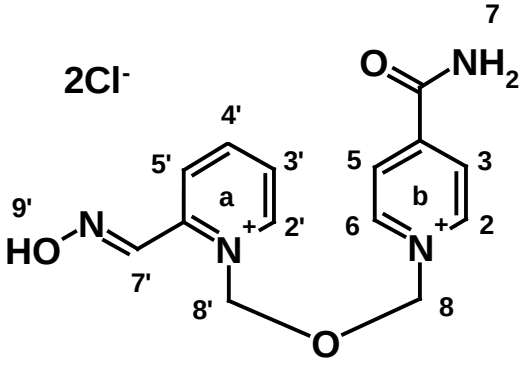
Das einfach geladene (m/1z) und korrespondierende Einring-Bruchstück von M3 [2: (X - CH_2O)$^+$] mit ungerader Massenzahl konnte demnach nur ein einziges Stickstoffatom enthalten. Mit einer um eins höheren Massenzahl wie dasjenige aus HI-6, konnte es sich nur um ein Bruchstück aus der „HI-6 Säure“ handeln, denn die OH-Funktion ist mit 17 relativen Masseneinheiten um eine Masseneinheit schwerer als die NH_2-Funktion mit 16.

Fragment 1: (X) wurde bereits früher als womöglich bicyclisches Pyridiniumion mit intakter Oxidimethylengruppe beschrieben (Wils and Hulst 1988). Da sich das Spaltprodukt beider Verbindungen nicht in der Masse unterschied, konnte es nur das Ringbruchstück mit der Oximfunktion sein.

NMR-Untersuchung

Tabelle 3-14
^{1}H - NMR Daten von HI-6 und der „HI-6-Säure“ in D_2O.





Beide Verbindungen			„HI-6 Säure“		HI-6 (Amid)	
Kern Pos.	rel. Intensität	Multi-plizität	δ [ppm]	J [Hz] (Bindungszahl)	δ [ppm]	J [Hz] (Bindungszahl)
2, 6	2	m	**9,13**	(6,5 (^{3}J))*)	**9,21**	(7,0 (^{3}J))*)
3, 5	2	m	**8,43**	(6,5 (^{3}J))*)	**8,47**	(7,0 (^{3}J))*)
8	2	s	6,42	-	6,42	-
2'	1	dd	9,05	6,2 (^{3}J) 1,3 (^{4}J)	9,05	6,3 (^{3}J) 0,9 (^{4}J)
3'	1	t(m)	8,11	8,0 (^{3}J) 6,2 (^{3}J) 1,5 (^{4}J)	8,12	8,1 (^{3}J) 6,3 (^{3}J) 1,5 (^{4}J)
4'	1	dt	8,66	8,0 (^{3}J) 8,0 (^{3}J) 1,3 (^{4}J)	8,67	8,1 (^{3}J) 8,1 (^{3}J) 0,9 (^{4}J)
5'	1	dd	8,48	8,0 (^{3}J) 1,5 (^{4}J)	8,49	8,1 (^{3}J) 1,5 (^{4}J)
7'	1	s	8,68	-	8,68	-
8'	2	s	6,27	-	6,29	-

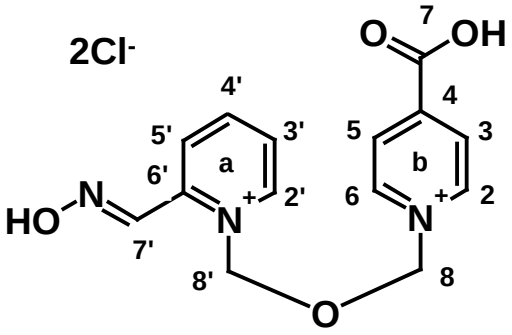
*) Die Feinstruktur der Dubletts der Protonen des Nicotinsäure-/Nicotinamidteils läßt sich mit einfachen Kopplungsmustern nicht mehr erklären, weshalb die angegebene Kopplungskonstante nur als Schätzung für eine ortho-Kopplung zu verstehen ist.

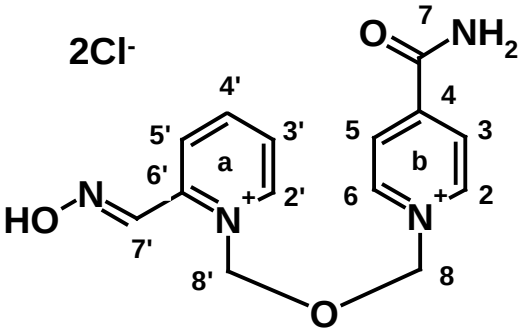
Die ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren wiesen hohe Ähnlichkeiten der „HI-6 Säure“ mit HI-6 auf, zeigten aber auch klare Unterschiede.

Die in D_2O schnell tauschenden Protonen der charakteristischen Säure- bzw. Amidfunktion (7) und diejenigen der Oximfunktion (9') waren nicht meßbar. Die Lage der übrigen Signale und ihre Kopplungsmuster ließen eine eindeutige Zuordnung der Protonen zu. Für die „HI-6 Säure“ konnte die erwartete HI-6 Teilstruktur klar bestätigt werden.

Die einzigen markanten Unterschiede zeigten sich an der Hochfeldverschiebung der aromatischen Protonen im Ring mit der vermuteten Säurefunktion. Einmal lagen die hierzu ortho stehenden Protonen (3,5) geringfügig höher, womit sich im Gegensatz zu HI-6 ihr Multiplett klar vom doppelten Dublett des aromatischen Protons aus dem Ring mit der Oximfunktion (5') trennte. Und zum anderen lag das Multiplett der zur Säurefunktion meta-ständigen Protonen (2,6) deutlich höher als das äquivalente von HI-6 mit der Amidfunktion.
Für beide Verbindungen konnte aus dem NMR-Spektrum eine syn-Konfiguration (E) der Oximfunktion herausgelesen werden. Denn die Methinprotonenverschiebung (7') lag mit 8,68 ppm für die „Säure“ bzw. das Amid im Bereich von syn-konfigurierten (E) Oximfunktionen substituierter Benzoloxime mit 8,00 bis 8,57 ppm. Die anti-Konfiguration (Z) solcher Oxime erzeugt dagegen Verschiebungen von nur 7,17 bis 7,63 ppm (Pejkovic-Tadic, Hranisavljevic-Jakovljevic et al. 1965). Zum Vergleich weist das sehr ähnliche Obidoxim in der syn-syn-Form (E, E) ebenfalls eine Verschiebung von 8,33 ppm auf (Spöhrer 1994).

Tabelle 3-15
^{13}C - NMR Daten von HI-6 und der „HI-6-Säure“ in D_2O.





	Ring a			Ring b	
	„HI-6 Säure“	HI-6		„HI-6 Säure“	HI-6
Kern	δ [ppm]	δ [ppm]	Kern	δ [ppm]	δ [ppm]
2'	145,7	145,3	2, 6	144,9	144,7
3'	128,6	128,6	3, 5	**128,1**	**126,9**
4'	148,8	148,4	4	**153,5**	**151,1**
5'	128,2	128,1			
6'	147,6	147,2			
7'	142,5	142,1	7	**167,7**	**166,5**
8'	86,3	85,8	8	87,4	87,0

Ausgehend von der eindeutigen Zuordnung der Protonen konnten in einem HMQC-Korrelationsspektrum (hetero nuclear multiquantum coherence) die entsprechenden ^{13}C-Kerne für HI-6 ausgemacht werden. Die quaternären ^{13}C-Kerne waren hierbei mittels DEPT-Technik (distortionless enhancement by polarization transfer) ausgeblendet. Die Zuordnungen aus der Literatur für die ^{13}C-Kerne 7', 2, 6 und 4' von HI-6 stimmten mit den hier gefundenen nicht überein. Für die quaternären Kerne 7, 4 und 6' waren die Literaturdaten wiederum zutreffend (Waysbort, Balderman et al. 1981).

Zur Strukturuntersuchung der „HI-6 Säure“ wurde ebenfalls ein HMQC-Experiment gefahren, wobei allerdings diesmal die quaternären Kerne nicht ausgeblendet waren.

Eine klare Verschiebung zu tiefem Feld (geringe Abschirmung) konnte im Spektrum der „HI-6 Säure“ erwartungsgemäß für den Carbonylkohlenstoff (7), für das C-Atom im aromatischen Ring (4) und für die beiden weiteren in ortho-Position (3,5) hierzu festgestellt werden.

Folgerungen

Damit dürfte der Strukturbeweis für die „HI-6 Säure“ eindeutig erbracht sein: Das stark saure Produkt ist um eine Masseneinheit schwerer als HI-6, zeigt klare Unterschiede in der chemischen Verschiebung der Protonen bzw. ^{13}C-Kerne um die Carbonylfunktion herum, zerfällt in INS ohne INA-Bildung, weist aber sonst alle Charakteristika des Pyridinium-2-aldoxim-Ringes auf.
Das merkwürdige pH-Titrationsergebnis bedarf aber einer Interpretation, die aus Gründen der Übersichtlichkeit bereits hier erfolgen soll. Die Acidität der „HI-6 Säure“ dürfte sehr hoch sein, wenn man den pK_S-Wert von 1,72 für ein Modell, das 4-Carboxy-1-methyl-pyridinium Betain, zugrunde legt (Black, 1955). Damit ist zu erwarten, daß auch „HI-6 Säure“ partiell als Zwitterion vor-liegen kann und der 4-Carboxylat-pyridinium Ring in der Betain-Form mit NaOH nicht mehr titrierbar ist. Folglich fand sich bei der Titration im pH-Bereich von 2-4 kein äquimolarer Laugenverbrauch, da ein Teil des Präparates als Zwitterion und ein anderer als Pyridinium-Carboxylsäure Chlorid vorlag. Aus diesem Grund brachte auch die angefertigte Elementaranalyse des Präparates erratische Ergebnisse mit viel zu geringem Chloridgehalt.

3.2.2 Zerfallsschema

Rein schematisch, ohne eine Säure- oder Basenkatalyse mitaufzuführen, kann der Abbau von HI-6 in konzentrierter Lösung im Sauren unter Berücksichtigung von Literaturdaten folgendermaßen dargestellt werden (Eyer, Hell et al. 1986). Ebenfalls entstehender 2-Pyridinaldehyd und Formaldehyd sind aufgenommen, aber nicht bestimmt worden.

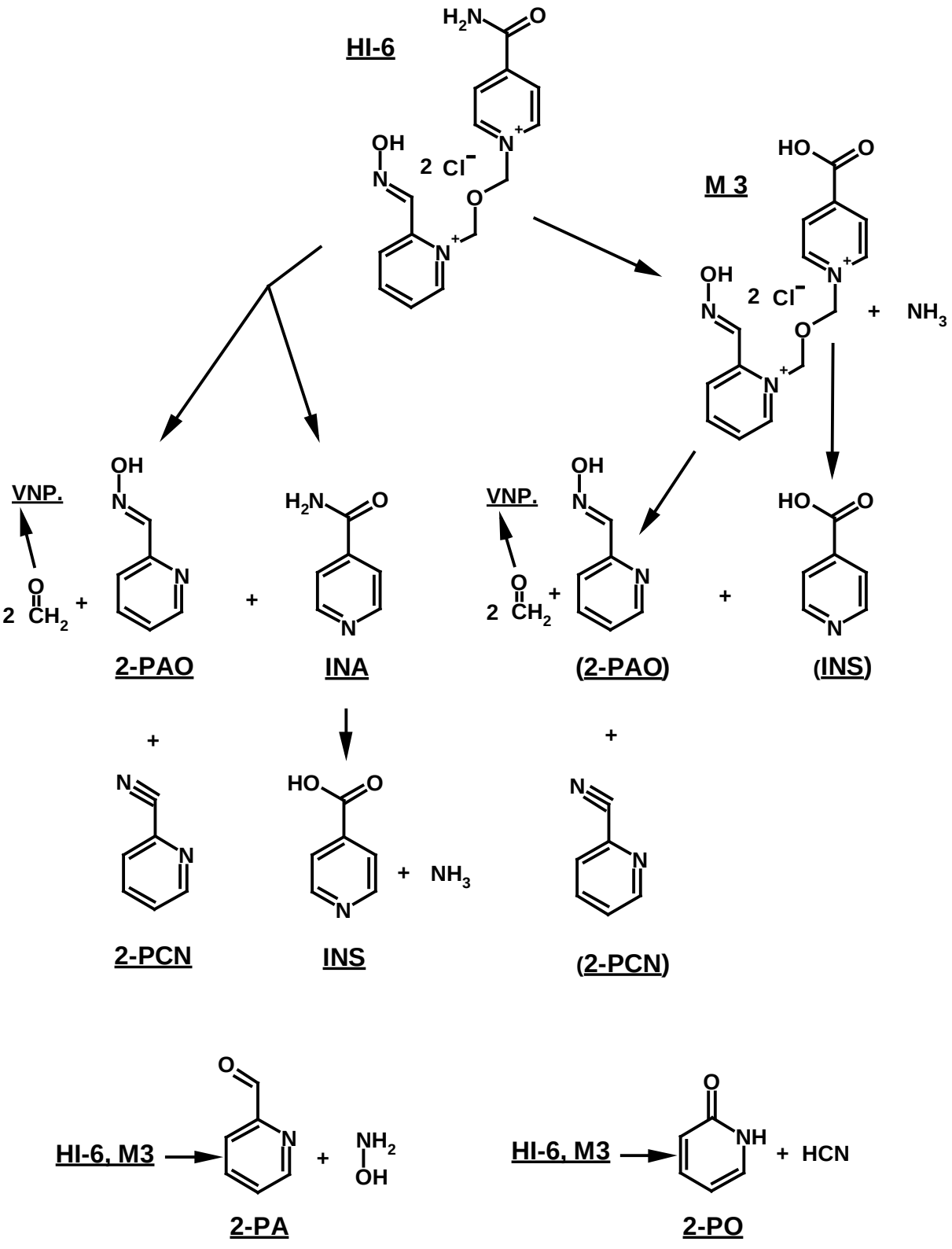


Abb. 3-13

Produktfamilien aus dem Abbau von HI-6 2Cl in 400 mM Lösung, schematisch dargestellt. M3 = „HI-6 Säure“, INS = Isonicotinsäure, INA = Isonicotinamid, 2-PCN = 2-Pyridinnitril, 2-PAO = 2-Pyridinaldoxim, 2-PA = 2-Pyridinaldehyd, 2-PO = 2-Pyridon, VNP. = Vernetzungsprodukte mit M3, HI-6 und anderen Bruchstücken.

3.2.3 pH-Abfall

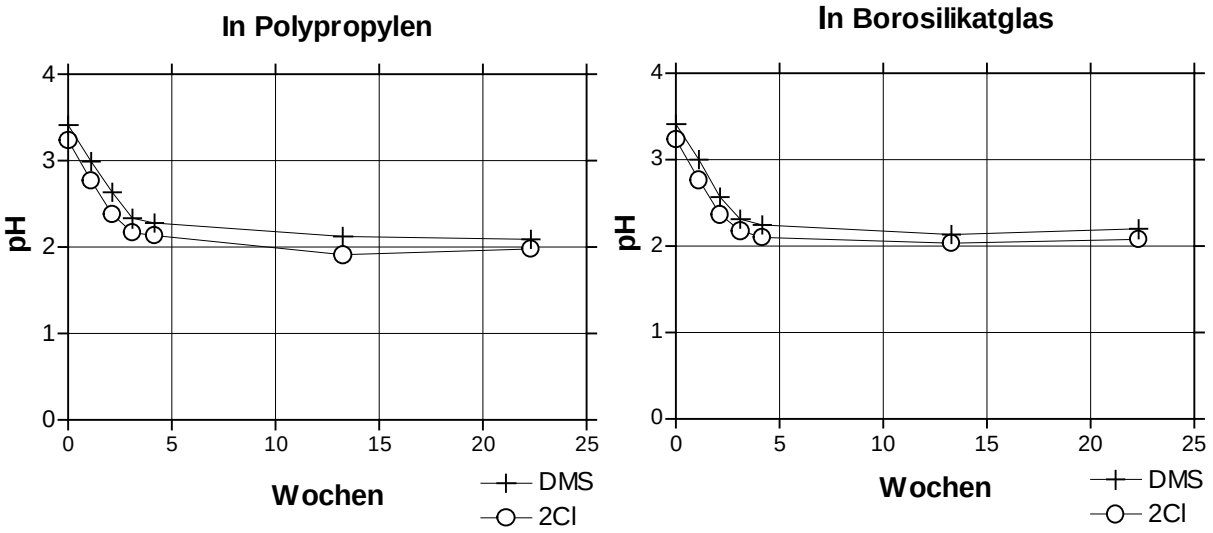
Ob in Polypropylen oder in Borosilikatglas gelagert, ob HI-6 DMS oder 2Cl, der pH-Verlauf war in allen Fällen fast identisch.

Die Werte für DMS lagen stets nur 0,1 - 0,2 pH-Einheiten über denen für 2Cl. Mit einem Start bei pH 3,2 - 3,3 fiel der Wert fast linear innerhalb von 4 Wochen auf pH 2,0 - 2,2 und verblieb dort. Eine initiale Verzögerungsphase war nicht zu beobachten.

Die schnelle pH-Absenkung und damit die offensichtliche Bildung saurer Produkte in der Reaktionslösung war bemerkenswert. Die Protonenaktivität der 0,4 M Lösungen stieg zunächst exponentiell um gut das 14fache von 0,56 mM auf 7,94 mM. Ein solches Verhalten stand aber mit früheren Berichten im Einklang (Fyhr, Nicklasson et al. 1987; Korte and Shih 1993).

Der sich schließlich einstellende pH von 2 hätte eine verdünnte HI-6 Lösung stabilisieren können (Zao and Yang 1987; Eyer, Hagedorn et al. 1988; Jung, Choi et al. 1994), nicht aber die konzentrierte 400 mM HI-6 Lösung im Test.

Abb. 3-14



pH-Entwicklung wäßriger HI-6 2Cl bzw. DMS Lösungen bei 37°C, 400 mM, je n = 1.

3.2.4 Produktbildung

HPLC-Untersuchung

Der Abfall von HI-6 zeigte in Polpropylen einen angenähert sigmoiden Konzentrationsverlauf. Nach einer 1-wöchigen Verzögerungsphase, die eine autokatalytische Vorreaktion vermuten ließ, sank der Wert fast linear in den folgenden 21 Wochen auf 8% der Ausgangskonzentration.

Komplementär dazu entstand hydrolytisch als Hauptabbauprodukt die schon erwähnte „HI-6 Säure“. Anderen Berichten zur Folge hätte nach Bruch der Aminal-Acetal-Brücke vorwiegend INA entstehen sollen (Eyer, Hagedorn et al. 1988; Korte and Shih 1993; Paddle and Dowling 1993).

