

Department Chemie der Technischen Universität München

Darstellung und Charakterisierung phosphonylierter Oxime

Christian Dirk Karl Becker

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Th. Bach

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. H. Eckert
2. Univ.-Prof. Dr. Th. Zilker

Die Dissertation wurde am 03.12.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 09.01.2008 angenommen.

*„Der wahre und vernünftige Zweck der Wissenschaft ist,
dem menschlichen Leben Nutzen zu bringen,
es mit neuen Erfindungen und Schätzen zu bereichern“*

Ludwig Feuerbach

Meinen Eltern und meiner Schwester

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2005 bis November 2007 am Institut für Organische Chemie der Technischen Universität München betreut durch Herrn Privatdozenten Dr. H. Eckert angefertigt.

Mein Dank gilt Herrn Privatdozenten Dr. H. Eckert, der die Betreuung der vorliegenden Arbeit übernommen hat und mir nicht nur bei chemischen Problemstellungen wichtige Impulse gab und mit Rat und Tat zur Seite stand. Besonders die Hilfestellungen bei den Synthesen waren von unschätzbarem Wert.

Zahlreiche Versuche, besonders die mit Organophosphatverbindungen, wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. L. Szincz bedanken, dem langjährigen Leiter des Institutes, durch den ich die Möglichkeit zum Anfertigen der Promotion erhalten habe, und ebenso bei Herrn PD Dr. H. Thiermann, seinem Nachfolger im Amt, der meine Arbeit jederzeit unterstützt hat.

Herausheben möchte ich hier Herrn PD Dr. F. Worek, der meine Arbeiten am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr während der gesamten Zeit betreut hat und nicht nur, aber besonders, bei den enzymatischen und toxikologischen Problemen stets Rat wusste, mir den Rücken frei hielt und mir darüber hinaus ein Höchstmaß an Freiheiten für die eigene Forschung ließ.

Frau Dr. M. Koller gilt mein Dank für Ihr stets offenes Ohr, egal mit welchen Fragen ich hilfesuchend vor ihrer Tür stand. Die fachliche Erörterung chemischer Themen war die Wurzel für so manche Problemlösung. Aber auch bei organisatorischen Dingen jeder Art konnte ich mich auf ihre Unterstützung verlassen. Auch bei Herrn Dr. habil. H. John möchte ich mich bedanken, da er sich stets Zeit genommen und mir viele wertvolle Tips, besonders in analytischen Belangen, gegeben hat. Frau Dr. S. Eckert, Herrn M. Blum, Herrn J. Gäb und Herrn M. Melzer gilt mein Dank für den stets guten fachlichen Austausch, Frau L. Grencner, Herrn E. Wagner, Herrn J. Rehm sowie Frau T. Hannig und Frau J. Inwich für ihre Unterstützung in diversen Laborfragen.