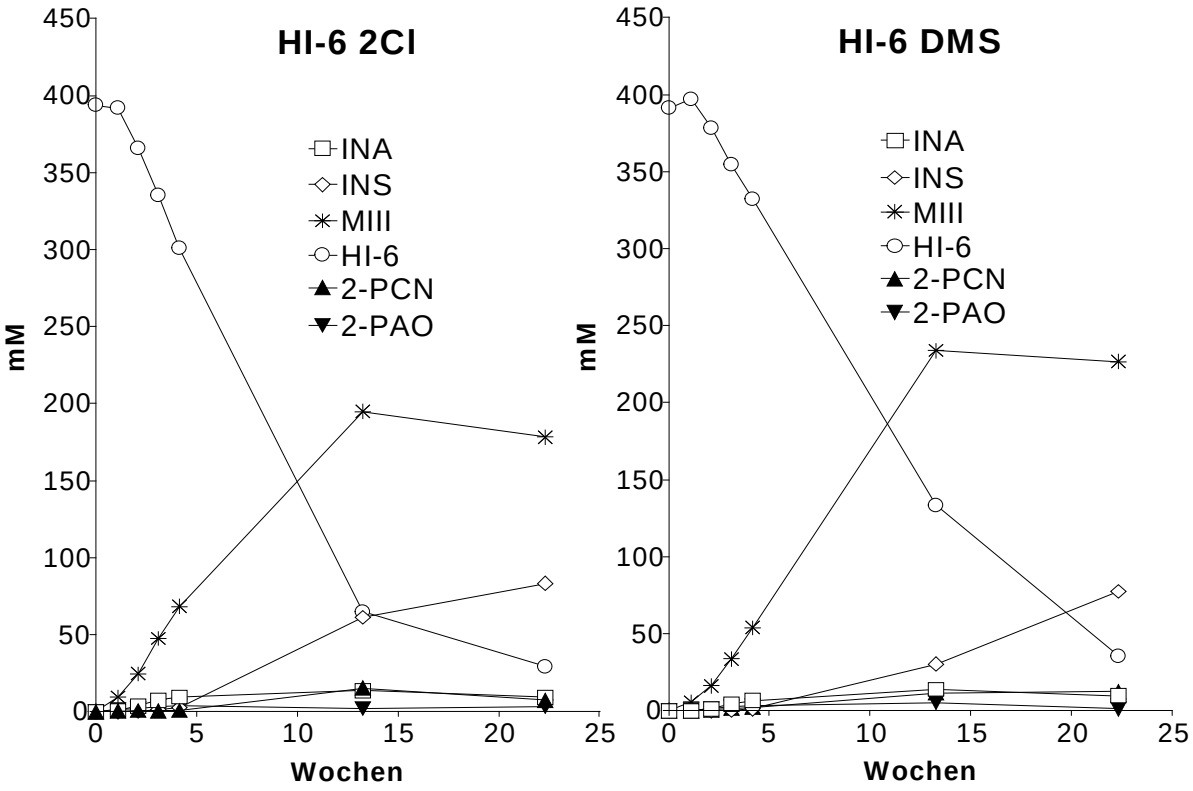


Abb. 3-15

Lagerung in Polypropylen. Konzentrations-Zeit-Profile. 37°C, n = 1. INA = Isonicotinsäureamid, INS = Isonicotinsäure, MIII = „HI-6 Säure“, 2-PCN = 2-Pyridinnitril, 2-PAO = 2-Pyridinaldoxim.

Ab der 13. Woche stieg die „HI-6 Säure“ (M3) Konzentration nur wenig und reichte nach 22 Wochen etwa an die halbe Ausgangskonzentration von HI-6

heran. Auffällig war, daß sich die M3 Konzentration anfangs fast spiegelbildlich zum pH-Abfall verhielt, was auf eine säurekatalysierte Bildung hinwies.

Die Isonicotinsäurekonzentration, zu Anfang sehr klein, stieg erst nach 5 Wochen relativ schnell auf 20% der Startkonzentration von HI-6 an. Die Konzentrationen von Isonicotinamid, 2-Pyridinnitril und 2-Pyridin-aldoxim blieben auf unterstem Niveau und erreichten nach 22 Wochen zusammen nicht mehr als etwa 5% der HI-6 Ausgangskonzentration.

In Borosilikatglas war kein anderer Verlauf zu beobachten, die quantitativen Unterschiede waren marginal. Beide Lösungen enthielten am Ende rund 5% mehr HI-6 und die INS-Bildung erreichte nur etwa die Hälfte des Niveaus wie in Polypropylen (12%).

VIS-Photometrie

Visuell verfärbten sich die Lösungen von farblos über gelb nach dunkelgrün. Schließlich bildeten sich schwarzgrüne Ausfällungen in Form von gut sichtbaren Partikeln, die methanollöslich waren. Mittels Photometrie der konzentrierten bzw. nur schwach verdünnten Lösungen bei 400 nm konnte der Vorgang verfolgt werden (s. Abb. 7-2 im Anhang).

Die nachfolgenden Diagramme zeigen den zeitlichen Verlauf (Abb. 3-16):

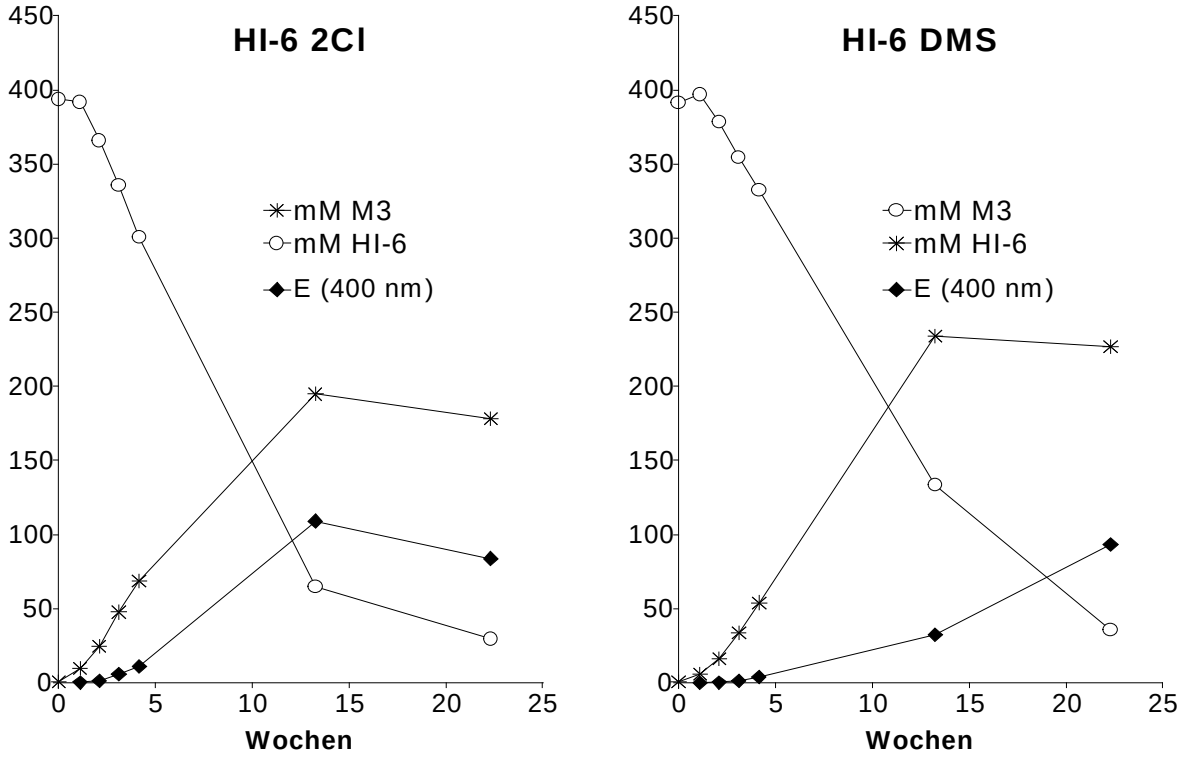


Abb. 3-16
Lagerung in Polypropylen.Konzentrations- und Absorptions-Zeit-Profile. 37°C, n = 1. M3 = „HI-6 Säure“. E (400 nm): Absorption mit d= 1cm oder weniger, dann umgerechnet.

Am Ende der Beobachtungszeit war die HI-6 DMS Lösung zwar grün, wies aber keine Ausfällungen auf, die der gelösten Phase im VIS absorbierendes Material entzogen hätten.

In der HI-6 2Cl Lösung dagegen waren zu dieser Zeit, parallel zum Abfall der Absorption, schon erhebliche Mengen an polymerem Material zu erkennen. Das gleichsinnige Verhalten der M3 Konzentration kann von einem Mitgerissenwerden oder dem verstärkten Einbau in das Polymermaterial herrühren. Nähere Untersuchungen dazu wurden nicht angestellt.

Die Bildung von sichtbaren Partikeln in zu Anfang molekulardispersen Lösungen bestätigte die vermuteten Vernetzungsreaktionen. Die Verfärbungen bis ins Schwarze ließen auf die Bildung höher konjugierter Systeme aus HI-6 und den Spaltprodukten schließen.

Gesamtbetrachtung

Der komplementäre anfängliche pH-Abfall, die M3 Entstehung sowie der HI-6 Abbau machen die säurekatalysierte Bildung von M3 sehr wahrscheinlich. Dies deckt sich mit der Beobachtung, wonach konzentrierte HI-6 Lösungen unter einem pH von ca. 3,2 immer instabiler werden (Mdachi, Marshall et al. 1990).

Die Konkurrenz zur hydrolytischen Spaltung, der Bruch der Aminal-Acetal Brücke, hätte angesichts der hohen Konzentration von HI-6 früher oder später mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit erwartet werden können (Eyer, Hell et al. 1986). Allerdings ließ sich kein klarer molekularer Hinweis darauf finden. Die Isonicotinamidkonzentration bei etwa der Halbwertszeit von HI-6 lag bei 5-10% der M3 Konzentration. Bei gleichzeitiger Konkurrenzreaktion wären etwa 25% zu erwarten gewesen (Korte and Shih 1993).

Daß nach 4 Wochen bereits andere Reaktionswege beschritten wurden, konnte an der molaren Bilanz der Abbaufamilien des 2-Pyridinaldoximringes bzw. des Isonicotinamidringes abgelesen werden.
Die Summe der Konzentrationen von HI-6, M3, 2-PCN und 2-PAO oder die Summe aus HI-6, M3, INA und INS reichte nicht mehr an die HI-6 Ausgangskonzentration von 400 mM heran. 2-PAO und 2-PCN reagierten vermutlich schnell mit Formaldehyd aus der Aminal-Acetal-Brücke zu den erwähnten polymeren Produkten (Eyer, Hell et al. 1986).

Erstaunlich blieb letztlich die relativ große Stabilität von M3 nach Ende der Anstiegphase von 13 Wochen. Ein fast gleiches Verhalten konnte eine andere Arbeitsgruppe an einer Lösung beobachten, die 0,77 M an HI-6 2Cl war und bei 45°C 70 Tage gelagert worden war (Korte and Shih 1993).

3.2.5 Reinheit und pH frisch hergestellter HI-6 Lösungen

Die Untersuchung frisch hergestellter 400 mM Ausgangslösungen mit einem pH von 3,2 - 3,3 mittels der neu entwickelten HPLC-Methodik brachte zutage, daß diese bereits mit 0,11 bzw. 0,13 mol% M3, gefolgt von 0,03 bzw. 0,02 mol% 2-PAO, verunreinigt waren (n = 3).

Deren theoretische Protonenaktivität kann unter folgenden Voraussetzungen näherungsweise berechnet werden:

- Bedingt durch die Herstellung sollte M3 als starke Säure vorliegen und protoniertes 2-PAO (2-PAOH$^+$) als Methansulfonat- oder Chloridsalz.
- Der Ionenstärkeneinfluß auf den pKs der Säurekomponenten wird mit einer Gleichung abgeschätzt, die genau genommen bis 0,3 M gilt (Leuenberger 2002):

  $$pKs^* = pKs + [0{,}51 * \mu 1/2 *(2\,Z - 1)) / (1 + \mu 1/2)]$$

  (μ = Ionenstärke, hier 1,2. Z = Ladung der Säure: Null für HI-6 und M3, Eins für 2-PAOH$^+$). Für die Säure und ihre konjugierte Base wird die gleiche Aussalzungskonstante angenommen. Das große Dipolmoment bei Entstehen von Zwitterionen bei der Deprotonierung und Hydrathülleneinflüsse (Stokes and Robinson 1948) werden vereinfachend nicht berücksichtigt.
- Für einen mittleren, gemessenen pH der Lösung von 3,25 kann über den Dissoziationsgrad (Leuenberger 2002) der jeweiligen Stoffe separat die Protonenkonzentration errechnet werden und daraus der theoretische pH.

Tabelle 3-16
Theoretische Berechnung der Wasserstoffionenaktivität in frischen, wäßrigen 400 mM HI-Lösungen gegen einen gemessenen, mittleren pH von 3,25.

	mM	pKs	pKs*	% dissoziiert	mM H$^+$-Aktivität
HI6	400	7,28 [1)]	7,01	0,02	0,0690
(M3)	0,48	1,72 [2)]	1,45	98,43	0,4725
2-PAOH$^+$	0,1	3,56 [3)]	3,83	20,95	0,0210
				Summe	0,5625

1) Oximfunktion (Hagedorn, Stark et al. 1972). 2) Carboxylfunktion der Teilstruktur 4-Carboxy-1-methyl-pyridinium Betain (Black 1955). 3) Protonierte Pyridinfunktion (Perrin 1965).

Aus dem Ergebnis folgt ein theoretischer pH von 3,25. Diese überraschend gute Übereinstimmung spricht für die tabellierte Verteilung der H^+-Ionenaktivität aus den einzelnen Säuren, wobei das stark saure M3 bestimmend ist. Die Oximfunktion reinen HI-6 Salzes (pKs*: 7,01) hätte in einer 0,4 M Lösung nach „pH = 1/2 pKs* - 1/2 log c“ (Perrin 1965; Leuenberger 2002) theoretisch einen pH von 3,7 erzeugen können, womit zumindest für einen initialen Abbau genügend Protonen zur Verfügung stünden.

3.2.6 Stabilität konzentrierter, ungepufferter HI-6 Lösungen in D2O

Es hatte nicht an Versuchen gefehlt das physiologisch verträgliche und reaktionsträgere D_2O als stabilisierendes Lösemittel für hydrolyseempfindliche Stoffe zu etablieren. In D_2O hergestellte, ungepufferte 400 mM HI-6 Lösungen, in Borosilikatglas gelagert, zeigten aber mit 1,1 - 1,2 einen kleineren kinetischen Isotopeneffekt (Quotient der Reaktionskonstanten in Wasser und D_2O) als er für Thiamin und Procain beschrieben war (Siegel, Hiter et al. 1964; Hüttenrauch 1967).

Tabelle 3-17
Analysen- und Kennwerte des Abbaus von HI-6 Lösungen in H_2O / D_2O bei 37°C, n = 1.

	Borosilikatglas / D_2O		Borosilikatglas / H_2O	
	2Cl	DMS	2Cl	DMS
k_{pseudo} (1/s) [1)]	0,08701	0,07582	0,10562	0,08454
t 1/2 HI-6 (Wochen) [1)]	8,0	9,1	6,6	8,2
Isotopeneffekt: $t_{1/2\ D}$ / $t_{1/2\ H}$	1,2	1,1	-	-
HI-6 (%) [2)]	17,4	22,3	11,6	15,5
INS (%) [2)]	14,6	7,3	13,9	10,1
M3 (%) [2)]	41,3	36,1	42,4	49,4
INA + 2-PAO + 2-PCN (%) [2)]	10,5	8,0	5,7	5,5

1) Verzögerungsphase mit 2,1 Wochen vorausgesetzt, danach Reaktion pseudo-erster Ordnung angenommen. 2) % der mittleren Ausgangskonzentration von 400 mM, 22 Wochen später.

Zwar lag je nur ein einziges Experiment vor, aber da dieses im Ergebnis allen anderen in leichtem Wasser sehr ähnelte, sollte bei Wiederholungen mit größeren Versuchszahlen kein grundsätzlich anderes Resultat zu erwarten sein.

3.3 Alterung gebrauchsfertiger, konzentrierter und ungepufferter HI-6 Dimethansulfonat-Lösungen in Astra Autoinjektoren

Die vorgehenden Untersuchungen konnten belegen, daß der Abbau von HI-6 Dimethansulfonat in konzentrierten, wäßrigen Lösungen unter Streßbedingungen von 37°C in unerwartetem Umfang über die „HI-6 Säure“ verläuft. Inwieweit dieser Reaktionsweg auch in Autoinjektoren auftritt, sollte ein Versuch an 6 Astra Autoinjektoren zeigen, in denen HI-6 DMS Salz und die Atropinsulfatlösung bereits vorgemischt waren und 32 Wochen bei 25 ± 2°C und 60 % r. F. gelagert wurden. Die gebrauchsfertigen Lösungen standen dabei im Kontakt mit dem Kunststoffmaterial der Ampulle und mit dem freiliegenden Aluminium am Rand der kunststoffkaschierten Aluminiumfolie nach dem Aufreißen durch Aktivierung. Verhältnisse, wie sie grundsätzlich in den Injektoren mit abgebautem HI-6 vorgelegen haben könnten, von denen Inspektoren der OPCW (Davey 2001) berichteten.

Im Mittel verhielten sich alle 6 Injektorlösungen fast wie die DMS-Lösung, die als Modell damals auf Polypropylen (Eppendorf-Cup) lagerte.
In 32 Wochen bildete sich viel „HI-6 Säure“ (M3). Nicht identifizierte Abbauprodukte, bei 260 oder 300 nm detektiert, wurden als HI-6 berechnet. Sie machten einen nicht unerheblichen Anteil des Abbauprofils aus und wurden in die molare Summenbilanz einbezogen, was stets Werte von rund 100% der Ausgangsmenge an HI-6 lieferte.

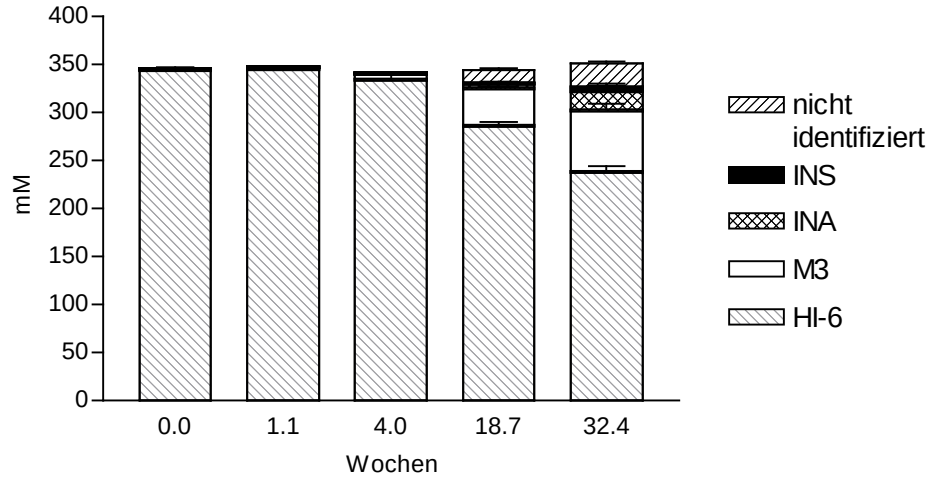


Abb. 3-17

Stapeldiagramm der Konzentrationsmittelwerte. 25°C ± 2°C, 60% r. F.. Produktfamilie: HI-6, „HI-6 Säure“ (M3), Isonicotinsäure (INS) und Isonicotinamid (INA). Nicht identifizierte Produkte sind als HI-6 berechnet. Schwankungen sind als SEM mit Fehlerbalken angegeben (n = 6).

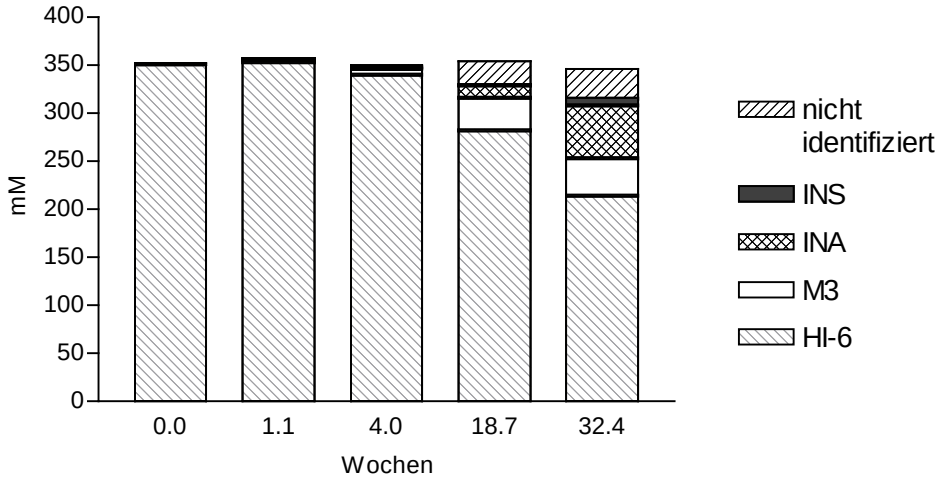


Abb. 3-18

Stapeldiagramm der Einzelkonzentrationen der gleichen Produktfamilie. Stark im Verhalten abweichende Lösung aus Injektor Nr. 4.