Darüber hinaus sei an dieser Stelle der gesamten Belegschaft des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr gedankt, die durch ein angenehmes Arbeitsklima und stete Hilfsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
B	Allgemeiner Teil	3
B.1	Phosphororganische Verbindungen.....	3
B.1.1	Bedeutung und Geschichte der phosphororganischen Verbindungen.....	3
B.1.2	Struktur der phosphororganischen Verbindungen.....	4
B.1.3	Physikalisch-chemische Eigenschaften und Abbauwege der V-Stoffe.....	6
B.1.4	Analytik der V-Stoffe und ihrer Abbauprodukte	8
B.1.5	Toxischer Wirkmechanismus	9
B.1.6	Bestimmung der Toxizität.....	11
B.1.7	Symptome einer Organophosphat-Intoxikation	14
B.1.8	Therapie einer Organophosphat-Intoxikation	15
B.2	Salze quartärer Pyridiniumoxime (Oxime)	17
B.2.1	Struktur und Synthese therapeutisch verwendeter Oxime	17
B.2.2	Syn- und anti-Isomerie und Betainbildung der Oxime	19
B.2.3	Therapeutisches Spektrum der Oxime	21
B.2.4	Abbauprodukte der Oxime	23
B.2.5	Analytik der Pyridiniumoxim-Salze und ihrer Abbauprodukte	23
B.3	Phosphylierte Oxime (POx)	24
B.3.1	Die Reaktivierungsreaktion und POx-Bildung in vivo	24
B.3.2	Zerfall der phosphylierten Oxime	25
B.3.3	Phosphylierte Oxime als Hemmstoffe der AChE	26
B.3.4	Synthese von phosphylierten Oximen.....	26
B.3.5	Analytik der phosphylierten Oxime und ihrer Abbauprodukte.....	27
C	Problemstellung.....	28
D	Ergebnisse und Diskussion.....	29
D.1	Allgemeine Betrachtungen zur Darstellung, Isolierung sowie Analytik von POx .	29
D.1.1	Mögliche Wege zur Darstellung der phosphylierten Oxime.....	29
D.1.2	Entwicklung der Analytik	30
D.1.3	Reinheitsbestimmung, Identifizierung und Quantifizierung von POx.....	34
D.2	Darstellung phosphonylierter N-Methyl- acetylpyridiniumoximiodide	35
D.2.1	Synthese der N-Methyl-acetylpyridiniumoximiodide (APO).....	36
D.2.2	Synthese von EMP-APO	38
D.2.3	Identität der EMP-APO	42
D.2.4	Quantifizierung des EMP-APO.....	43
D.2.5	Bildungskinetiken des EMP-APO in verschiedenen Reaktionsmedien	44
D.3	Darstellung phosphonylierter N-Methyl-formylpyridiniumoximiodid	46
D.3.1	Synthese der N-Methyl-formylpyridiniumoxime.....	46
D.3.2	Synthese des EMP-PAM-Iodids.....	48
D.3.3	Identität der EMP-PAM	49
D.3.4	Quantifizierung der EMP-PAM	51
D.4	Darstellung vom EMP-, n-BMP- und i-BMP-Obidoxim	51
D.4.1	Synthese des EMP-, n-BMP- und i-BMP-Obidoxim.....	51
D.4.2	Identität und Reinheit des EMP-, i-BMP- und n-BMP-Obidoxims.....	56
D.4.3	Quantifizierung des EMP-, i-BMP- und n-BMP-Obidoxims.....	59
D.4.4	Kinetische Betrachtungen	60
D.4.5	Molare Extinktionskoeffizienten der phosphonylierten Oxime	85
D.5	Hemmaktivität.....	87

D.6	Hydrolysekinetik	91
D.6.1	Messsystem	91
D.6.2	Kinetik der POx-Hydrolyse.....	93
E	Experimenteller Teil.....	96
E.1	Materialien und Geräte.....	96
E.1.1	Chemikalien und Lösungsmittel.....	96
E.1.2	Geräte und Labormaterialien.....	97
E.1.3	Pufferlösungen, Reagenzien, Enzympräparate.....	98
E.2	Methoden.....	100
E.2.1	Synthesen	100
E.2.2	HPLC-UV und LC-MS-Methoden.....	107
E.2.3	Identitätsbestimmungen	110
E.2.4	Reinheitsbestimmung	110
E.2.5	Quantifizierung.....	111
E.2.6	Kinetik der Direktreaktion von V-Stoff und Obidoxim.....	112
E.2.7	Hemmaktivität der POx gegenüber humaner AChE	112
E.2.8	Hydrolysekinetik der phosphorylierten Pyridiniumoxime	113
E.2.9	Aufnahme von UV-Spektren.....	114
F	Zusammenfassung	116
G	Literatur.....	118

Abkürzungsverzeichnis

0k	Geschwindigkeitskonstante 0. Ordnung
1k	Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung
2k	Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AF	Ammoniumformiat
ASCh	Acetylthiocholin
APO, 2-,3-,4-	Acetylpyridiniumoximiodide, 2-, 3-, 4-
BChE	Butyrylcholinesterase
CE	Collision Energy (bei MS), oder Capillar Electrophorese
CUR	Curtain Gas (bei MS)
CVX	Chinesisches VX, O-Butyl-S-[2-(diethylamino)ethyl]methylphosphonothiolat
d.Th.	der Theorie
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DP	Declustering Potential (bei MS)
DTNB	5,5`-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)
EMP-	O-Ethylmethylphosphoryl-Rest
EMPS	O-Ethylmethylphosphonsäure
EP	Entrance Potential (bei MS)
ESI	Electrospray Ionisation (bei MS)
FIA	Flow injection analysis (bei LC-MS)
Fp.	Festpunkt = Schmelzpunkt
Glu	Glutaminsäure (Aminosäure)
His	Histidin (Aminosäure)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i-BMP-	O-Isobutylmethylphosphonyl-Rest
i-BMPS	O-i-Butyl-methylphosphonsäure
IR	Infrarot-Strahlung oder Infrarotspektroskopie
IS	Ion Spray Voltage
LC	Liquid Chromatography
m/z	Masse-Ladungsverhältnis (bei MS)
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
MPS	Methylphosphonsäure
MS	Massenspektrometrie oder Massenspektrometer
n-BMP-	O-n-Butylmethylphosphonyl-Rest
n-BMPS	O-n-Butylmethylphosphonsäure
NMR	Nuclear magnetic resonanz = Kernspinresonanz
OPH	Organophosphatdihydrolase
Oxime	chemische Substanzklasse, hier besonders therapeutisch relevante
POx	phosphyliertes (phosphonyliertes oder phosphoryliertes) Oxim
Q1	Quadrupol 1 (bei MS)
Ret.	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
Ser	Serin (Aminosäure)

SIM	Selected Ion Mode (bei MS)
UV	Ultraviolette Strahlung
VR	Russisches VX
V-Stoffe	O-Isobutyl-S-[2-(diethylamino)ethyl]methylphosphonothiolat
VX	Sammelbegriff für VX, VR und CVX sowie verwandte Stoffe
	O-Ethyl-S-[2-(diisopropylamino)ethyl]methylphosphonothiolat

A Einleitung

Acetylcholin ist eine quartäre Ammoniumverbindung, die im Säugetier-Organismus als Neurotransmitter eine bedeutende Rolle spielt. So finden sich cholinerge Neurone im zentralen Nervensystem, in den Ganglien von Sympathikus und Parasympathikus und im peripheren Nervensystem an der neuromuskulären Endplatte der Skelettmuskulatur, den Erfolgsorganen des Parasympathikus sowie an den sympathisch innervierten Schweißdrüsen. Wird ein cholinerges Neuron erregt, kommt es zur Ausschüttung von Acetylcholin (ACh) in den synaptischen Spalt, das dann postsynaptisch Nerven oder Muskeln durch Aktivierung entsprechender Rezeptoren erregt.[1] Damit es nicht zu einer Überstimulation kommt, muss die Signalübertragung limitiert werden. Dies geschieht durch Spaltung des ausgeschütteten Acetylcholins durch das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) in Acetat und Cholin, welches keine Stimulation der Rezeptoren mehr bewirkt. Der Abbau des Substrates erfolgt mit einer sehr hohen Umsetzungsrate von bis zu 10^4 Molekülen pro Sekunde.[2] Acetylcholinesterase ist entwicklungsgeschichtlich ein sehr altes Enzym. Es findet sich im Menschen und diversen Säugetierspezies wie auch in vielen anderen vertebraten Organismen, so z.B. im Zitteraal (*Electrophorus electricus*) oder im kalifornischen Zitterrochen (*Torpedo californica*), wo Acetylcholin für das Auslösen der elektrischen Impulse verantwortlich ist. Aber auch in Insekten spielt ACh eine wichtige Rolle, weshalb auch in diesen Lebewesen AChE zu finden ist.[3;4]

Störungen im Acetylcholin-Stoffwechsel werden beim Menschen für bestimmte Krankheitsbilder verantwortlich gemacht. So scheint bei neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson ein Mangel an Acetylcholin vorzuliegen .[5]