Die Isonicotinamidbildung war stärker ausgeprägt als im Modell. Besonders in Injektor 4, in dem nach 32 Wochen der Anteil 16% der Ausgangsmenge

von HI-6 betrug und die erwartete Isonicotinsäurebildung in den Hintergrund trat.

Der Zeitverlauf einzelner Stoffkonzentrationen sollte diesen Umstand noch deutlicher zeigen.

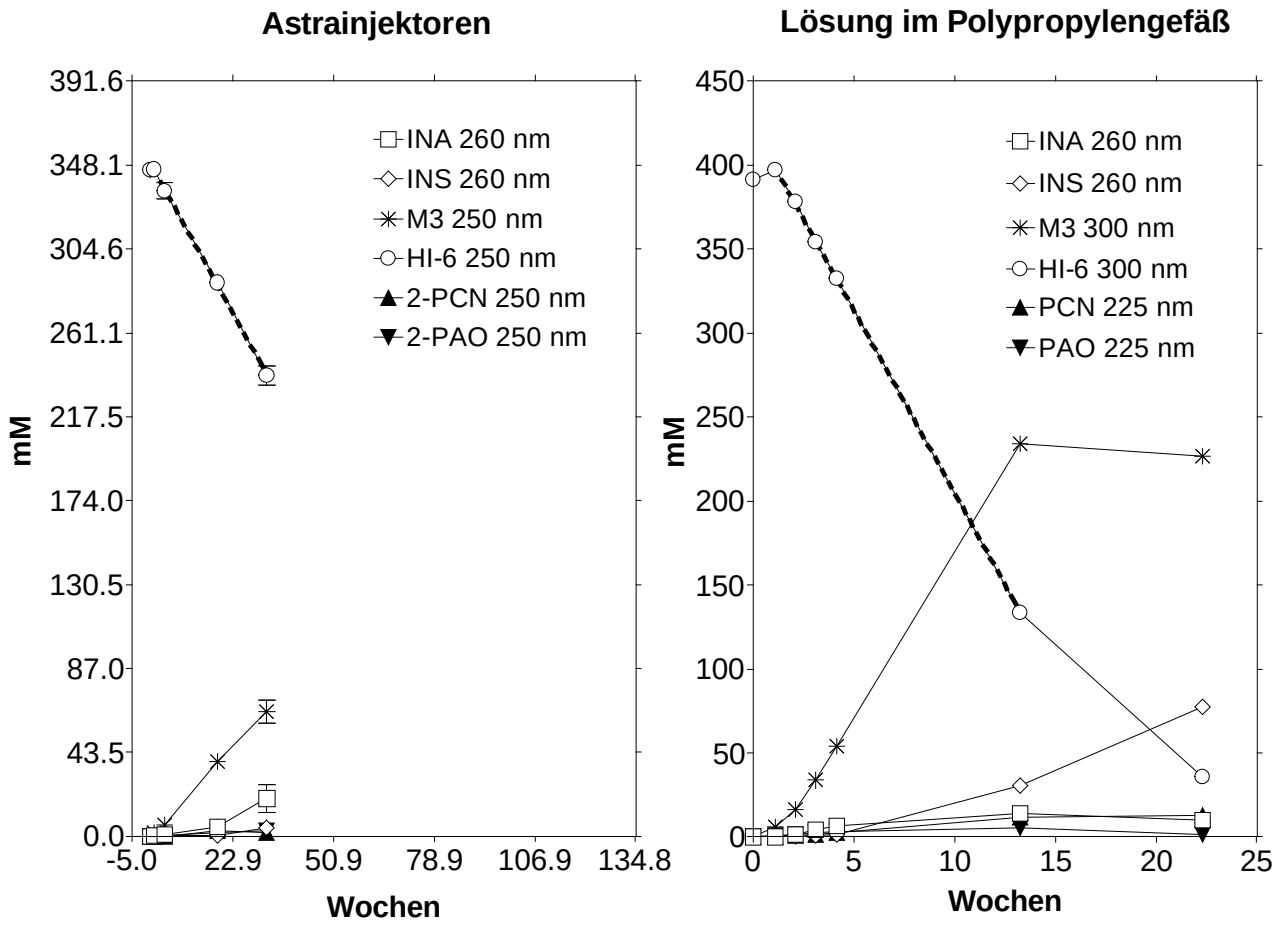


Abb. 3-19

Abbau von HI-6 DMS Lösungen. Geradenanpassung im linearen Teil gestrichelt. Links: im Original-Injektor, 346 mM, 32 Wochen lang, 25°C ± 2°C, 60% r. F. (Mittelwert, n = 6, Schwankung als SEM). Rechts: im Eppendorf-Cup, 397 mM, 22 Wochen lang, (n = 1), 37°C.

Der Einfachheit des Vergleichs halber wurde der Verlauf der HI-6 Abnahme in den Injektoren auf die Proportionen des Diagramms des Lösungsmodells projiziert, um die unterschiedlichen Geschwindigkeiten des HI-6 Zerfalls bei 2 Temperaturen graphisch auszugleichen. Bei Übereinanderlegen der Diagramme kamen der 1,15-Wochenmittelwert der Injektoren mit dem 1,11-Wo-

chenwert der Lösung im Polypropylengefäß (Modell) und die Winkellage des linearen Teils des HI-6 Abbaus zur Deckung.

Tabelle 3-18
Halbwertszeit der Lösungen bei 25°C und 37°C ohne Berücksichtigung der initialen Lag-Phase.

Temperatur (°C)	Anzahl Versuche	Steigung (mM / Wochen)	Halbwertszeit (Wochen)	(Lag-Phase: Wochen)
25	6	-3,388	51,0	1,2
37	1	-21,780	9,1	1,1

In beiden Versuchsreihen zerfiel HI-6 DMS nach einer mehr oder minder kurzen Lag-Phase von rund 1 Woche zunächst nach einer Kinetik pseudo-nullter Ordnung. Bei 37°C ging dieser Zerfall 6,4 mal schneller als bei 25°C vonstatten.

In der Projektion glichen sich beide Konzentrationsverläufe der „HI-6 Säure“ (M3). Die erwähnte stärkere INA- statt der INS-Bildung in den Injektoren wies allerdings darauf hin, daß der HI-6 Abbau dort neben der Säurebildung auch in spürbarem Maße über den initialen Zerfall der Aminal-Acetal-Brücke erfolgte. Eine Erklärung hierfür könnte die pH-Entwicklung bieten.

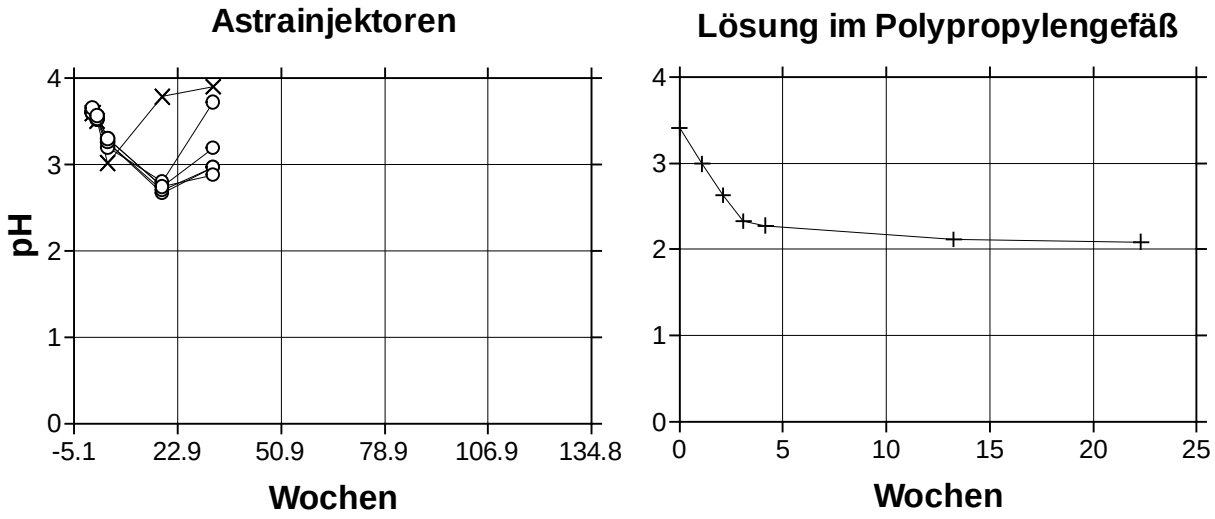


Abb. 3-20
Abbau von HI-6 DMS Lösungen. Links: 32 Wochen, 346 mM, bei 25°C in Astra Autoinjektoren, n=6. Zeitskala proportional zur Lösung im Polypropylengefäß. Injektor Nummer 4: --x--. Rechts: 22 Wochen, 397 mM, im Eppendorf-Cup (n = 1) bei 37°C.

Statt wie in der Lösung im PP-Gefäß von pH 3,4 bis auf pH 2,0 zu sinken, durchlief der pH in den Injektorlösungen von 3,6 weg ein Minimum von knapp unter pH 3, um dann unterschiedlich stark zu steigen. In der Lösung von Injektor 3 stieg der pH leicht über das Ausgangsniveau von 3,6, in der Lösung von Injektor 4 sogar deutlich darüber auf 3,9.

Tabelle 3-19
Ausgewählte Werte von Injektor 3 und 4 im Vergleich zu den übrigen Vieren nach 32 Wochen. VK in %.

Injektoren	HI-6 mM	M3 mM	INA mM	INS mM	PAO mM	PCN mM	pH
Nr. 4	216	39	55	7	11	2	3,9
Nr. 3	236	58	32	5	4	2	3,7
Nrn. 1,2,5,6	246 ± 2%	73 ± 7%	11 ± 6%	4 ± 27%	1 ± 14%	2 ± 4%	3,0 ± 4%

Die gruppierten Werte bestätigten die Überlegungen, daß die Acidität der Lösung und die Reaktionslenkung in Richtung M3 im Bereich von pH 3,0 bis 3,9 eng zusammen gehören. Bei Wiederanstieg des pH ist unter Bruch der Aminal-Acetal-Brücke zusätzlich mit einem schnelleren HI-6 Abbau zu rechnen.

Wird die pH-Entwicklung mit berücksichtigt, können Untersuchungen in PP-Gefäßen bei 37°C als Modell schneller als in Injektoren bei 25°C Vorhersagen des Abbauprofils ermöglichen.

3.4 Biochemische Prüfung der „HI-6 Säure" (M3) und gealterter, konzentrierter HI-6 Lösung

3.4.1 Reaktivierung gehemmter Erythrozyten-Acetylcholinesterase

Die Reaktivierungsleistung der „HI-6 Säure" (M3) wurde an mit Sarin-, Cyclosarin- und VX- vollständig gehemmter humaner Erythrozyten-AChE untersucht. Hierfür wurde eine 1/10 verdünnte Erythrozytensuspension verwendet, um eine mögliche Rückvergiftung mit Phosphyloxim zu minimieren. Die bei 37°C mit M3, HI-6 oder einer Abbaulösung inkubierte Suspension wurde anschließend im Ellman-Test photometrisch auf ihre Enzymaktivität untersucht. Als Bezugspunkt diente ein Reaktivatoransatz, der 100 µM an HI-6 Dichlorid war. Für die 3 Gifttypen sollten im Wesentlichen 10 min Inkubationszeit zur maximalen Reaktivierung ausreichen (Worek, Reiter et al. 2002). Die reaktivatorinduzierte Hydrolyse des Enzymsubstrates Acetylthiocholin konnte bei dieser Konzentration und den kleineren vernachlässigt werden, ebenfalls die Hemmung des Enzyms durch HI-6 oder M3. Die im Ansatz stattfindende Blankreaktion von DTNB zum Indikatormolekül TNB^- wurde aber berücksichtigt.

Die ersten Versuche mit n = 1 mußten in ihrer Anzahl nicht erweitert werden, da die Resultate klare Aussagen ermöglichten (Abb. 3-21).

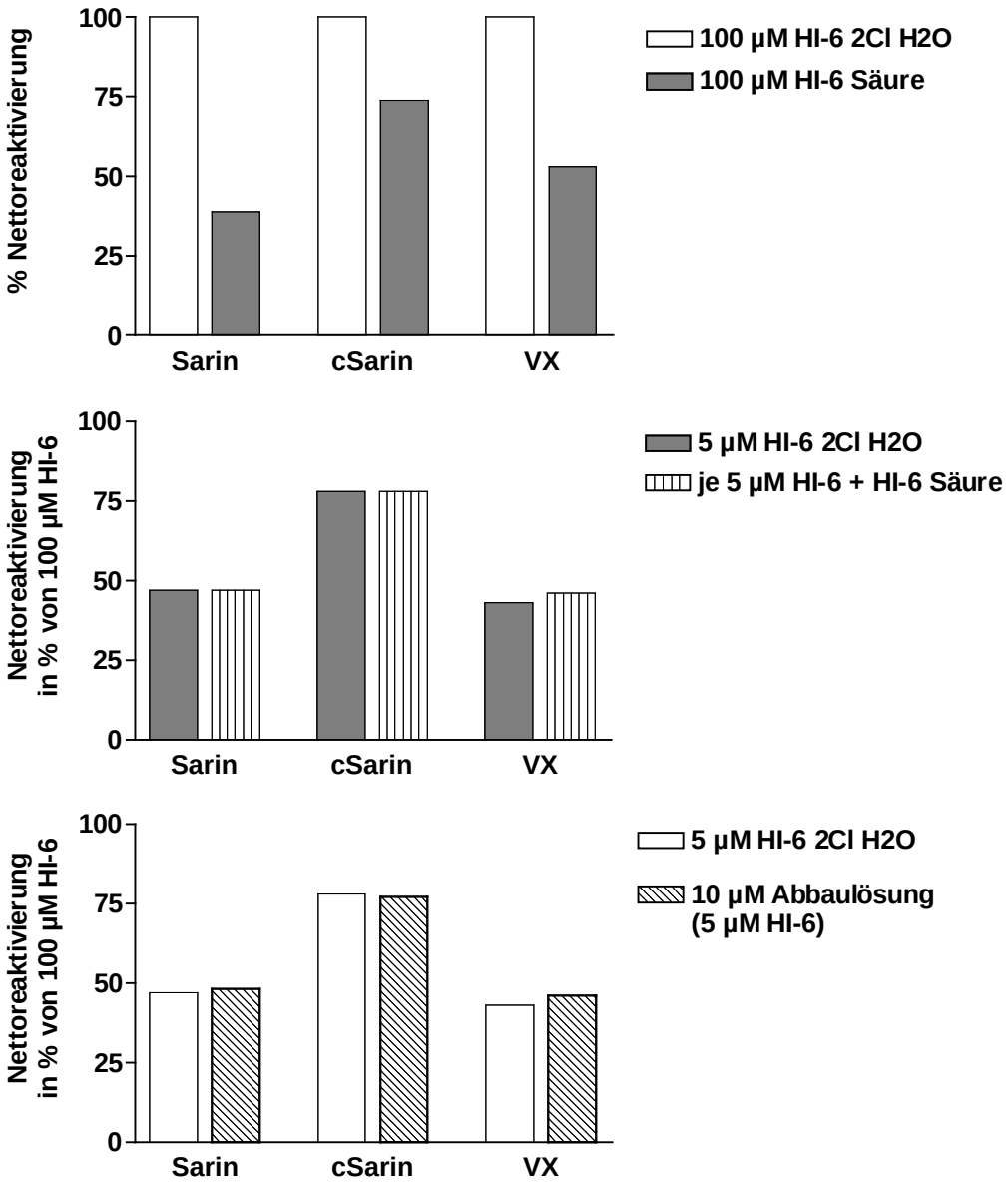


Abb. 3-21
Reaktivierung vollständig gehemmter Ery-AChE. 10 min. Inkubation bei 37°C, n = 1.

Bei 100 µM zeigte sich eine gegenüber HI-6 noch erhebliche Reaktivatorleistung. Der Literaturwert betrug dagegen nur 2% in Bezug auf mit Diisopropylfluorphosphat zu 90% gehemmte Rinder-EryAChE (Dirks, Scherer et al. 1970a; Dirks, Scherer et al. 1970b). Bei 5 µM, ungefähr der Hälfte der als therapeutisch wirksam angesehenen Plasmakonzentration (Clement, Bailey et al. 1995), lagen die Verhältnisse völlig anders. Hier erwies sich die „HI-6 Säure“ im Gemisch mit HI-6 als völlig wirkungslos,

störte aber auch nicht die Reaktivierung. Als Modell für die Beteiligung noch anderer Reaktionsprodukte stand die HI-6 2Cl Abbaulösung zur Verfügung, aus der die „HI-6 Säure“ isoliert worden war. Die nach 9 Wochen schwarzgrüne Lösung enthielt sowohl niedermolekulare Bestandteile als auch polymere. Aus der HPLC-Untersuchung der Lösung ergab sich ein Verhältnis von HI-6 zur „HI-6 Säure“ von 3:2. Für den Enzymtest war die Reaktivatorkonzentration der Lösung photometrisch, also summarisch für alle bei 300 nm absorbierenden Spezies, über den Extinktionskoeffizienten eingestellt worden. In Wirklichkeit waren im Reaktivatoransatz, per HPLC gemessen, nur 5 µM HI-6 enthalten, was sich im Enzymtest bestätigte. Damit zeigte sich gleichzeitig, daß Abbauprodukte neben HI-6 in der Größenordnung halbtherapeutischer Plasmakonzentrationen die Reaktivierung weder fördern, noch stören.

Für Sarin wurde in einem separaten Versuch ermittelt, daß die 100 µM „HI-6 Säure“ equieffektiv zu 4 µM HI-6 war, d. h., daß HI-6 25fach potenter als „HI-6 Säure“ ist.

3.4.2 Hemmung der Acteylcholinesteraseaktivität durch „HI-6 Säure“ (M3)

Die Hemmwirkung wurde in einem modifiziertem Ellman Test an humanen Erythrozyten studiert. „HI-6 Säure“ wurde in einem Konzentrationsbereich von 50 - 700 µM gegen ASCh als Substrat im Bereich 100 - 1000 µM untersucht.

In der Literatur war 1970 die für eine 25%ige AChE-Hemmung notwendige HI-6 Salzkonzentration mit 1,26 mM angegeben worden, also nicht sonderlich gut hemmend. Verwendet wurde damals allerdings eine gereinigte Rindererythrozyten-AChE (Dirks, Scherer et al. 1970a; Dirks, Scherer et al. 1970b).