Im Gegensatz dazu führen Vergiftungen mit Substanzen aus den Gruppen der Carbamate und der Organophosphate (hier vereinfachend als Überbegriff für Derivate der Phosphor-, Posphon- und Phosphinsäure verwendet) zu einem Überangebot an Acetylcholin im synaptischen Spalt cholinerges Neurone. Der Grund hierfür ist eine Hemmung des Enzyms Acetylcholinesterase durch Übertragung des Carbamoyl- oder Phosphylrestes (hier zusammenfassend für Phosphoryl-, Phosphonyl- und Phosphinylrest) auf deren aktives Zentrum. Das Enzym ist danach nicht mehr in der Lage, ausgeschüttetes Acetylcholin zu inaktivieren. Dadurch kommt es zu Übererregungen der zentralen und peripheren Nerven und ihrer Erfolgsorgane sowie der Skelettmuskulatur. In der Folge treten als charakteristische

Symptome Sekretorrhoe vor allem der Augen, der Nase, der Bronchien und der Schweißdrüsen auf, schwerere Vergiftungen können über Schwindel, Bewusstseinsverlust, periphere und zentrale Krämpfe und letztlich Atemlähmung bis zum Tode führen.[6;7]

Bekannteste Vertreter der Organophosphate sind Pestizide wie das Paraoxon (E 600) sowie dessen Thio-Variante Parathion (E 605), aber auch als Nervenkampfstoffe bezeichnete Substanzen, wie z.B. Tabun, Sarin, Soman und VX.[8]

Die Behandlung eines mit Organophosphaten Vergifteten besteht gegenwärtig zum einen in der Gabe von Atropin, einem Anticholinergikum, das durch Besetzen des Acetylcholinrezeptors die Wirkung des Acetylcholins an Muscarinrezeptoren reduziert. Diese Therapie ist als lediglich symptomatisch anzusehen.

Um eine ursächliche Behandlung durchzuführen, werden zum anderen Salze quartärer Pyridiniumoxime, im Folgenden auch als Oxime bezeichnet, eingesetzt. Diese bewirken ein Ablösen des Phosphylrestes vom aktiven Zentrum der AChE und somit eine Reaktivierung der gehemmten AChE. Bei dieser Reaktivierungsreaktion bilden die als Antidota eingesetzten Oxime und die abgelösten Phosphylreste zusammen phosphylierte Oxime.[9]

Diese bei jeder Reaktivierungsreaktion von mit phosphororganischen Verbindungen gehemmter AChE auftretenden Stoffe sind in der Lage, im Rahmen einer Rückreaktion wiederum AChE zu hemmen und somit den Therapieerfolg zu beeinträchtigen.[10-12] Um die toxische Wirkung der phosphylierten Oxime abschätzen zu können, ist u.a. die Erforschung ihrer Hemmwirkung auf humane AChE vonnöten, wozu die vorliegende Arbeit beiträgt.

B Allgemeiner Teil

B.1 Phosphororganische Verbindungen

B.1.1 Bedeutung und Geschichte der phosphororganischen Verbindungen

In den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts begann unter G. Schrader in den Laboratorien der IG Farben in Deutschland die gezielte Synthese phosphororganischer Verbindungen. Ziel war es, wirksame Pestizide zu finden. In diesem Zusammenhang wurden Derivate, meist Ester und Amide, der Phosphorsäure, Phosphonsäure und Phosphinsäure (im Folgenden zusammenfassend als Organophosphate bzw. phosphororganische Verbindungen bezeichnet) entwickelt. Auch Abkömmlinge der Thiophosphorsäure, wie beispielsweise das Parathion (E 605), entstammen dieser Forschung.[8;13]

Organophosphatverbindungen sind auch heute noch eine der wichtigsten Substanzklassen der Pflanzenschutzmittel. Heutzutage sind global über 100 Verbindungen zu diesem Zweck in der Landwirtschaft im Einsatz.[14;15] Vorteile sind die gute Wirksamkeit gegenüber Schädlingen, besonders als Insektizide, sowie die Tatsache, dass Organophosphate i.d.R. in der Umwelt schneller abbaubar sind als z.B. die ebenfalls als Pestizide eingesetzten chlorierten Kohlenwasserstoffe.

Aufgrund ihres Wirkmechanismus, der weiter unten ausführlich erläutert wird, wirken phosphororganische Verbindungen allerdings auch humantoxisch. Weltweit resultieren jährlich mehrere Millionen Vergiftungsfälle mit Organophosphaten, akzidentell und suizidal, in deren Folge mehrere hunderttausende Menschen sterben.[15] So stellen z.B. in ländlichen Gebieten Sri Lankas Vergiftungen mit Organophosphaten die häufigste Todesursache hospitalisierter Patienten in der Altersgruppe von 15-49 Jahren dar.[16;17]

Die humane Toxizität der Organophosphate ist unterschiedlich stark ausgeprägt. Neben, wie gewünscht, für den Warmblüterorganismus weniger toxischen Verbindungen für den Einsatz als Insektizide resultierten aus den Forschungen aber auch Verbindungen, die ein extrem hohes Potential schädigender Wirkung auf den menschlichen Organismus aufweisen, so zum Beispiel das Phosphorsäurederivat O-Ethyl-N,N-dimethylphosphoamidocyanidat (Tabun). Tabun wurde 1936 synthetisiert und damals als militärisch relevant eingestuft. In der Folge wurden in diesem Kontext gezielte „Optimierungen“ vorgenommen, um die humantoxische Wirkung weiter zu erhöhen. In den Jahren 1939 bis 1944 wurden so die Phosphonsäure-

Abkömmlinge Sarin (O-Isopropylmethylphosphonofluoridat) und Soman (O-Pinacolylmethylphosphonofluoridat) synthetisiert, die ihre Relevanz als sogenannte Nervenkampfstoffe traurigerweise bis heute nicht verloren haben.[8] Dies zeigt eindrücklich der Sarin-Anschlag der Aum-Shinrikyo-Sekte auf die Tokioter U-Bahn im Juni 1994.[18;19] Sarin (internationale Abkürzung GB, G für German, da in Deutschland erstmals synthetisiert), Soman (GD) und Tabun (GA) werden als so genannte G-Stoffe bezeichnet.

Auch die Alliierten forschten während des Zweiten Weltkrieges an der Entwicklung von Kampfstoffen auf Basis der Organophosphate, so z.B. dem Diisopropylfluorophosphat (DFP).[8]

Auf die Arbeiten Tammelins in den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts in Schweden gehen die sogenannten „Tammelinschen Ester“ zurück, die als Weiterentwicklung der Organophosphate in ihrer Struktur den Neurotransmitter Acetylcholin nachahmen.[20-23] Diese führten zu den nach dem Codenamen während der Entwicklung V-Stoffe genannten Verbindungen, die besonders in Großbritannien und den USA erforscht wurden.[8;20] Die Leitsubstanz dieser V-Stoffe, das O-Ethyl-S-[2-(diisopropylamino)ethyl]-methylphosphonothiolat (VX), zählt mit einer letalen Dosis von 0,07 mg/kg Körpergewicht nach perkutaner Aufnahme zu den giftigsten der bekannten Nervenkampfstoffe.[7]

B.1.2 Struktur der phosphororganischen Verbindungen

Alle als Nervenkampfstoffe oder Pestizide in diesem Kontext wichtigen phosphororganischen Verbindungen folgen einer gemeinsamen Grundstruktur, die von G. Schrader 1937 beschrieben wurde (s. Abbildung B.1-1):

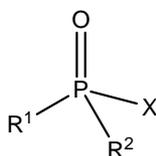


Abbildung B.1-1:

Grundstruktur der phosphororganischen Verbindungen nach Schrader.

R¹ und R² = Alkyl-, Alkoxy-, Alkylthio- oder Dialkylamid-Gruppen; X = nucleophile Gruppe

An ein pentavalentes Phosphor-Atom mit einer Doppelbindung zu einem Sauerstoffatom sind zwei Alkyl-, Alkoxy-, Alkylthio- oder Dialkylamid-Gruppen gebunden. Der doppelgebundene Sauerstoff kann auch durch ein Schwefelatom ersetzt sein.