Die Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration bei verschiedenen M3-Konzentrationen macht die Interpretation der

Ergebnisse ohne Verzerrungen möglich. Eine nichtlineare Anpassung an die Werte lieferte $Km_{app.}$ und $Vmax_{app.}$ (Mast 1997):

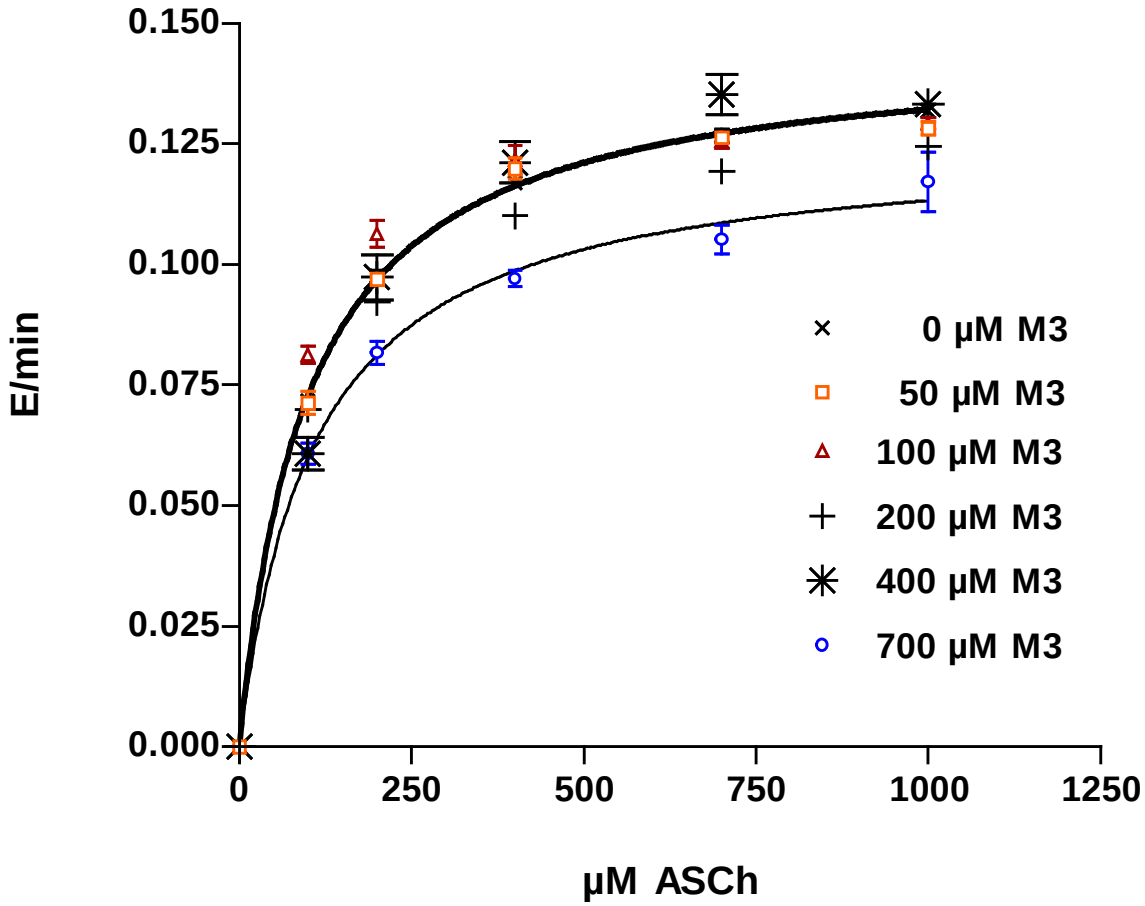


Abb. 3-22
Hemmung von humaner Ery-ACHE mit „HI-6 Säure“ (= M3). 0 µM „HI-6 Säure“ fett durchgezogen, 700 µM schwach durchgezogen.

Aus der Lage der Regressionsgeraden konnte bis 400 µM kein signifikanter Unterschied zu 0 µM M3 festgestellt werden. Erst bei 700 µM Konzentration war ein Hemmeffekt sichtbar. Außerdem fiel auf, daß eine 400 µM M3-Lösung paradoxerweise weniger zu hemmen schien als eine 200 µM konzentrierte.

Mit den Werten war nur eine grobe Schätzung der Dissoziationskonstanten für den Enzym-Hemmkomplex (Ki) und den Enzym-Substrat-Hemmkomplex (Kii) möglich. Wenn die Ki für HI-6 an Zitteraalesterase 224 µM betrug, waren für MII hier, an humaner Erythrozytenesterase, runde 1500 µM

gefunden worden. Für Kii lagen die Werte für HI-6 bei 1247 µM (Mast 1997) und für M3 bei rund 7000 µM.

Die Resultate bestätigten die bereits berichtete schwache Hemmung. Die Vermutung, daß „HI-6 Säure“, obwohl in konzentrierten Lösungen Hauptabbauprodukt, die Ursache für außergewöhnlich starke HI-6 Wirkungseinbußen durch Hemmung wäre, hatte sich nicht bewahrheitet.

4 Diskussion

4.1 Autoinjektorenfunktionsprüfung: In situ Erzeugung konzentrierter HI-6 2Cl H_2O bzw. HI-6 DMS Injektionslösungen und deren Freisetzung

Die auf die Besonderheiten des jeweiligen Injektorsystems abgestimmte Testmethodik und die dazugehörigen Apparaturen hatten sich in Reproduzierbarkeit und in guter Abbildung der Anwenderbewegung bewährt. So reichten teilweise sehr geringe Versuchszahlen aus, da sich klare Unterschiede zeigten. Die Befüllungen aller Injektoren mit Atropinlösung und einem der beiden Salze entsprachen den angegebenen Spezifikationen. Von den Astra-Injektoren standen Serienmuster zur Verfügung, von den Meridian-Injektoren Prototypen.

Ergebnisüberblick

Besonders bei der kritischen Temperatur von 5°C zeigte sich, daß sich das Dimethansulfonatsalz gegenüber dem Dichloridsalz in den getesteten Autoinjektoren grundsätzlich sehr viel schneller und vollständiger lösen konnte. Ein „caking“ mit Folge einer Kanülenverstopfung konnte in keinem Fall beobachtet werden. Die Vorgabe, im Mittel eine Dosis von 1,0 bis 1,3 mmol HI-6 abzugeben, erreichten alle Injektoren bei 5°C mit dem Dimethansulfonatsalz. Im Astrasystem reichten 2 Sekunden für das Lösen des Dimethansulfonat aus, 5 Sekunden mehr brachten keinen signifikanten Unterschied. Bauartbedingt benötigte das Meridiansystem 5 Sekunden. Die gesamte Applikationszeit betrug beim Astrasystem bestenfalls 7 (2+5) Sekunden. Beim Meridiansystem war der Vorgang nach 5 Sekunden praktisch abgeschlossen. Das STI-System konnte einen relativ hohen Gegendruck von 1,5 bar überwinden, das Astrasystem 1,4 bar und das Meridiansystem 1,2 bar.

Die beiden nachfolgenden Tabellen fassen die Gegebenheiten als auch die Ergebnisse verschiedener getesteter Injektoren bei 5°C zusammen.

Tabelle 4-1
Spezifizierte Füllmengen (F) und Zielgrößen (Z) bei Raumtemperatur.

	MMT		Astra		STI [1]	
	DMS	2Cl	DMS	2Cl [1]	DMS	2Cl
mmol HI-6 (F)	1,44	1,52	1,07	1,33	1,57	1,59
2 mg Atropin in ml (F)	2,5	2,9	2,9	3,0	2,4	2,4
M HI-6 Lösung (Z)	0,49 [2]	0,46 [2]	0,33 [3]	0,40	0,53	0,57
mmol Sollabgabe HI-6 (Z)	1,31	1,33	0,96 [3]	1,20	-	1,33
HI-6 in % der Füllmenge (Z)	91	88	90	90	-	84

1) Spöhrer, Thiermann et al. 1994; Schreiner 1998). 2) Berechnet. 3) Über das 10%ige Totvolumen spezifiziert.

Tabelle 4-2
Injektorenleistung bei 5°C.

	MMT		Astra		STI [1]	
	DMS	2Cl	DMS	2Cl [1]	DMS	2Cl
ohne Gegendruck:						
% der Zielkonzentration	-	-	100	76	95	41
mit Gegendruck:						
mmol HI-6 ejiziert (Dosis)	1,33	0,78	0,95	-	-	-
% HI-6 ejiziert [2]	(91)	(51)	(89)	-	-	-
% ej. Atropinlösungsmasse [2]	59	73	88	-	-	-
überwindbarer Gegendruck [bar]	1,2	1,2	1,4	-	-	1,5 [3]
n =	6	6	6	3	1-7	1-7
Sekunden Applikationszeit	5	5	10	10	10	10

1) Schreiner 1998 und Thiermann, Spoehrer et al. 1994. 2) Bezogen auf die spezifizierte Füllmenge. 3) Thiermann, Spoehrer et al. 1994, n = 4 und Thiermann, Spoehrer et al. 1995.

Hervorstechende Vor- und Nachteile der Systeme und Salzformen

Der Vorteil von HI-6 Dimethansulfonat gegenüber dem Dichlorid steht angesichts der Ergebnisse außer Frage. Mit der Überarbeitung des **STI**-Autoinjektorsystems zu dem von **Meridian** Medical Technologies soll jenes an dieser Stelle nicht weiter beurteilt werden. Der Prototyp von **Meridian** versprach wegen der Vereinfachung der Handhabung auf 2 Schritte bis zur Injektion und ohne eine Schüttelprozedur einen großen Fortschritt in der Technologie binärer Autoinjektoren. Der Anwender würde sich damit nicht mehr auf seine Muskelkraft verlassen und den Injektor in einem vorgegebenem, optimalen Bewegungsablauf wie beim Astrasystem schütteln müssen. Die beobachtete Verringerung der Atropindosis durch gelöstes HI-6 Dimethansulfonat im Meridiansystem läßt aber derzeit das **Astrasystem** mit seinen noch 4 notwendigen Schritten bis zur Injektion und trotz der gesamten Anwendungszeit von 10 Sekunden gegenüber 5 als das vorteilhaftere System erscheinen. Dort war die Auflösung bauartbedingt am Beginn der Ejektion bei 5°C schon bei 100% angelangt, womit die Atropindosis lediglich vom fixen Totvolumen von rund 10% abhing.

Genau in diesem Punkt kam der Pferdefuß der sehr guten Löslichkeit von HI-6 DMS der Meridian-Technologie ans Licht. Initial bildet sich dort beim Austritt der Atropinlösung aus dem Pulverbett eine nahezu gesättigte HI-6 Lösung, die nicht nur viskös, sondern auch arm an Atropin ist, da das gelöste HI-6 DMS einen hohen Volumenanteil für sich beansprucht. Da der Meridian-Autoinjektor auch noch einen Auslaßfilter mit relativ geringer Porenweite (<10 µm) besitzt, besteht für die initial zähe Lösung ein erheblicher Widerstand, der den Fluß deutlich herabsetzt, wodurch wiederum eine längere Ejektionszeit benötigt wird. Dieses Problem ist bei HI-6 2Cl auf Grund seiner schlechteren Kältelöslichkeit weniger gravierend, so daß hier mehr Atropin in 5 s ejiziert wird. Bei dem Astra-System spielt diese "Atropin-

diskriminierung" keine Rolle, denn HI-6 wird im gesamten Volumen des Lösemittels gelöst, bevor es ejiziert wird. Außerdem gibt es dort keine Filter.

Vergleichbarkeit der Injektorenleistung des Astra- und Meridiansystems mit DMS-Füllung

Inwieweit eine dem Meridiansystem vergleichbare Füllung des Astrainjektors mit HI-6, z. B. mit 1,4 mmol, die obige Einschätzung änderte, läßt sich im Moment nur abschätzen.

Eine Möglichkeit hierzu bietet sich in der Umrechnung der experimentellen Daten des geprüften Astrainjektors. 1,4 mmol entsprächen einer HI-6 Dimethansulfonatmenge von 670 mg. Da die Pulverkammer des Injektors mit 513 mg bereits randvoll war, hätte die Ampulle verlängert werden müssen. Bei gleichbleibender Atropinlösungsmenge von 2,9 ml hätte nach kompletter Auflösung ein Lösungsvolumen von 3,4 ml statt 3,2 ml resultiert. Das 10%ige Totvolumen im Astrasystem schlug bei 3,2 ml mit 0,3 ml zu Buche. Es bliebe aber bei Vergrößerung der Ampullenlänge konstant, da die Ampullenkopfdimensionen, wo es entsteht, ebenfalls konstant blieben. Rechnerisch kann deshalb bei einer Füllung mit 670 mg von einem Ausstoß von 3,1 ml bei 5°C ausgegangen werden. Dies entspräche einem Prozentsatz von 91% oder 1,3 mmol HI-6 DMS bei 100%iger Auflösung. Die Schüttelzeit dürfte dann allerdings nicht kürzer als 5 Sekunden sein.

In einem zweiten Ansatz können frühere Ergebnisse von Modellinjektorversuchen herangezogen werden. Nach 3-4 Sekunden (2 s Schütteln + 1-2 s Ejizieren) wurden damals, mit einer 1,33 mmol HI-6 DMS Füllung, bei Raumtemperatur nahezu 100%, bei 5°C 84% der Zielkonzentration erreicht. Rund 9% weniger als mit einer 1,1 mmol Füllung im Serieninjektor bei ebenfalls 5°C. In den Versuchen mit dem Serieninjektor stieg die sich einstellende Konzentration um 5% an, wenn die Schüttelzeit per Hand von 2 auf 5 Sekunden ausgedehnt wurde. Auf den Modellinjektor angewendet, könnten daher in 5 Sekunden Schüttelzeit rechnerisch 89% der Zielkonzentration erreicht wer-

den. Dies entspräche unter Berücksichtigung des Totvolumens einem Ausstoß von 1,1 mmol HI-6 DMS. Ein „caking“ ist analog zu den Beobachtungen bei 2 Sekunden am Serieninjektor mit einer im Mittel maximalen Konzentration von 93%, also 7% festem HI-6 am Beginn der Injektion, wenig wahrscheinlich.

Insgesamt dürfte aus beiden Modellrechnungen eine Dosis von 1,2 mmol HI-6 bei einer Schüttelzeit von 5 Sekunden zu erwarten und damit eine bessere Vergleichbarkeit zur Dosis von 1,3 mmol aus dem Meridianinjektor gegeben sein.

Möglichkeiten der Verbesserung am Astra- oder am Meridian-System

Diese lassen sich mit Hilfe einer Differentialgleichung diskutieren, die von Noyes und Whitney für die Beschreibung von Lösevorgängen entwickelt und von Nernst und Brunner erweitert worden war (Noyes and Whitney 1897; Brunner 1904; Nernst 1904).

$$\boxed{\frac{dC}{dt} = \frac{1}{h} * A * D * (Cs - C(t))}$$

Die Gleichung gilt bei konstanter Temperatur für multipartikuläre Systeme wie HI-6 Kristallpulver und setzt eine unbewegte Schicht um die Teilchen voraus, durch die bereits gelöste Moleküle in die Lösung hineindiffundieren müssen.

Sie besagt, daß die Lösegeschwindigkeit dC/dt als Konzentrationszunahme pro Zeiteinheit groß ist, wenn

- die Dicke der Diffusionsschicht h klein ist und damit 1/h groß,
- wenn die effektive Oberfläche des Lösegutes A,
- der Diffusionskoeffizient D und
- der Unterschied zwischen der Sättigungskonzentration Cs und der momentanen Lösungskonzentration C(t) groß ist.

Im Fall forcierter Auflösevorgänge wie in Injektoren sind Kontakte der Teilchen untereinander, also Verkleinerungen der effektiven Oberfläche, dynamische Veränderungen der Diffusionsschicht und lokale Temperaturabsenkungen zur Überwindung der Gitterenergie der Kristalle zu erwarten. Deswegen stellt die folgende Diskussion vor allem auf den Anfang und das Ende des Lösevorgangs ab.

Diffusionsschichtdicke h

Sie scheidet als Verbesserung für alle Injektortypen aus: in Astra- und STI-Injektoren ist sie durch turbulentes Schütteln infolge Restluft, die als Mischkugel wirkt, bereits reduziert und kleinere Schichtdicken als ca. 10-100 µm sind nicht erzielbar (Moore 1983). Deshalb konnte beispielsweise in Astra-Injektoren ab einer bestimmten Schüttelfrequenz die Lösegeschwindigkeit nicht mehr wesentlich gesteigert werden (Thiermann, Seidl et al. 1996; Thiermann, Schreiner et al. 1998). In Meridian-Injektoren können solch kleine Diffusionschichtdicken nicht erreicht werden, dazu ist die Strömungsgeschwindigkeit der Atropinlösung durch das Pulverbett zu klein. Eine Steigerung wäre außerdem nur für HI-6 2Cl sinnvoll.

Effektive Oberfläche A

Sie ist einer direkten Messung nicht zugänglich (Stricker 1987). In Astra-/STI-Systemen ist sie am größten, wenn in der Atropinlösung die verwirbelten Kristalle voneinander getrennt sind. Im Meridiansystem ist sie als deutlich kleiner einzuschätzen, da die Kontaktflächen der Teilchen im Festbett vom Lösegeschehen zunächst ausgeschlossen sind. Die gewählte HI-6 Siebfraktion im Bereich von 101 µm - 355 µm hat den hohen Lösegeschwindigkeiten zufolge eine genügend große effektive Oberfläche in allen Systemen zur Verfügung gestellt. Eine zusätzlich mangelhafte Benetzung des

Pulvers, welche die effektive Oberfläche hätte verkleinern können, war daher nicht zu vermuten. Eine weitere Vergrößerung der effektiven Oberfläche durch Verkleinerung der Korngröße, ist aus Gründen einfacher Verarbeitung des Kristallpulvers und wegen der Gefahr von initialem „caking“ in allen Systemen nur mit Vorsicht anzuraten. Alternativ einen Lyophilisatkuchen mit amorphem HI-6 zu erzeugen, benötigte zuviel Ampullenplatz und könnte zu einer anfänglich honigzähen, glasartigen Schicht mit zu kleiner Oberfläche führen.

Diffusionskoeffizient D

Er ist z. B. umgekehrt proportional der Viskosität, der Molmasse, wächst mit der Temperatur und ist in den Injektorsystemen nicht gezielt beeinflußbar. Da die Bildung konzentrierter HI-6 Lösungen eine deutliche Erhöhung der Lösungsviskosität und die erwähnte Temperaturabsenkung zur Folge hat, ist während der Auflösung mit einem Sinken des Koeffizienten zu rechnen. Allerdings sprechen die gemessenen hohen Geschwindigkeiten gegen einen bestimmenden Einfluß auf das Lösegeschehen.

Differenz von Sättigungs- und momentaner Konzentration Cs - C(t)

Sie zu verändern bestimmt die Lösegeschwindigkeit entscheidend mit. Sie wächst erheblich beim Wechsel vom HI-6 2Cl Monohydrat auf das besser lösliche, wasserfreie HI-6 DMS. Hier gilt der Satz, abgesehen von dem Einfluß des Anions, daß Salzhydrate im Allgemeinen schlechter löslich sind als die wasserfreie Salzform (Stahl 1980). Bei fallender Temperatur sinkt die Sättigungslöslichkeit von HI-6 2Cl zudem viel rascher als jene von DMS (Thiermann, Seidl et al. 1996). Bei 5°C Starttemperatur liegt sie für HI-6 2Cl bereits unter der Zielkonzentration, längst nicht aber für HI-6 DMS. Die weitere Absenkung der Sättigungslöslichkeit durch das Abkühlen beim Lösen verschlechtert die Situation für HI-6 2Cl zusätzlich, aber kaum für HI-6 DMS

mit seiner Löslichkeit von 1,85 M bei 5°C. Der drastische Unterschied in der Lösegeschwindigkeit beider Salze in der Kälte folgt daraus zwangsläufig.
Die Lösetechnik des durchströmten Bettes in den Meridian-Injektoren hält am Eintrittsort des Kristallbettes eine maximale Konzentrationsdifferenz aufrecht, denn dort ist noch kein HI-6 gelöst und differentiell später gebildete Lösung wird ständig abgeführt. Das bedingt die große Löseeffektivität des Systems. Die differentielle Konzentrationsdifferenz hängt entscheidend von der Temperatur sowie der Kontaktzeit der Flüssigkeit, also der Bettlänge und dem Fluß ab. Der Fluß wiederum ist vom Druck auf die Flüssigkeitssäule und von den Strömungswiderständen der Filter, der Durchtrittsquerschnitte und der Viskosität abhängig. Die Kontaktzeit und die Temperatur entscheiden darüber, ob die aus dem Bett tretende Lösung konzentriert, gesättigt oder übersättigt ist. Übersättigungsphänomene, die die Konzentrationsdifferenz vergrößerten, traten bei Meridian-Injektoren mit HI-6 Dichlorid auf. Sie sind aber als nicht gezielt steuerbar einzustufen.