Stellen R^1 und R^2 Alkoxy-, Alkylthio- oder Dialkylamid-Gruppen dar, handelt es sich um Phosphorsäurederivate. Ist dagegen R^1 oder R^2 eine Alkylgruppe, so liegen Abkömmlinge der Phosphorsäure vor. Sind R^1 und R^2 Alkylgruppen, leiten sich die Strukturen von der Phosphorsäure ab.

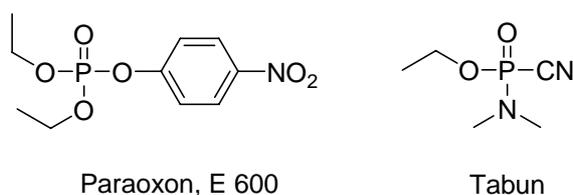
Die als Nervenkampfstoffe bekannt gewordenen Stoffe Sarin, Soman und VX stellen Phosphorsäure-Derivate dar, während sich Tabun und die meisten als Pestizide eingesetzten Substanzen von der Phosphorsäure ableiten.

Die nucleophile Gruppe X leitet sich aus Säureresten (z.B. F-, CN-) oder Alkoholen bzw. Thiolen ab.[7;8]

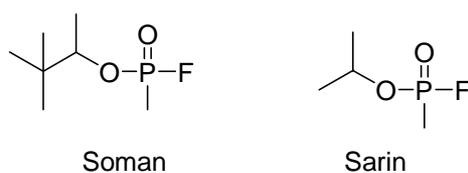
Abbildung B.1-2 zeigt die Struktur einiger phosphororganischer Verbindungen.

Von VX existieren Konstitutionsisomere, das O-Isobutyl-S-[2-(diethylamino)ethyl]-methylphosphonothiolat, als Russisches VX (VR) bezeichnet, und das O-Butyl-S-[2-(diethylamino)ethyl]methylphosphonothiolat, das Chinesische VX (CVX), benannt nach den Ländern, in denen sie entwickelt wurden. Beide Isomere weisen ein ähnlich toxisches Potenzial auf wie VX.[20;24]

Derivate der Phosphorsäure:



Derivate der Phosphonsäure:



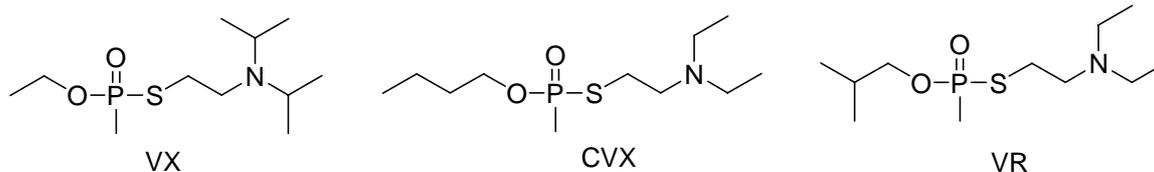


Abbildung B.1-2:

Beispiele phosphororganischer Verbindungen. In der ersten Zeile Derivate der Phosphorsäure, in der zweiten und dritten Zeile Derivate der Phosphonsäure, u.a. die drei Konstitutionsisomeren VX, CVX und VR

B.1.3 Physikalisch-chemische Eigenschaften und Abbauwege der V-Stoffe

VX (M_r 267,37) ist eine ölige Flüssigkeit mit einem amphiphilen Charakter. Die Dichte beträgt 1,008. Der Siedepunkt liegt bei 298°C, die Volatilität bei 10,5 mg/m³. [7] Über die Eigenschaften des CVX und VR liegen keine gesicherten, publizierten Daten vor.