Astra-Injektoren (HI-6 DMS)

Kann die Schüttelzeit mit HI-6 DMS auf 2 statt 5 Sekunden reduziert und gleichzeitig die ejizierte HI-6 Menge auf 1,2 mmol gesteigert werden?
Mit der bisherigen Füllung von 1,07 mmol HI-6 DMS und 2,9 ml Atropinsulfatlösung ließen sich in 2 Sekunden bei 5°C Lösungen mit 0,3 M erzeugen. Mit einer Ejektion von 3 ml Lösung erreichten damit 0,9 mmol den Muskel. Die Differenz von 0,3 mmol bis zur gewünschten Dosis könnte man mit einer Erhöhung der Füllmenge auf 1,33 mmol (636 mg) ausgleichen. Die HI-6 Oberfläche wäre größer, der anfängliche Unterschied zur Zielkonzentration mit 0,44 M ebenfalls und damit die Lösegeschwindigkeit zu Beginn höher. Um sicher zu gehen, könnte gleichzeitig die mittlere Korngröße unter Berücksichtigung der „caking-Gefahr“ etwas verringert werden. Am Modell von NaH_2PO_4 konnte z. B. die Lösegeschwindigkeit bei einem Übergang von

0,3-0,4 mm auf 0,2-0,3 mm bei 10°C fast verdoppelt werden (Seidl 1996). Würde dann noch das Volumen der Atropinlösung erhöht, um die Viskosität der HI-6 Lösung zu senken, beispielsweise auf 3,1 ml, läge die Zielkonzentration bei 0,38 M und nur geringfügig mehr, 3,2 ml, müßten ejiziert werden.

Meridian Injektoren

Die mangelhafte Abgabe der Solldosis an Atropin stellt bei 5°C unter Gegendruck für HI-6 DMS mit nur 59%, also 1,2 mg Atropin, ein Problem dar. Am naheliegendsten wäre eine Erhöhung der Atropinkonzentration im Solvent. Als Dosis wären dann statt 2 mg 3,3 einzufüllen. Dies wäre einfach zu verwirklichen und notfalls akzeptabel, wenn es sich weiterhin bestätigt, daß unter Gegendruck zwischen 5°C und 25°C sowie zwischen 5 oder 10 Sekunden Ejektionszeit kein größerer Unterschied in der Ejektion von Atropin existiert. Ansonsten wäre diese Maßnahme angesichts möglicher massiver Atropinwirkungen (Inkapazitierung) bei fehlender OP-Vergiftung zu verwerfen.

Alternativ dazu könnte der Fluß erhöht werden, indem der Federdruck erhöht würde oder Strömungswiderstände verringert würden. Z. B. könnte eine Vergrößerung des jetzigen Kanüleninnenquerschnitts von 0,6 mm auf nur 0,7 mm bei gleichbleibendem Druckgefälle über die Kanülenlänge die Volumenstromstärke nach dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz um das rund 1,8-fache steigern, wenn sich nicht weiter oben ein begrenzender Widerstand findet. Deshalb sollte auch dem Auslaßfilter mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden. Könnte man nicht den effektiven Filterquerschnitt erhöhen, indem nach der Ampulle ein weit weniger breiter, verengender Dichtungsring verwendet wird (quadratische Abhängigkeit!)? Kann nicht die Porengröße des Filters auf z. B. 25 µm bei kleiner Klassenbreite erhöht werden?

Eine Vergrößerung des Solventvolumens würde jedenfalls die Viskosität der entstehenden Lösung nicht herabsetzen können, da die angewendete Löse-

technik eine konstante, wenn auch temperaturabhängige Lösekinetik bedingt. Zur Verringerung von temperaturabhängigen Reibungswiderständen sollte an die Abstimmung der Ausdehnungskoeffizienten der Kolben- und Ampullenglasmaterialien gedacht werden.
Die Lösegeschwindigkeit von HI-6 DMS durch Vergrößerung der Korngröße herabzusetzen, um mehr Solvent aus dem Injektor herauszubringen, ist nicht anzuraten. Denn auch beim langsamer löslichen HI-6 Dichlorid war bei 5°C der Ausstoß von Atropinlösung mit nur 73% der Dosis enttäuschend klein. Eine solche Maßnahme könnte dagegen in Verbindung mit oben genannter Erhöhung der Flußstärke vielversprechend sein.

Beide Injektorsysteme

Während sich der Astra-Injektor bereits als mechanisch recht ausgereift präsentierte, sind am Prototyp von Meridian die Stabilität des Filtersitzes am Trennkolben und die Druckdichtigkeit der Verbördelung verbesserungswürdig.
Sollte sich bei späteren In-vivo-Versuchen herausstellen, daß die im In-vitro-Testaufbau erzeugbaren 1,2 bar Gegendruck für vollständige i.m.-Injektionen nicht ausreichten, müßte die Federkraft nebst der Qualität davon betroffener Komponenten entsprechend angepaßt werden.

Alles in allem wäre der Astra-Injektor mit einer abgebbaren HI-6 DMS Dosis von 1,0 mmol sofort einsetzbar, wenn die Aluminiumfolienversiegelung der Pulverkammer zuverlässig dicht bliebe. Am Meridian Prototyp dagegen müßte noch in manchen Punkten nachgebessert werden. Er wäre dann die vorzuziehende, weil sicherer zu bedienende und schnellere Alternative. Seine Technologie könnte in zivilen Ersthilfesituationen mit in Lösung instabilen Arzneistoffen ebenfalls einen deutlichen Fortschritt für den Patienten bedeuten.

4.2 Abbau von HI-6 in konzentrierter, ungepufferter Lösung

Zum Zersetzungsverhalten des Wirkstoffs existiert eine Reihe von Untersuchungen an gepufferten Lösungen in Konzentrationen kleiner 20 mM (Brown, Gray et al. 1984; Brown, Stermer-Cox et al. 1984; Eyer and Hell 1985; Brown, Kazyak et al. 1986; Eyer, Hell et al. 1986; Lin and Klayman 1986; Eyer, Kawan et al. 1987; Fyhr, Nicklasson et al. 1987; Zao and Yang 1987; Clement, Lockwood et al. 1988; Mdachi, Marshall et al. 1990; Schlager, Dolzine et al. 1991; Wang, Lee et al. 1995). In nur einigen wenigen Arbeiten war mit ungepufferten, hoch konzentrierten Lösungen experimentiert worden (Eyer, Hagedorn et al. 1988; Korte and Shih 1993; Paddle and Dowling 1993). Diese Lösungen zeigten ein von den verdünnten abweichendes Verhalten.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit HI-6 Lösungen in Konzentrationen von 400 mM bei 37°C zeigten zwar nicht identische, aber ähnliche Ergebnisse.

Insgesamt blieb eine Reinheits-, Konzentrations-, pH-, und Packmittelabhängigkeit (Ampullenmaterial) der Geschwindigkeit des Zerfalls von HI-6 und des Spektrums von Abbauprodukten bei hohen HI-6 Konzentrationen zu beobachten. Vorherrschendes Abbauprodukt war in allen durchgeführten Experimenten die „HI-6 Säure“, M3. Entsprechende Voraussagen des Zersetzungsverhaltens in Autoinjektoren aus dem Verhalten von Modellösungen sind inzwischen anhand bisheriger und der vorliegenden Untersuchungen möglich (Eyer, Hell et al. 1986; Zao and Yang 1987; Eyer, Hagedorn et al. 1988; Mdachi, Marshall et al. 1990; Korte and Shih 1993; Clair, Wiberg et al. 2000).

HI-6 Abfall

In den Tests hatten sich HI-6 Dimethansulfonatlösungen ein wenig günstiger verhalten als Dichloridlösungen, denn sie alterten tendenziell nicht so schnell.

Dies kann als Hinweis dafür gewertet werden, daß der Abbau nicht wesentlich vom Anion beeinflußt wird. Daß sich der zeitliche Verlauf des HI-6 Abbaus im Modell wie im Injektor unter Berücksichtigung des temperaturabhängigen Geschwindigkeitsfaktors von 6,4 (25°C zu 37°C) fast glich, ließe sich künftig für beschleunigte Stabilitätsstudien in Astra-Injektoren nutzen.

Bemerkenswert war die Beobachtung, daß die Abbaureaktionen in den rund 400 mM Lösungen mit einem Start-pH von 3,3 etwa eine Woche benötigten, um merklich anzuspringen. Ob bei 25°C oder 37°C spielte keine Rolle. Hiervon war noch nicht berichtet worden (Eyer and Hell 1985; Eyer, Hell et al. 1986; Eyer, Kawan et al. 1987; Zao and Yang 1987; Eyer, Hagedorn et al. 1988; Mdachi, Marshall et al. 1990; Korte and Shih 1993). In der Konsequenz können gebrauchsfertige HI-6 DMS- und HI-6 2Cl Lösungen z. B. in Astra-Injektoren für eine Woche bis max. 37°C als stabil betrachtet werden. Läßt man einen HI-6 Abfall auf 95% zu, wären bei 25°C zusätzliche 5 Wochen bei 37°C alternativ gut eine weitere Woche gewonnen, in denen der Inhalt voraktivierter Injektoren im Notfall sofort injiziert werden könnte.

Abbauprodukte

Das sich ergebende Hauptprodukt in den Modellösungen und in aktivierten Astra-Autoinjektoren war in früheren Untersuchungen in verdünnten Lösungen als M3 bezeichnet worden. Es wurde vermutet, daß es sich dabei um das Desaminierungsprodukt von HI-6, die „HI-6 Säure“ handelte. Eine eindeutige Strukturaufklärung unterblieb jedoch (Eyer at. al. 1986). Später wurde dieses Produkt in konzentrierten Lösungen in größerer Ausbeute gefunden und ebenfalls als „HI-6 Säure“ angesehen. Die NMR-Analysen waren aber nicht eindeutig (Korte and Shih 1993). Ob das leicht verunreinigte HI-6 2Cl Präparat mit der geringen Reaktivatorleistung, über die Clement et al. (1988) berichteten, erhebliche Mengen an „HI-6 Säure“ enthielt, war anhand der spärlichen, publizierten Daten nicht feststellbar. Das HPLC-Chromatogramm ließ nur sehr geringe Mengen dreier Verunreinigungen erkennen.

Die ^{1}H-NMR und ^{13}C-NMR-Spektren der Charge, die außer einer Bandenverbreiterung das typische HI-6 Muster aufwiesen, standen nicht zur Verfügung und hätten ohne Anreicherung der Verbindungen wohl auch keine größere Aussagekraft gehabt.
Struktur und Identität von M3, der „HI-6 Säure“ konnten jedenfalls nach Herstellung aus HI-6 und Isolierung zweifelsfrei mittels chemischer Untersuchungen, Massenspektrometrie, NMR, HPLC und Photometrie belegt werden.

Die Muster weiterer bekannter Abbauprodukte in den Modellösungen und im Astra-Injektor gelagerter Lösungen, die mittels HPLC-Methodik differenzierbar waren, konnten unter Anpassung der Zeitskala gut verglichen werden.

Die Bildung polymerer Produkte in Astra-Injektoren, denen stets eine Vergrünung der Lösung vorausging, konnte mit derjenigen der Modelllösungen noch nicht auf sicherer Basis verglichen werden. Als Hinweis mag gelten, daß die Injektoren-Lösungen unter Berücksichtigung des Temperaturfaktors deutlich schneller zu vergrünen bzw. lediglich braun (Injektor Nr. 4) zu werden schienen als die Modellösungen. Ferner waren sie am Ende der jeweiligen Untersuchungszeit nicht schwarzgrün, sondern eher dunkelbraun gefärbt.

pH-Abfall und -Anstieg

Der **pH-Abfall** in den Modelllösungen von rund 3,3 auf pH 2,0 - 2,2 könnte folgendermaßen erklärt werden: Bei der Hydrolyse von HI-6 entsteht einerseits das Ammoniumsalz der „HI-6 Säure“, andererseits bilden sich unter Bruch der Aminal-Acetal-Brücke saure Pyridiniumsalze. Eine theoretische Berechnung der Wasserstoffionenaktivität analog zu jener frisch hergestellter Lösungen, sollte eine gute Übereinstimmung mit einem pH von 2,63 einer

z. B. 2 Wochen lang bei 37°C gealterten Lösung zeigen, wenn alle analytisch gefundenen Stoffe für den pH-Abfall verantwortlich wären:

Tabelle 4-3
Theoretische Wasserstoffionenaktivität einer wäßrigen, 2,1 Wochen alten HI-6 DMS Lösung (μ = 1,2) bei einem pH von 2,63 (pKs*: ionenstärkenkorrigiert).

	mM	Säure-funktion	pKs	pKs*	% deprotoniert	mM H^+-Akt.
HI-6	378,4	Oxim	7,28[1)]	7,01	0,004	0,0157
(M3$^-$) NH_4^+	16,2	NH_4^+	9,24[2)]	9,51	0,000	0,0000
INA	1,3	Pyridin-NH^+	3,61[3)]	3,88	5,363	0,0697
INS	0	Pyridin-NH^+	4,89[3)]	5,16	0,297	-
2-PCN	0,7	Pyridin-NH^+	-0,26[3)]	0,01	99,763	0,6983
2-PAO	1,5	Pyridin-NH^+	3,56[3)]	3,83	5,979	0,0897
2-PAO	1,5	Oxim	10,17[3)]	9,90	0,000	0,0000
					Summe	0,8734

1) Hagedorn, Stark et al. 1972. 2) Streitwieser und Heathcock 1980. 3) Perrin 1965.

Die Diskrepanz zum daraus errechneten pH von 3,06 weist auf analytisch nicht erfaßte, zuwenig saure oder zuviel basische Verbindungen hin. Protonen freisetzen würde z. B. das Abfangen von basischem Ammoniak als Formaldehyd-Halbaminal. Statt Formaldehyd könnte in situ entstehender 2-Pyridinaldehyd analog reagieren.

Weshalb letztlich die Amidhydrolyse von HI-6 eine relativ große Geschwindigkeit erreicht hatte, bleibt noch im Dunkeln. Daß eine solche Hydrolyse, in der Regel unter drastischen Bedingungen, generell säure- oder basenkatalysiert erfolgen kann, ist bekannt (Zabicky 1970). Angreifende Spezies wären im Sauren z. B. Protonen, Wasser, die Aldoximfunktion von HI-6, das Ammonium- und Hydroxylammoniumion sowie im Sauren nur zu kleinen Teilen vorkommende Nucleophile wie das Hydroxidion, das Oximation, eventuell das Cyanidion. Das Hydroxylammoniumion war bereits als saurer Katalysator praktisch ausgeschlossen worden (Korte and Shih 1993). Denn

die notwendigen Bedingungen wären sehr drastisch (3 M Lösung, HI-6: 0,6 M, 60°C, 4 Tage, M3-Ausbeute ca. 50%) oder die Konzentrationen bis zur Halbwertszeit des Abbaus von HI-6 lägen viel zu tief für spürbare katalytische Wirkungen (< 2 mol%). Die Vermutung von Korte et al., daß die Aldoximfunktion in konzentrierter HI-6 Lösung aufgrund des pH's von 2,4 in frischer 0,5 M HI-6 Lösung eine stark erhöhte Säurestärke zeigt (pKs ca. 4,5 statt 7,28), kann, wie in dieser Arbeit gezeigt, ebenso auf Verunreinigungen zurückzuführen sein.

Da im Sauren in verdünnter Lösung kaum M3 gebildet wird (Eyer, Hell et al. 1986), könnte neben hoher Konzentration von HI-6 die hohe Ionenstärke der Schlüssel sein. Sie begünstigt schon am Anfang des HI-6 Zerfalls durch Aktivitätsabsenkung die Bildung von Ionen. Das erleichtert die Dissoziation saurer Oximfunktionen im Sinne einer Säurekatalyse und stabilisiert z. B. die aus Hydrolyse gebildeten M3-Anionen und Ammonium-Kationen. Sie wächst, je mehr ionisierbare Abbauprodukte aus dem HI-6 Molekül entstehen (Leuenberger 2002).

Wenn es auch nur an zwei Injektorlösungen zu sehen war, deren pH nach einiger Zeit wieder anstieg, bleibt festzuhalten, daß sich in diesen Fällen der HI-6 Zerfall bei bevorzugtem Bruch der Aminal-Acetal-Brücke mit steigendem pH beschleunigte. Es sieht damit so aus, als wäre die Amidhydrolyse hier die langsamere Reaktion und damit der anfängliche pH-Abfall günstig für die relative HI-6 Stabilisierung auch in konzentrierter Lösung.

Grünschwarze Polymerisate

Über sie ist praktisch nichts bekannt, sind es doch mittel- bis langfristige unerwünschte Umsetzungsprodukte (Eyer and Hell 1985; Eyer, Hell et al. 1986). Daß die in den Versuchen entstandenen methanollöslich waren, deutet auf eine eher kleine Kettenlänge hin. Allgemein gesehen ist HI-6 durch die Quaternierung der Pyridinstickstoffe und dem in der Aminal-Acetal-Brücke

versteckten Formaldehyd ein sehr reaktives Molekül (Eicher 1995; Gilchrist 1995), weswegen vielerlei Reaktionsmöglichkeiten offen stehen.
Anhand der vorliegenden Daten kann nur spekuliert werden, ob die Vernetzungsprodukte weitgehend auf C-1-Brücken (Formaldehyd) beruhen oder ob nicht zusätzlich Nucleophile wie z. B. das Oximation oder das Cyanidion eine Pyridiniumringspaltung ähnlich einer Zincke-König Reaktion bewirken könnten und die entstehenden, nicht stabilen Glutacondialdehyd-derivate nicht längere, ungesättigte Brücken bilden könnten.

Erkennung des Abbaus vor Anwendung

Ob eine Sichtkontrolle durch ein Fenster in den Autoinjektoren sinnvoll ist, um sie zumindest nach ca. 2-3 Wochen nach Beginn einer Zersetzung und Verfärbung ausmustern zu können, hängt von der Photostabilität des Wirkstoffs ab. Eine chinesische Arbeit zeigte einen starken Einfluß von 254 nm UV-Licht (150 µWatt/cm in 30 cm Entfernung) auf die Zersetzung von gepufferter 30 µM HI-6 2Cl Lösung bei pH 3,1, einer Ionenstärke von 0,5 und bei 25°C ± 0,5°C (Wang, Lee et al. 1995). Nach 15 Tagen waren nur noch ca. 50% des Wirkstoffes zu finden, wohingegen die Kontrolle unverändert war. Anschließend fiel der Wirkstoffspiegel in der belichteten Probe seltsamerweise kaum noch. Vor dem Hintergrund der widersprechenden Angabe zur Lichtunempfindlichkeit (>350 nm) von HI-6 2Cl (Eyer and Hell 1985) sind dahingehend Untersuchungen dringend anzuraten. Offen bliebe in diesem Zusammenhang auch die Frage, welche Reaktionsprodukte entstünden und welche biologische Wirkung sie hätten. Da photochemische Reaktionen in der Regel radikalisch ablaufen, sind andere Reaktionsprodukte zu erwarten.

4.3 Biochemische Wirkung von M3 und den Polymerisaten

Es war durchaus beruhigend aus den biochemischen Tests zu erfahren, daß M3 wenigstens die Reaktivierungsleistung von HI-6 gegenüber Sarin, Cyclosarin und VX nicht stört, nachdem es selbst 25-mal weniger potent reakti-

vierte als HI-6. Die geringe Reaktivierungsleistung der Säure, aber auch ihr geringes Hemmpotential wurde bereits 1970 von Dirks et al. beschrieben. Nach den heutigen Kenntnissen der Enzymstruktur (Sussman, Harel et al. 1991) und der molekularen Wechselwirkungen mit diversen Liganden wundert dieses Verhalten nicht. Die hohe π-Elektronendichte durch die Vielzahl an aromatischen Aminosäuren, die das katalytische Zentrum flankieren, erhöht die Affinität quaternärer Stickstoffverbindungen hierzu. Gegenteilige Effekte sind gegenüber anionischen Verbindungen mit Carboxylatstruktur zu erwarten.

Die Untersuchung einer 9 Wochen alten HI-6 2Cl Lösung zeigte, daß HI-6 auch durch die anderen Abbauprodukte in seiner Reaktivierungsleistung bei halbtherapeutischer Konzentration nicht beeinträchtigt wird. Allerdings könnten die Abbauprodukte noch weitere Wirkungen haben, die bisher unbekannt geblieben sind und cholinerge Übertragungssysteme betreffen könnten. Damit findet der Bericht über die erheblich verminderte Antidotwirkung einer verunreinigten HI-6 2Cl Charge (Clement, Lockwood et al. 1988) immer noch keine Erklärung. Ob Synthesenebenprodukte dafür verantwortlich waren oder Abbauprodukte, ist offen. Mit dem Ansatz, nicht isolierte Stoffe, sondern zunächst sozusagen Reaktionsmischungen unterschiedlichen Abbaugrades bezüglich HI-6 oder noch nicht gereinigtem Wirkstoff aus der Synthese als Ganzes in vitro zu testen, besteht jetzt die Möglichkeit, eine Antwort zu finden oder Entwarnung geben zu können.

4.4 Stabilität von HI-6 Kristallpulvern

Hydratformen und Polymorphie

Wie bei der Herstellung von HI-6 DMS zu bemerken war, können durchaus andere Kristallmodifikationen entstehen. Eine im Anhang erwähnte Kristallform, aus reinem Methanol umkristallisiert, wies beispielsweise einen auffallend tiefen Zersetzungschmelzpunkt von 161°C auf. Sollte es sich um Hydrate

handeln, die später schnell zerfallen könnten, wären sie bei der photometrischen Gehaltsbestimmung nachweisbar. Sollten es aber noch nicht untersuchte Formen sein, die trotz des Fehlens von Kristallwasser eine andere Kristallstruktur aufweisen, könnte sich auch die Lösegeschwindigkeit verändert haben, weswegen sich nach jeder Produktion ein Schnelltest, etwa in der Apparatur nach Seidl empfiehlt (Seidl 1996). Ein solcher Test könnte auch bei Untersuchungen zur Langzeitstabilität Veränderungen unabhängig von denen des „Packmittels“ Autoinjektor aufdecken helfen.

Hygroskopizität

Die relativ zur Umgebungsfeuchte schnellere Feuchteaufnahme und die tiefe hygroskopische Grenzfeuchte von 74% r. F. von HI-6 DMS im Vergleich zu der von HI-6 2Cl mit 92% r. F. erhöht die Ansprüche an die Konstruktionsmaterialien der Autoinjektoren. Eine gute Feuchtigkeitsdichte, auch gegen geringe Mengen Wasserdampf, wäre wünschenswert und notwendig, wenn man an Ergebnisse über selbst relativ feuchtigkeitsfeste HI-6 2Cl Monohydratkristalle denkt, die in bei 40°C und 75% r. F. gelagerten Injektoren Zersetzungsspuren an ihrer Oberfläche aufwiesen (Clair, Wiberg et al. 2000). Dies ist ein Hinweis auf Reaktionen hoch konzentrierter Lösungen, die sich in Kondenswasser bilden können. Trockenes HI-6 2Cl Salz unter Schutzgas hätte diese Erscheinungen nicht gezeigt (Schreiner 1998).

4.5 Rückblick und Ausblick

Auf dem Weg zwischen der Herstellung eines wirksamen Pharmakons und der galenischen Entwicklung bis zur geeigneten Arzneiform müssen oft vielerlei Hürden überwunden werden. Im Fall von HI-6, seinen Besonderheiten und den Anforderungen an das Arzneimittel, war und ist dieser Weg besonders steinig.

HI-6 sollte durch Autoinjektoren zu verabreichen sein, damit das Antidot gegen Nervenkampfstoffe in Selbst- und Kameradenhilfe rechtzeitig intra-

muskulär injiziert werden kann. Hierzu existierte bereits eine entsprechende Technologie in Form von Atropen- und Combopen-Autoinjektoren, die Atropin bzw. Atropin plus Obidoxim in Lösung enthielten. Die autokatalytische Zersetzung von HI-6 in Lösung, die bis heute nicht verhindert werden kann, machte eine Neuentwicklung analog von Zwei-Kammer-Spritzen notwendig, bei der festes HI-6 erst vor der Injektion durch Schütteln des aktivierten Injektors gelöst wird. Diese Zwei-Kammer-Autoinjektoren, deren Entwicklung Ende der 80iger Jahre abgeschlossen schien, wurden von zwei Firmen auf den Markt gebracht, STI und Astra, wobei das Modell von Astra bereits von den Kanadischen Truppen im 2. Golfkrieg mitgeführt wurde.

Im Zusammenhang mit ersten pharmakokinetischen Untersuchungen mit diesen Autoinjektoren am Hund, die erst 1993 erfolgten, zeigten sich diverse Schwachpunkte beider Systeme, die sich in erster Linie auf das erratische Auflöseverhalten von HI-6 Dichlorid Monohydrat beim Schütteln bezogen. Bei diesen Funktionsprüfungen fiel außerdem die schlechte Löslichkeit von HI-6 Dichlorid Monohydrat in der Kälte auf, was verhinderte, daß sich die gewünschte Dosis von 500 mg im 3 ml löste. Alternativ wurde mit HI-6 Dimethansulfonat ein Salz des gleichen Reaktivatormoleküls gefunden, das zwar in der Kälte hervorragend löslich war, dessen schnelle Auflösung aber durch bauliche Besonderheiten in den Autoinjektoren der Firma STI noch nicht voll zur Geltung kam. Immerhin funktionierten die mit HI-6 Dimethansulfonat gefüllten Autoinjektoren der Firma Astra zufriedenstellend. Die Abkehr von der bisherigen Technologie zu einer völligen Neuentwicklung der Firma Meridian schien einen Wendepunkt zu markieren: Das Schütteln sollte ganz entfallen und die Atropinlösung das HI-6 Pulver lösen, während sie beim Ejektionsvorgang das Salzbett durchströmt. Schließlich sollte ein Filter vor dem Kanüleneingang ein Verstopfen der Kanüle durch ungelöste Teilchen verhindern. Diese Technologie versprach eine sehr hohe

Löseeffektivität, die vor allem dem hervorragend löslichen HI-6 Dimethansulfonat zugute kommen sollte, während die physikalischen Grenzen der schlechten Kaltlöslichkeit von HI-6 Dichlorid Monohydrat nach wie vor unüberwindbar schienen.

Die anfängliche Skepsis, ob ein komplettes Auflösen von HI-6 allein beim Durchströmen mit Atropinlösung überhaupt möglich sei, legte sich schnell. HI-6 Dimethansulfonat löste sich auch bei dieser Technik in wenigen Sekunden komplett. Daß aber die hervorragende Wasserlöslichkeit von HI-6 Dimethansulfonat plötzlich eigene Probleme mit sich brachte, war völlig unerwartet. So bildet sich bis zum Ende des Salzbettes eine Flüssigkeitsfront nahezu gesättigter HI-6 Dimethansulfonatlösung. Diese ist nicht nur arm an Atropin, da der Lösungsraum von HI-6 Dimethansulfonat ca. 40% des Volumens beansprucht, sondern auch viskös, so daß der Fluß bei Passage des 10 µm-Filters deutlich verlangsamt wurde. Dadurch wird für Atropin die geforderte Spezifikation einer kompletten Ejektion in 5 s nicht mehr eingehalten. Da aber erst am Ende der HI-6 Ejektion die Hauptmenge an Atropin abgegeben wird, kann sich eine verlangsamte Ejektion und damit eine verminderte Atropinabgabe katastrophal auswirken, wenn die Kanüle nach 5 s aus dem Oberschenkel gezogen wird. Dieses unerwartete Ergebnis erfordert nicht nur einige konstruktive Veränderungen, wie eine Erweiterung des Kanülenquerschnitts oder eine größere Filterporenweite. Das Ergebnis dürfte auch neue Fragen zur lokalen Verträglichkeit aufwerfen. Wie reagiert die Muskulatur auf die „Speerspitze“ der konzentrierten Salzlösung von maximal 3000 mOsmol? Wird diese erste Fraktion durch die nachfolgende Flüssigkeit sofort wieder verdünnt oder muß man sich eine Art aufgefächerte Flußlandschaft mit sehr unterschiedlichen Konzentrationen zwischen den Muskelfasern, im schlimmsten Fall mit Vasospasmenfolge, vorstellen? Diese Fragen sollten bald geklärt werden, bevor ein technisch zwar faszinierendes, physiologisch aber abzulehnendes Konzept weiter verfolgt wird. Dieses Beispiel

weist auch darauf hin, wie wichtig es ist, daß technologische Neuentwicklungen zeitnah durch Untersuchungen mit biologischem Blickwinkel im Sinne des Patienten begleitet werden.

Schließlich ist vielleicht doch ein Ausweg möglich: Könnten nicht die Löseeigenschaften beider HI-6 Salze in einem gemischten Salzbett kombiniert werden? Dabei ginge zunächst HI-6 Dimethansulfonat in Lösung, dem dann gelöstes HI-6 Dichlorid Monohydrat folgt. Die HI-6 „Speerspitze“ würde abgestumpft, die Viskosität erniedrigt und die geringere Menge HI-6 Dichlorid Monohydrat könnte sich in dem vergleichsweise noch großen Atropinlösungsvolumen vollständig lösen. Das System verhielte sich dann analog einer Retard-Formulierung mit immediate und sustained-release Charakteristik im 5 Sekundenfenster inklusive Ejektion. Ohne experimentelle Überprüfung vor allem auch der Kombinierbarkeit der beiden Salze bezüglich ihrer unterschiedlichen Hygroskopizität und damit ihrer Stabilität läßt sich darüber bislang nur spekulieren.

Der Weg zur schnellen, einfachen Applikation von HI-6 ist also noch nicht zu Ende.

5 Zusammenfassung

Zweifelsohne stellt die Vergiftung mit Organophosphonat-Nervenkampfstoffen wie VX, Cyclosarin oder Sarin eine akute medizinische Notfallsituation dar, in der mit entsprechenden Antidoten in Autoinjektoren eine wirkungsvolle und rasche Selbst- oder Kameradenhilfe möglich sein sollte. Die hierzu geeignete Kombination aus Atropinsulfat (2 mg Atropin) und einem Acetylcholinesterase-Reaktivator wie HI-6 (1,2 mmol) stand in Autoinjektorsystemen bereits den Kanadiern zur Verfügung. Die Instabilität von HI-6 in Lösung verlangte allerdings eine Lagerung als Trockenpulver, das für die lebensrettende Injektion in situ gelöst werden mußte. Diese Trennung in Form von Zwei-Kammer-Ampullen verlangte der Konstruktion dieser binären Injektoren und der Einstellung der Eigenschaften des HI-6 Salzes besonders viel ab. Schließlich mußte eine einfache und sichere Bedienbarkeit des Injektors, eine hohe Lösegeschwindigkeit des Salzes auch in der Kälte, eine vollständige Injektion der vorgesehenen Dosis auch in angespanntes Muskelgewebe sowie der Schutz des trockenen HI-6 Pulvers vor Feuchtigkeit gewährleistet sein.

In der vorliegenden Untersuchung wurden zur Prüfung der schnellen Freisetzung von HI-6 aus Autoinjektoren Methoden verwendet, die danach entwickelt wurden, wie der Anwender die Geräte einsetzen soll. Die Ergebnisse der Tests bestätigten für Injektoren der Firma Astra, deren Salzfüllung durch Schütteln in Lösung gebracht wurde, daß die Abgabe einer vollen Dosis Atropin (2 mg) und HI-6 Dimethansulfonat (1,0 mmol) bei 5°C gegen einen überwindbaren Druck von 1,4 bar in 10 Sekunden möglich ist. Diese Zeit konnte dank einer anderen Lösetechnik im Prototyp des neuen Autoinjektors von Meridian Medical Technologies neben viel einfacherer Handhabung auf 5 Sekunden gesenkt werden. Das Prinzip des durchströmten Pulverbetts erlaubte eine Auflösung noch während der Injektion. In den Tests in einer eigens hierfür gebauten Apparatur konnte die Freisetzung von 1,2

mmol HI-6 Dimethansulfonat bei 5°C gegen einen überwindbaren Druck von 1,2 bar gemessen werden. Die schnelle Auflösung des Reaktivatorpulvers führte allerdings zu einer sehr hohen Anfangskonzentration (800 - 900 mM) mit hoher Lösungsviskosität, was die Atropinlösung verdrängte und den Flüssigkeitsausstoß verlangsamte. Deshalb konnten nur 60% des Atropins (1,2 mg) abgegeben werden. Das ursprünglich eingesetzte HI-6 Dichlorid Monohydrat war wegen seiner schlechten Kältelöslichkeit in keinem der Injektorsysteme für die Abgabe einer vollen HI-6 Dosis geeignet. Die Diskussion der Untersuchungsergebnisse anhand der Noyes-Whitney Differentialgleichung für Auflösungsvorgänge zeigte mögliche Verbesserungsmöglichkeiten für alle Salz-/Injektorkombinationen auf. Ein experimentell abgesicherter Mindestwert für eine ausreichende Druckentwicklung während der Injektion fehlte nach wie vor. Erlaubte er doch die fundierte Beurteilung der Injektorleistung gegen Gewebedrücke und die Entwicklung eines adäquaten In-vitro Prüfsystems.

Ein Bericht über den dramatischen Wirkungsverlust (1/6) eines verunreinigten HI-6 Salzes bei Sarin-vergifteten Mäusen ließ ein Hydrolyseprodukt von HI-6 vermuten, das als M3 bekannt ist und an der Isonikotinamidfunktion desaminiertes HI-6 darstellt („HI-6 Säure“). Dieses Produkt entsteht überraschenderweise in großen Mengen bei 37°C und bei 25°C nach unbekannten pH-senkenden Startreaktionen in nicht gepufferten, konzentrierten Lösungen (0,4 - 0,7 M), wie sie unbeabsichtigt, z. B. in fehlerhaft versiegelten Pulverkammern, entstehen können. Nach Herstellung von M3 durch Abbau einer konzentrierten 0,4 M Lösung von HI-6 Dichlorid Monohydrat konnte es isoliert, charakterisiert und einwandfrei mittels chemischer, massenspektroskopischer Untersuchungen und Kernresonanzexperimenten identifiziert werden. Seine biochemische Wirkung wurde an Erythrozytensuspensionen untersucht, deren Acetylcholinesterase mit VX, Sarin oder Cyclosarin vollkommen gehemmt worden war. Allerdings reaktivierte M3 bei

einer Konzentration von 5 µM weder gehemmtes Enzym noch störte es die HI-6 Reaktivierungsleistung im Gemisch. Die erwartete Wirkungsminderung von HI-6 blieb aus. Mit Hilfe heutiger molekularchemischer Kenntnisse läßt sich die geringe Affinität zur AChE über entsprechend hohe π-Elektronendichten am Eingang zum aktiven Zentrum des Enzyms erklären, die M3 mit Carboxylatstruktur abstoßen. Die mitgetesteten schon früher erwähnten, gealterten, grün-schwarzen HI-6 Lösungen wiesen nur noch die Reaktivierungsaktivität von restlichem, noch intaktem HI-6 auf. Eine Störung der HI-6 Wirkung durch die Mischung an Abbauprodukten konnte nicht festgestellt werden. Inwieweit der hemmende Stoff mit der damaligen Synthese zusammenhing oder nur zu einem bestimmten Zeitpunkt des Abbaus von HI-6 entsteht, ist weiterhin ungeklärt.

Beim Umkristallisieren von HI-6 Dimethansulfonat für die Experimente wurde beobachtet, daß polymorphe Kristallformen mit sehr viel Kristallwasser entstehen können, die lagerinstabil sind und vorab erkannt werden müssen. Messungen zur Feuchteempfindlichkeit der HI-6 Salze zeigten Unterschiede. Während HI-6 Dichlorid Monohydrat bei Raumtemperatur erst oberhalb 91% r. F. hygroskopisch reagiert, liegt die Grenze für HI-6 Dimethansulfonat mit 75% r. F. sehr viel tiefer. Daher ist eine besonders gute Feuchtedichtigkeit bei der Entwicklung von Zwei-Kammer-Injektoren zu fordern. Sie darf unter extremen Klimaschwankungen bei Transport und Lagerung nicht nachlassen.

Die schlechte Kältelöslichkeit von HI-6 Dichlorid Monohydrat und die sehr gute von HI-6 Dimethansulfonat könnten letztlich einen Vorteil für das Meridian Autoinjektorsystem bedeuten. Zu einer Salzmischung kombiniert, die ein flacheres, gesteuertes HI-6-Freisetzungsprofil aufweist, das den Nachteil der mangelhaften Atropinabgabe ausgleichen könnte, ließe wertvolle Sekunden gewinnen, die über Leben und Tod entscheiden können.

6 Literatur

Bergmeyer, H. U. (1970). Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie: 1457-60.

Black, M. L. (1955). "The Ionization Constants of the Pyridine Monocarboxylic Acids: a Reinterpretation." J. Phys. Chem. **59**: 670-71.

Brown, N. D., R. R. Gray, et al. (1984). "Stability study of HI-6 dichloride in various anticholinergic formulations." J. Chromatogr. **315**: 389-94.

Brown, N. D., M. G. Stermer-Cox, et al. (1984). "Separation of HI 6 [4-carbamoyl-2'-hydroxyiminomethyl-1,1'-oxydimethylene-di(pyridinium chloride)] and its degradation products by ion-pair high-performance liquid chromatography." J. Chromatogr. **292** (2): 444-50.

Brown, D. N., L. Kazyak, et al. (1986). "Separation and identification of substituted pyridine analogues in heat labile solutions of HI-6 dichloride." J. Chromatogr. **351**: 599-603.

Brunner, E. (1904). "Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen." Z. Phys. Chem. **47**: 56-102.

Clair, P., K. Wiberg, et al. (2000). "Stability study of a new antidote drug combination (Atropine-HI-6-Prodiazepam) for treatment of organophosphate poisoning." Eur. J. Pharm. Sci. **9** (3): 259-63.

Clement, J. G., P. A. Lockwood, et al. (1988). "The acetylcholinesterase reactivator HI-6 (1-[[[4- (aminocarbonyl)pyridinio]methoxyl]methyl]- 2-[(hydroxyimino)methyl]-pyridinium dichloride): a comparative study of HI-6 samples from various sources." Arch. Toxicol. **62** (2-3): 220-23.

Clement, J. G., D. G. Bailey, et al. (1995). "The acetylcholinesterase oxime reactivator HI-6 in man: pharmacokinetics and tolerability in combination with atropine." Biopharm. Drug Dispos. **16** (5): 415-25.

D'Agostino, P. A., L. R. Provost, et al. (1996). "Electrospray mass spectrometric characterization of six therapeutic oximes: HI-6, HS-6, obidoxime, 2-PAM, TMB-4 and HLo-7." Rapid Commun. Mass Spectrom. **10** (7): 805-10.

Davey, B. (2001). Malfunction of Astra-autoinjectors During a Functional Demonstration. Personal communication. P. Eyer. Munich.

de Jong, L. P. and D. I. Ceulen (1978). "Anticholinesterase activity and rate of decomposition of some phosphylated oximes." Biochem. Pharmacol. **27**: 857-863.

Dekant, W., S. Vamvakas, et al. (2001). Hemmstoffe der Cholinesterase. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, U. Förstermann and K. Starke. München, Urban & Fischer**:** 1061-63.

Dirks, E., A. Scherer, et al. (1970a). "Beziehung zwischen chemischer Struktur und Cholinesterase-reaktivierender Wirkung bei einer Reihe neuer unsymmetrischer Pyridiniumsalze. Teil I: Derivate des 4-Hydroximinomethylpyridin." Arzneim.-Forsch. **20** (1): 197-200.

Dirks, E., A. Scherer, et al. (1970b). "Beziehung zwischen chemischer Struktur und Cholinesterase-reaktivierender Wirkung bei einer Reihe neuer unsymmetrischer Pyridiniumsalze. Teil II: Derivate des 2-Hydroximinomethylpyridin." Arzneim.-Forsch. **20** (2): 197-200.

Eddleston, M., S. Singh, et al. (2002). "Acute organophosphorus poisoning." Clin. Evid. **7**: 1-2.

Eicher, T. (1995). Pyridine, Pyridones. The chemistry of heterocycles: Thieme organic chemistry monograph series. S. Hauptmann. Stuttgart, Thieme**:** 269-316.

Ellin, R. I. (1982). "Stability of Concentrated Aqueous Solutions of Pralidoxime Chloride." J. Pharm. Sci. **71** (9): 1057-59.

Ellman, G. L., K. D. Courtney, et al. (1961). "A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity." Biochem. Pharmacol. **7**: 88-95.

EMEA (2003). Nerve Agents and Other Highly Toxic Organophosphates. EMEA/CPMP Guidance Document on the Use of Medicinal Products for the Treatment of Patients Exposed to Terrorist Attacks with Chemical Agents. London, EMEA, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products**:** 11-14.

Eyer, P. and W. Hell (1985). "Chemical stability of the Hagedorn oximes HGG-12 and HI-6." Arch. Pharm. **318** (10): 938-46.

Eyer, P., W. Hell, et al. (1986). "Studies on the Decomposition of the Oxime HI 6 in Aqueous Solution." Arch. Toxicol. **59**: 266-71.

Eyer, P., A. Kawan, et al. (1987). "Formation of cyanide after i. v. administration of the oxime HI 6 to dogs." Arch. Toxicol. **61** (1): 63-69.

Eyer, P., I. Hagedorn, et al. (1988). "Study on the stability of the oxime HI 6 in aqueous solution." Arch. Toxicol. **62**: 224-26.

Eyer, P., I. Hagedorn, et al. (1992). "HLo 7 dimethanesulfonate, a potent bispyridinium-dioxime against anticholinesterases." Arch. Toxicol. **66** (9): 603-21.

Eyer, P. (1996). Optimal Oxime Dosage Regimen, a Pharmacokinetic Approach. Role of Oximes in the Treatment of Anticholinesterase Agent Poisoning. L. Szinicz, P. Eyer and R. Klimmek. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag**:** 33-38.

Fyhr, P., M. Nicklasson, et al. (1987). "A preformulation study on the kinetics of HI-6 in concentrated solution." Int. J. Pharm. **40**: 193-200.

Gilchrist, T. L. (1995). Pyridine. Heterocyclenchemie. H. Neunhoeffer. Weinheim, VCH GmbH**:** 127-157.

Hagedorn, I., I. Stark, et al. (1972). "Reaktivierung phoshorylierter Acetylcholinesterase. Abhängigkeit von der Aktivatoracidität." Angew. Chem. **84**: 354-56.

Hanke, D. W. and M. A. Overton (1991). "Phosphylation kinetic constants and oxime-induced reactivation in acetylcholinesterase from fetal bovine serum, bovine caudate nucleus, and electric eel." J. Toxicol. Environ. Health **34** (1): 141-56.

Hesse, M., H. Meier, et al. (1979). Massenspektren. Spektroskopische Methoden in der Chemie. Stuttgart**:** 280.

Hüttenrauch, R. (1967). "Kinetik des Thiaminabbaus in schwerem Wasser." Pharmazie **22** (9): 531.

Iwasaki, I. and S. Utsumi (1952). "New colorimetric determination of chloride with mercuric thiocyanate and ferric ion." Bull. chem. Soc. Japan **25**: 226.

Johnson, M. K., D. Jacobsen, et al. (2000). "Evaluation of antidotes for poisoning by organophosphorus pesticides." Emerg. Med. **12**: 22-37.

Jung, C.-H., S.-J. Choi, et al. (1994). "Stability of mono- and bis-pyridinium oximes in aqueous systems." Yakche Hakhoechi **24** (4): 273-79.

Korte, W. D. and M. L. Shih (1993). "Degradation of Three Related Bis(Pyridinium)Aldoximes in Aqueous Solutions at High Concentrations: Examples of Unexpectedly Rapid Amide Group Hydrolysis." J. Pharm. Sci. **82** (8): 782-86.

Leuenberger, H., Ed. (2002). Martin, Physikalische Chemie. Stuttgart, WVG, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: 407.

Lin, A. J. and D. L. Klayman (1986). "Stability studies of bis(pyridiniumaldoxime) reactivators of organophosphate-inhibited acetylcholinesterase." J. Pharm. Sci. **75** (8): 797-99.

Lüllmann, H., K. Mohr, et al. (1994). Nicotin. Taschenatlas der Pharmakologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag**:** 108 ff.

Lüllmann, H., K. Mohr, et al. (1999). Rezeptoren. Beeinflussung des Parasympathikus. Motorisches System. Phosphorsäureester. Pharmakologie und Toxikologie. H. Lüllmann, K. Mohr and M. Wehling. Stuttgart, Georg Thieme Verlag**:** 3 ff., 57 ff., 236 ff., 480 ff.

MacIlwain, C. (1993). "Study proves Iraq used nerve gas." Nature **3**: 363.

Marrs, T. C., R. L. Maynard, et al. (1996). Organophosphate Nerve Agents. Treatment and Prophylaxis of Organophosphate Nerve Agent Poisoning. Chemical Warfare Agents - Toxicology and Treatment. T. C. Marrs, R. L. Maynard and F. R. Sidell. Chichester, John Wiley & Sons**:** 83-100, 101-114.

Mast, U. (1997). Reaktivierung der Erythrozyten-Acetylcholinesterase durch Oxime. Ermittlung enzymkinetischer Konstanten und ihre Bedeutung für die Therapie einer Organophosphat-Vergiftung. Medizinische Fakultät. München, Ludwig-Maximilians-Universität**:** 141.

Mdachi, R. E., W. D. Marshall, et al. (1990). "Abiotic transformations and decomposition kinetics of 4-carbamoyl-2'-[(hydroxyimino)methyl]-1,1'-(oxydimethylene)bis(pyridinium chloride) in aqueous phosphate buffers." Chem. Res. Toxicol. **3** (5): 413-22.

Moore, W. J. (1983). Kinetik der diffusionskontrollierten Auflösung. Physikalische Chemie. D. O. Hummel, G. Trafara and K. Holland-Moritz. Berlin, New York, Walter de Gruyter**:** 488-91.

Nernst, W. (1904). "Theorie der Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen." Z. Phys. Chem. **47**: 52-55.

Noyes, A. A. and W. R. Whitney (1897). "The Rate of Solution of Solid Substances in their own Solutes." J. Am. Chem. Soc. **19**: 930-34.

Oberdisse, E. (2002). Pharmaka mit Wirkung auf das vegetative System. Pharmakologie und Toxikologie. E. Oberdisse, E. Hackenthal and K. Kuschinsky. Berlin, Springer Verlag**:** 77-81.

Paddle, B. M. and M. H. Dowling (1993). "Simple high-performance liquid chromatographic method for assessing the deterioration of atropine-oxime mixtures employed as antidotes in the treatment of nerve agent poisoning." J. Chromatogr. **648**: 373-80.

Pejkovic-Tadic, I., M. Hranisavljevic-Jakovljevic, et al. (1965). "Protonenresonanzspektren von Oximen aromatischer Aldehyde." Helv. Chim. Acta **48** (125): 1157-60.

Perrin, D. D. (1965). Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution. London, Butterworths: 141; 150-51; 161-62; 178-79.

Pouchert, C. J. (1981). Oximes. The Aldrich Library of Infrared Spectra, Aldrich Chemical Company**:** 1425-32.

Ricordel, I. and J. Meunier (2000). "Chemical weapons: antidotes view about the real means, perspectives." Ann. Pharm. Fr. **58** (1): 5-12.

Schlager, J. W., T. W. Dolzine, et al. (1991). "Operational evaluation of three commercial configurations of atropine/HI-6 wet/dry autoinjectors." Pharm. Res. **8** (9): 1191-94.

Schlagmann, C., H. Ulbrich, et al. (1990). "Bispyridinium (oxime) compounds antagonize the "ganglion blocking" effect of pyridostigmine in isolated superior cervical ganglia of the rat." Arch. Toxicol. **64** (6): 482-89.

Schrader, G. (1957). "Die insektiziden Phosphorsäureester." Angew. Chem. **69** (3): 86-90.

Schreiner, R. (1998). Untersuchungen zum Auflösungsverhalten zweier Salze des Cholinesterasereaktivators HI-6 in Autoinjektoren. Fakultät für Medizin. München, Ludwig-Maximilians-Universität.

Seidl, S. (1996). Untersuchungen zum Löseverhalten von HI-6 Salzen zur Anwendung in binären Autoinjektoren bei der Therapie der Organophosphatvergiftung. Medizinische Fakultät. München, Ludwig-Maximilians Universität**:** 56.

Siegel, F., F. D. Hiter, et al. (1964). "Stability of Procaine in Deuterium Oxide." J. Pharm. Sci. **53**: 978

Spöhrer, U. (1994). HPLC-analytische Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Pyridiniumaldoximen. Fakultät für Chemie und Pharmazie. München, Ludwig-Maximilians-Universität**.**

Spöhrer, U., H. Thiermann, et al. (1994). "Pharmacokinetics of the oximes HI 6 and HLö 7 in dogs after i.m. injection with newly developed dry/wet autoinjectors." Arch. Toxicol. **68**: 480-89.

Stahl, P. H. (1980). Feuchtigkeit und Trocknen in der pharmazeutischen Technologie. Darmstadt, Steinkopff: 189 Seiten.

Starke, K. (2001). Amine, Acetylcholin. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, U. Förstermann and K. Starke. München, Urban & Fischer**:** 123.

Stokes, R. H. and R. A. Robinson (1948). "Ionic Hydration and Activity in Electrolyte Solutions." J. Am. Chem. Soc. **70**: 1870-78.

Streitwieser, E. and C. H. Heathcock (1980). Organische Chemie. Weinheim, Verlag Chemie GmbH: 1392-94.

Stricker, H., Ed. (1987). Martin - Swarbrick - Cammarata, Physikalische Pharmazie. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH:

Sussman, J. L., M. Harel, et al. (1991). "Atomic Structure of Acetylcholinesterase from Torpedo californica: A Prototypic Acetylcholine-Binding Protein." Science **253**: 872-79.

Szinicz, L. (1994). Chemische Kampfstoffe. Lehrbuch der Toxikologie. H. Marquardt and S. G. Schäfer. Mannheim, BI Wissenschaftsverlag**:** 571-78.

Szinicz, L. and S. I. Baskin (1999). Chemical and Biological Agents. Toxicology. H. Marquardt, S. G. Schäfer, R. O. McClellan and F. Welsch. San Diego, Academic Press**:** 854-60.

Taylor, P. (1990). Anticholinesterase Agents. The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York, Pergamon Press**:** 161-76.

Thiermann, H., U. Spoehrer, et al. (1994). "Operational evaluation of wet/dry auto-injectors containing atropine in solution and powdered HI 6 or HLö 7." Int. J. Pharm. **109** (1): 35-43.

Thiermann, H., S. Seidl, et al. (1995). "Stand der Entwicklung neuer Autoinjektoren zur Behandlung der Nervenkampfstoff-Vergiftung." Wehrmed. Monatsschr. **39** (8-9): 189-92.

Thiermann, H., U. Spoehrer, et al. (1995). "Operational evaluation of wet/dry auto-injectors containing atropine in solution and powdered HI 6." Int. J. Pharm. **114** (1): 125-27.

Thiermann, H., S. Seidl, et al. (1996). "HI 6 dimethanesulfonate has better dissolution properties than HI 6 dichloride for application in dry/wet autoinjectors." Int. J. Pharm. **137** (2): 167-76.

Thiermann, H., R. Schreiner, et al. (1998). "Dissolution kinetics of unstable drugs in two-compartment autoinjectors: Analysis of the individual shaking behavior and influence of various shaking parameters on the dissolution rate of HI 6 in an automated system." Int. J. Pharm. **170** (1): 23-32.

Thiermann, H., L. Szinicz, et al. (1999). "Modern strategies in therapy of organophosphate poisoning." Toxicol. Lett. **107** (1-3): 233-39.

Wang, D.-P., J.-D. Lee, et al. (1995). "Stability of HI 6 in Solution." Drug Dev. and Ind. Pharm. **21** (4): 509-16.

Waysbort, D., D. Balderman, et al. (1981). "Carbon-13 NMR Characterization of the Bispyridinium Oximes, Toxogonin, HS-3, HS-6 and HI-6." Organ. Magn. Reson. **16** (1): 7-10.

WHO in collaboration with UNEP (1990). Public Health Impact of Pesticides used in Agriculture. Genf, WHO.

Williams, J. W. (1979). Handbook of Anion Determination. London, Butterworth & Co Ltd: 630.

Wils, E. R. J. and A. G. Hulst (1988). "Thermospray mass spectrometry of diquaternary pyridinium oxime salts." Biomed. Environ. Mass Spectrom. **17** (3): 155-59.

Worek, F., M. Bäcker, et al. (1997). "Reappraisal of indications and limitations of oxime therapy in organophosphate poisoning." Hum. Exp. Toxicol. **16** (8): 466-72.

Worek, F., C. Diepold, et al. (1999). "Dimethylphosphoryl-inhibited human cholinesterases: inhibition, reactivation, and aging kinetics." Arch. Toxicol. **73** (1): 7-14.

Worek, F., U. Mast, et al. (1999). "Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood." Clin. Chim. Acta **288**: 73-90.

Worek, F., R. Widmann, et al. (1999). Reactivation of organophosphorus-inhibited human erythrocyte-acetylcholinesterase by oximes in vitro. NATO Science Series, 1: Disarmement Technologies. **25:** 219-27.

Worek, F., G. Reiter, et al. (2002). Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates. Arch. Toxicol. **76:** 523-29.

Zabicky, J., Ed. (1970). The Chemistry of Amides. The Chemistry of Functional Groups. London, Interscience Publishers: 816-47.

Zao, S. and D. Yang (1987). "Determination of HI 6 in aqueous solution and ist stability in comparison with some oximes." Yaowu-fenxi-zazhi: 67-71.

7 Anhang

7.1 pH-Absenkung bei der Säulenchromatographie von HI-6 DMS

Am Ende des HI-6 Plateaus wechselte die Farbe des Eluates kurz von hellgelb auf zitronengelb bis braun. Dieser Wechsel war von einer deutlichen pH-Änderung begleitet, die nach etwa 12 Durchläufen weniger ausgeprägt war. In der HPLC-Untersuchung zeigte sich ein dazu paralleler Anstieg von Abbauprodukten von 0,1 auf 1,9 Flächenprozent bei 300 nm gegenüber der HI-6 Fläche. Wäre die pH-Absenkung zuverlässiger in ihrer Beständigkeit, hätte damit eine einfache Indikatormethode zur Steuerung des Vorgangs zur Verfügung gestanden. So bleibt der Chloridnachweis die beste Methode zur Abgrenzung des Hauptlaufes. Das Ende des Prozesses könnte daher mit einer chloridsensitiven Elektrode indiziert werden.

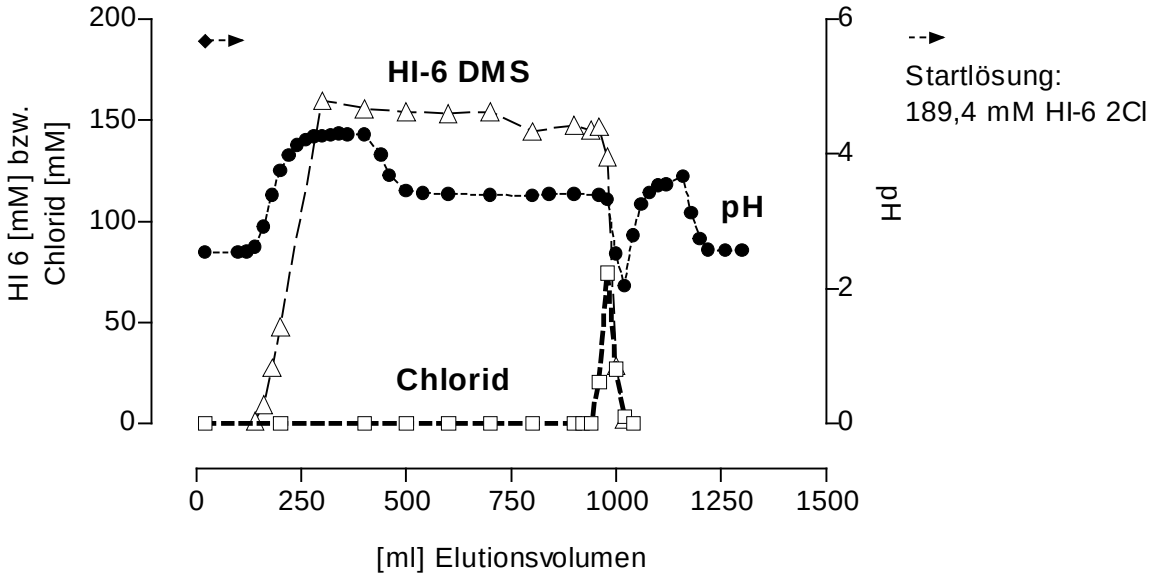


Abb. 7-1

HI-6 2Cl. Elutionsprofil des Ionenaustausches von Chlorid gegen Methansulfonat. Offene Quadrate: Chloridkonzentration. Geschlossene Kreise: pH. Offene Dreiecke: HI-6 DMS Konzentration.

7.2 Konstruktionsdaten der untersuchten Autoinjektoren

Tabelle 7-1
Gemessene Werte.

	Astra HI-6 DMS	**Astra HI-6 2Cl *)**	**Meridian HI-6 DMS**	**Meridian HI-6 2Cl**
Gehäuse				
Länge [cm]	16,9	16,5	15,33	15,70
Länge äußere Hülse [cm]	-	-	11,51	11,82
herausragender Teil der Innenhülse [cm]	-	-	2,4	2,4
Max. Durchmesser [cm]	2,5	2,5	2,3	2,3
Masse [g]	57,4	60	38,8	39,6
Kammersystem				
Mischkammervolumen [ml]	3,3	3,53	-	-
Pulverkammervolumen [ml]	n.b.	n.b.	n.b.	0,89
Stempelfläche [cm²]	1,74	1,77	0,98	0,98
Durchmesser Filterkopfeingang [cm]	-	-	0,59	0,58
Durchmesser Filterkopfausgang [cm]	-	-	0,61	0,61
Ampulle				
Material	Kunststoff	Kunststoff	Glas	Glas
Ampullenglaslänge [cm]	-	-	5,75	6,40
Ampulleninnendurchmesser [cm]	1,49	n.b.	1,11	1,11
Kanüle				
gesamte Länge [cm]	4,0	4,0	3,2	3,2
Injektionslänge [cm]	1,7	2,1	1,9	1,9
Durchmesser innen [mm]	0,6	0,6	0,6	0,6
Durchmesser außen [mm]	0,9	0,9	0,9	0,9
Feder				
Stärke [mm]	1,35	1,35	1,33	1,33
Masse [g]	11,5	11,4	7,55	7,55
Länge gespannt [cm]	5,6	5,6	3,9	3,9
Länge entspannt [cm]	14,1	14,6	11,2	11,2
Durchmesser außen [cm]	0,98	0,97	1,05	1,05
Federkonstante auf Druck [N/m]	127	143	177	177

n.b. = nicht bestimmt. *) Spöhrer 1994.

7.3 HPLC-Daten der gealterten 400 mM HI-6 Lösungen

Tabelle 7-2 Wäßrige Lösung in Polypropylen. (HPLC) mM Konzentrationen, n = 1, Fehlerbreite 2%.

HI-6 2Cl

Wochen	INA	INS	M3	HI-6	2-PCN	2-PAO
0,0	0,0	0,0	0,4	393,8	0,0	0,1
1,1	0,9	0,0	9,6	391,9	0,4	1,2
2,1	3,7	0,4	24,6	366,0	0,9	2,1
3,1	7,5	1,4	47,6	335,6	0,6	3,6
4,2	9,6	2,8	68,5	300,9	0,9	4,0
13,3	13,9	61,3	194,8	64,8	15,5	2,1
22,3	9,4	83,3	178,3	29,7	7,5	3,4

HI-6 DMS

Wochen	INA	INS	M3	HI-6	2-PCN	2-PAO
0,0	0,0	0,0	0,5	391,3	0,0	0,1
1,1	0,0	0,0	6,0	397,2	0,1	0,6
2,1	1,3	0,0	16,2	378,4	0,7	1,5
3,1	4,4	0,6	33,8	354,5	1,5	2,6
4,2	6,7	1,4	54,0	332,5	2,4	3,2
13,3	14,1	30,3	234,0	133,8	11,8	5,5
22,3	10,0	77,5	226,6	35,9	12,6	1,4

Tabelle 7-3 Wäßrige Lösung in Borosilikatglas. (HPLC) mM Konzentrationen, n = 1, Fehlerbreite 2%.

HI-6 2Cl

Wochen	INA	INS	M3	HI-6	2-PCN	2-PAO
0,0	0,0	0,0	0,5	409,2	0,0	0,1
1,1	2,2	0,0	9,7	400,7	0,5	1,2
2,1	5,4	0,7	25,6	382,1	1,1	2,2
3,1	9,0	2,0	48,9	340,4	0,9	3,2
4,2	11,5	3,7	69,1	304,9	1,3	4,1
13,3	13,5	30,6	163,4	89,9	8,6	5,8
22,3	11,7	55,4	169,5	46,5	6,1	5,3

HI-6 DMS

Wochen	INA	INS	M3	HI-6	2-PCN	2-PAO
0,0	0,0	0,0	0,5	392,1	0,0	0,1
1,1	0,0	0,8	5,9	387,1	0,2	0,6
2,1	2,6	0,4	15,6	372,0	0,8	1,5
3,1	5,7	1,2	32,2	348,1	1,6	2,4
4,2	7,9	2,3	51,2	324,6	2,6	3,1
13,3	13,1	21,7	185,3	155,4	7,8	7,4
22,3	8,8	40,5	197,6	61,8	6,8	6,4

Tabelle 7-4
Lösung in Borosilikatglas / D_2O. (HPLC) mM Konzentrationen, n = 1, Fehlerbreite 2%.

HI-6 2Cl

Wochen	INA	INS	M3	HI-6	2-PCN	2-PAO
0,0	0,0	0,0	0,4	405,8	0,0	0,1
1,1	1,4	0,0	3,8	400,3	0,1	1,0
2,1	4,4	0,2	11,5	403,6	0,6	2,7
3,1	8,0	0,7	23,8	362,5	1,5	3,9
4,2	11,6	1,6	39,3	348,7	2,5	4,9
13,3	22,3	21,7	135,4	157,4	10,4	7,9
22,3	21,4	58,2	165,0	69,6	12,6	7,6

HI-6 DMS

Wochen	INA	INS	M3	HI-6	2-PCN	2-PAO
0,0	0,0	0,0	0,5	407,0	0,0	0,0
1,1	0,3	0,0	2,5	399,0	0,0	0,3
2,1	1,4	0,1	6,4	393,2	0,8	0,6
3,1	3,9	0,2	13,7	378,9	0,8	2,5
4,2	7,5	0,6	23,4	364,0	1,4	4,4
13,3	19,0	13,8	123,0	187,9	8,6	7,1
22,3	15,9	29,1	144,3	89,1	8,3	7,4

7.4 UV/VIS-Absorption gealterter HI-6 Lösungen

Entweder wurden die an HI-6 anfangs 400 mM Lösungen direkt in Küvetten unterschiedlichen Lichtwegs vermessen oder mußten zur Messung mit bidestilliertem Wasser verdünnt werden. Werte aus Messungen mit verkürztem Lichtweg oder verdünnter Lösung wurden auf den Lichtweg 10 mm und unverdünnte Lösung zurückgerechnet.

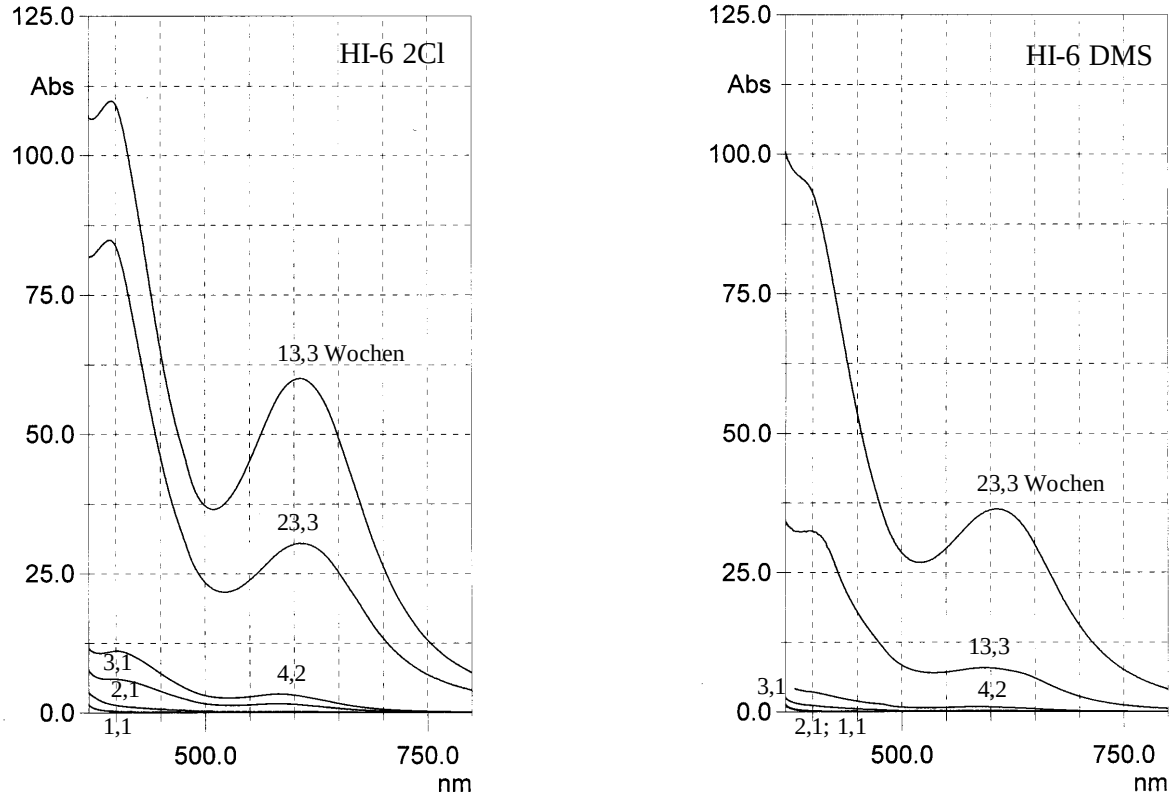


Abb. 7-2
UV/Vis-Spektren von in Polypropylen gelagerten Lösungen. Werte verdünnter Lösungen auf Ausgangskonzentration zurückgerechnet.

Bereits nach 2 Wochen waren HPLC-analytisch wie photometrisch bei den Prüflösungen beider Salze deutlich erkennbare Veränderungen feststellbar. Sensorisch klar faßbare Farbänderungen zeigten sich hier nur in der HI-6 2Cl Lösung. Die schnelle Zunahme der Absorption bei 400 nm und die Ausbildung dortiger Maxima ließ die Wellenlänge für die empfindliche Beobachtung von Veränderungen geeignet erscheinen.

Tabelle 7-5
Absorption von in Polypropylen gelagerten Lösungen.

	HI-6 2Cl		HI-6 DMS	
Lagerzeit (Wochen)	E, 400 nm	opt. Eindruck	E, 400 nm	opt. Eindruck
1,1	0,241	farblos	0,100	farblos
2,1	1,343	gelbgrün	0,202	fahlgelb
3,1	6,0 *)	grün	1,149	gelb
4,2	11,1 *)	grün	3,7 *)	grünlich
13,3	109,2 *)	dunkelgrün (erste Ausfällungen)	32,4 *)	dunkelgrün
22,3	84,0 *)	dunkelgrün (Ausfällungen)	93,2 *)	dunkelgrün

*) Umgerechnet auf unverdünnte Verhältnisse und eine Schichtdicke von 10 mm.

Die bekannten dunkelgrünen Ausfällungen traten im Beobachtungszeitraum nur bei HI-6 2Cl Lösungen auf. Waren sie nach 13 Wochen gerade in der Lösung zu erkennen, war auf diesem Wege nach 22 Wochen der Lösung so viel Material entzogen, daß nur noch ca. 75% der 13-Wochen Absorption bei 400 nm gemessen werden konnten.

Als Schnellmethode zur Beurteilung von HI-6 Zersetzungen liefert die Sichtprüfung auf die Farbe der Lösung sichere Beurteilungen nur für Gehaltsabnahmen ab etwa 7%. Die photometrische Messung konzentrierter Lösungen bei 400 nm leistet nach den vorliegenden Daten für Stichproben solange gute Dienste, bis Ausfällungen auftreten. Die Alternative, den HI-6 Abfall photometrisch über die Oximfunktion z. B. bei 352 nm bei pH 9,5 im Carbonatalkalischen zu beobachten (Zao and Yang 1987), könnte erst nach 4 Wochen Verluste anzeigen, da M3 miterfaßt würde (s. a. Abb. 3-16).

7.5 Technologische Eigenschaften der HI-6 Salze und Lagerstabilität

Unterschiedliche Kristallformen

Wie bei der Kristallisation von HI-6 DMS mit 92%igem Ethanol bemerkt, zeigte das Salz Polymorphieerscheinungen. Die Studienpräparate wurden durch Umkristallisieren von HI-6 DMS erzeugt. HI-6 DMS der Charge 1099-1 (101-355 µm) diente als Referenz.

Tabelle 7-6
Beispiele unterschiedlicher HI-6 Kristallformen und deren Eigenschaften.

Probe	HI-6 /Solvent /H_2O (% m/m)	Abkühlung (°C)	Mikroskopie	Verflüssigung [1] (°C)	Rekristallisation (°C)	Schmelzen unter Zersetzung (°C)	HI-6 [2] (%)
Referenz	9 /79 /12 (EtOH)	6°, dann -20°	Plättchen	-	-	167°	99,9
N3-5	10 /77 /13 (EtOH)	langsam auf -20°	Nadeln	70°	122°	156°	90,7
N2-2	8 /80 /12 (EtOH)	langsam auf -20°	fast nur Nadeln	90°	125°	n.b.	n.b.
N5-1	4 /96 /- (MeOH)	langsam auf -20°	Plättchen	-	-	161° [3]	96,9
N9-10	73 /- /28 (H_2O)	langsam auf -20°	Quader, große Plättchen	-	-	177°	n.b.

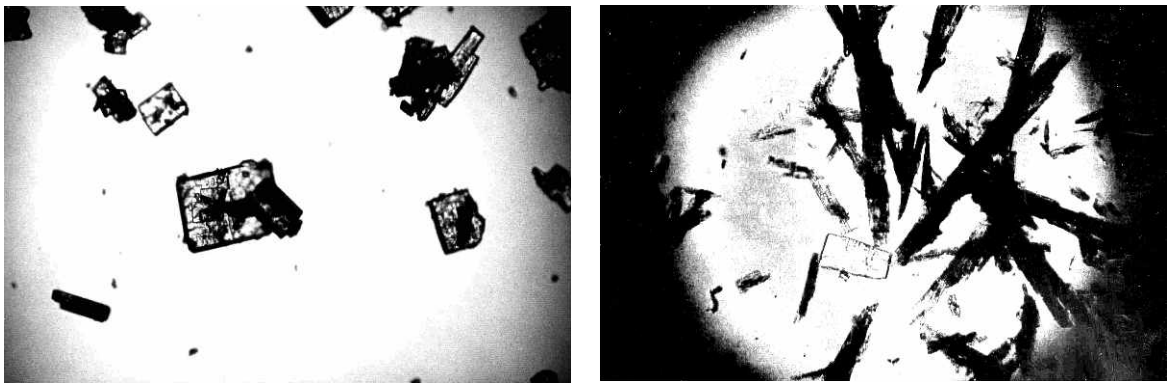
N.b. = nicht bestimmt. 1) Als ob in Kristallsolvent in Lösung gehend. 2) UV, 300 nm.
3) Zersetzungspunkt ohne Schmelze, per DSC bestimmt.

In der Gruppe mit sehr ähnlicher Lösungszusammensetzung waren Gehalte, Formen und Zersetzungsschmelzpunkte der hergestellten Kristalle unterschiedlich. Die Schmelzpunkte waren nicht korrigiert.

Kristallisat N2-2 erwies sich als beunruhigend instabil. Nach intensiver Trocknung, anfangs unauffällig, hatte es trotzdem 9 Monate später Wasser in den Gasraum abgegeben (Tröpfchen an der Lagergefäßinnenwand) und HCN gebildet. Per Photometrie nach Mikrodiffusion fanden sich 0,07% oder

700 µg Cyanid pro Gramm, entsprechend einem 1,3%igen Umsatz von HI-6. Die photometrische HI-6 Gehaltsbestimmung zeigte sogar 7,2% ± 1,9% zu wenig, was auf Abbau und ein Hydrat hinwies. Das Material war zudem hygroskopisch.

Ethanol, enzymatisch bestimmt, war in der Referenz und in der Probe N3-5 nur zu 0,02% enthalten. Der 9,3%ige Mindergehalt an HI-6 in der gleichen Probe mußte von gebundenem Wasser herrühren.



HI-6 DMS, Referenz | HI-6 DMS, native N3-5 Form

Abb. 7-3
Mikroskopische Bilder verschiedener HI-6 Kristallformen; identische Vergrößerung: 10x10.

Hygroskopische Grenzfeuchte

Mit der Erfahrung, daß sich HI-6 DMS in hoher Luftfeuchte hygroskopisch verhielt, wurden die dahingehenden Eigenschaften beider Salze untersucht.

Die Ergebnisse der Hygrostatenversuche zeigten, daß HI-6 2Cl bis zu 90% r. F. nicht hygroskopisch ist. Es nahm in 202 Tagen nur 0,5% Wasser auf.

HI-6 DMS nahm unterhalb 74% r. F. bis zu 2% Wasser auf. Bei 81-84% r. F. bildete sich ein Plateau mit plus 40% Wasser aus, die Kristalle lösten sich aber noch nicht auf. Ein solches Verhalten kann auf die Bildung von Hydraten hinweisen (Stahl 1980), was analog des schon vorliegenden HI-6 2Cl Monohydrates nichts ungewöhnliches wäre.

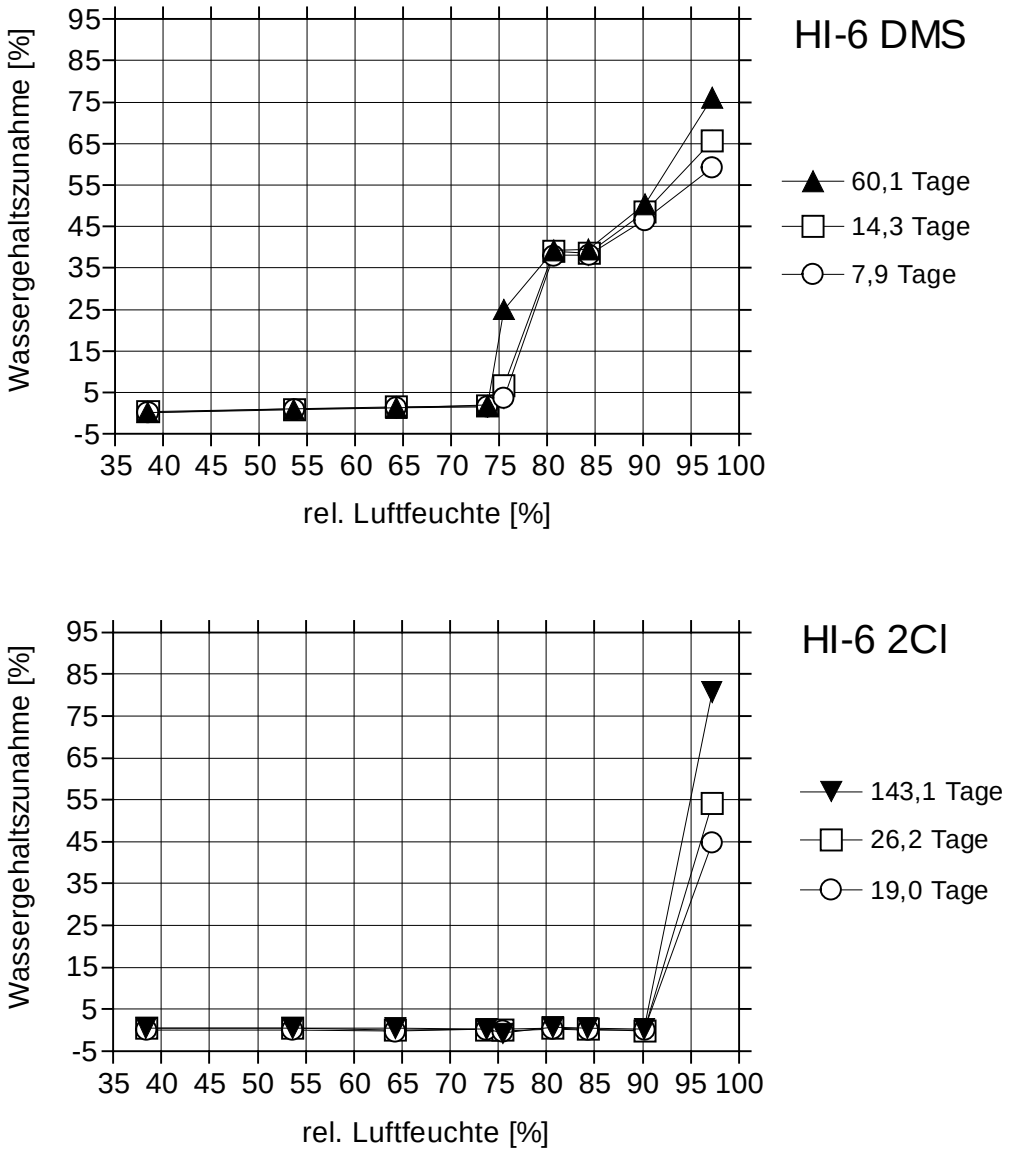


Abb. 7-4: Isotherme Feuchtediagramme bei 25 ± 1°C für beide HI-6 Salze.

Zur exakten Bestimmung der hygroskopischen Grenzfeuchte, ab der sich das Salz im aufgenommenen Wasser löst, mußte auf das Verfahren nasser Salze mit einem Luftfeuchtemeßgerät zurückgegriffen werden (Stahl 1980):

Tabelle 7-7
Hygroskopische Grenzfeuchte bei 25°C.

Salz	Soll (% r. F.)	Ist (% r. F.)	Meßtemperatur °C
Natriumchlorid	75 (25°C) *)	72	25,2
HI-6 2Cl (STI S/02/94)	-	92	24,8
HI-6 DMS (1099-1, 355-101 µm)	-	74	25,2

*) Stahl 1980. Unsicherheit der Messungen: ± 0,5°C; ± 3% r. F..

Curriculum Vitae

Am 27.09.1959 in München geboren, als Sohn von Juliane Hartwich und Wilhelm Hartwich.

1965 - 1980:
Schulausbildung in der Rotbuchenschule, München, und im Albert-Einstein Gymnasium, München. Zivildienst im Deutschen Herzzentrum des Freistaates Bayern, München.

1980 - 1985:
Studium der Lebensmittelchemie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München. Studentische Hilfskraft im Max-von-Pettenkofer Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

1985 - 1989:
Fortführung des elterlichen Betriebes: Entwicklung und Herstellung von kosmetischen Mitteln, Entwicklung und Vertrieb von Nahrungsergänzungsmitteln und freiverkäuflichen Arzneimitteln. Anschließend Beratungstätigkeit.

1989 - 1990:
Abschluß zum staatlich geprüften Lebensmittelchemiker am Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern, Oberschleißheim.

1991 - 1996:
Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München. Pharmazie-praktikum u. a. in der Pharmazeutischen Entwicklung der Hexal-Pharma GmbH, Holzkirchen. Approbation, danach Vertretungstätigkeit in diversen Apotheken.

1996 - 1999:
Qualifikation zum Herstellungs- und Kontrolleiter gem. §15 AMG bei der Steierl Pharma GmbH, Herrsching.

1999 - 2002:
Doktorand im Arbeitskreis „Biochemische Toxikologie“ von Herrn Prof. Dr. P. Eyer am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Nebentätigkeiten seit 2000:
Sachverständiger (Pharmazie, Lebensmittelchemie) für die Dr. Graner & Partner GmbH, München, für das Labor für Pharma- und Umweltanalytik, Martinsried. Gegensach-verständiger nach § 105 AMG. Von der IHK für München und Oberbayern öffentlich bestellter und vereidigter Sachverständiger für Arzneimittel, Medizinprodukte, Lebensmittel, Kosmetika und Bedarfsgegenstände (Fragen der Abgrenzung und Qualität).

Seit Ende 2002:
Laborleiter im Labor für Pharma- und Umweltanalytik in Martinsried und weiterhin Sachverständigentätigkeit