Im wässrigen Medium kommt es zur Hydrolyse der V-Stoffe überwiegend durch nucleophile Substitution am Phosphor nach einem S_N2-Mechanismus. Dabei können folgende zwei Hauptabbauwege besprochen werden: [20;25]

1. Abspaltung des Thiols:

Hier kommt es zu einer Substitution des Diisopropylaminoethanthiols im Falle des VX bzw. des Diethylaminoethanthiols bei VR und CVX. Diese Abgangsgruppen können sehr leicht dimerisieren und bilden Bis-(2-N,N-diisopropylaminoethyl)disulfid bzw. Bis-(2-N,N-diethylaminoethyl)disulfid. Als Abbauprodukt verbleiben die Methylphosphonsäure-Derivate Ethylmethylphosphonsäure (EMPS, aus VX) bzw. Isobutylmethylphosphonsäure (i-BMPS, aus VR) bzw. n-Butylmethylphosphonsäure (n-BMPS, aus CVX). Diese können unter Abspaltung der O-Alkylreste zur stabilen Methylphosphonsäure (MPS) hydrolysieren. Da alle entstehenden Substanzen keine Hemmstoffe der AChE mehr sind, führt dieser Hydrolyseweg zu einer Entgiftung der V-Stoffe.

2. Abspaltung der Alkoxygruppe:

Wird der O-Alkylrest der V-Stoffe unter Erhalt der Thiolgruppe hydrolysiert, bilden sich neben den entsprechenden Alkoholen (Ethanol, Isobutanol bzw. n-Butanol)

Methylthiophosphonsäure-S-(2-N,N-diisopropylaminoethyl)ester (aus VX) bzw. Methylthiophosphonsäure-S-(2-N,N-diethylaminoethyl)ester (aus VR und CVX). Die entstehenden Methylthiophosphonsäureester sind toxisch, allerdings schwächer als die zugrunde liegenden V-Stoffe. Sie hydrolysieren weiter zur MPS und wie oben beschrieben zu den jeweiligen Thiolen.

Ein dritter hydrolytischer Abbauweg verläuft über eine nucleophile Substitution am C₁ der Thiol-Seitengruppe und führt zur Abspaltung des Methylthiophosphonsäure-O-ethyl- (bei VX) bzw. -O-n-butyl- (bei CVX) oder -O-isobutylesters (bei VR) und Verbleib eines Aziridinium-Ions. Letzteres reagiert weiter unter Einführung einer alkoholischen OH-Gruppe.

V-Stoffe hydrolysieren i.d.R. in sauren und neutralen wässrigen Systemen sehr langsam, die Halbwertszeit beträgt mehrere Tage bis Wochen. Erst ab ca. pH 11 kommt es zu einer schnellen Hydrolyse. Abbauweg 2 tritt fast nur im alkalischen Bereich (pH 7-11) auf.[7;20]

Die Hydrolyse nach Weg 1 unter Abspaltung der Abgangsgruppe kann durch bestimmte Enzyme, gewonnen aus unterschiedlichsten Organismen, katalysiert werden. Diese Enzyme zählen zu den Phosphorsäuretriestere-Hydrolasen (EC 3.1.8) von denen man zwei Untergruppen unterscheiden kann: Organophosphat Hydrolasen (EC 3.1.8.1) und Diisopropylfluorophosphatasen (EC 3.1.8.2). Während die DFPase aus dem Tintenfisch das Leitenzym der Diisopropylfluorophosphatasen darstellt und i.d.R. zweiwertiges Calcium im Zentrum gebunden hat, ist der wichtigste Vertreter der ersten Gruppe die Organophosphat-Hydrolase (OPH) aus dem Bakterium *Pseudomonas diminuta*. Organophosphat-Hydrolasen zeichnen sich durch ein enzymatisches Zentrum aus zwei Metallen aus. Beide Gruppen zeigen ein ähnliches, aber nicht identisches Spektrum an Substanzen, die so einer Hydrolyse zugänglich sind.[26-33]

Neben der Hydrolyse sind auch oxidative Abbauwege bekannt, auf die hier nicht weiter eingegangen wird.[20;34]

Der Metabolismus des freien Organophosphates im Körper führt analog Hydrolyseweg 1 zunächst zu EMPS und Diisopropyl- bzw. Diethylaminoethanthiol. Diese Thiole werden dann

durch das Enzym Thiol-S-Methyl-Transferase zum entsprechenden Methylether metabolisiert.[20;35-37]

B.1.4 Analytik der V-Stoffe und ihrer Abbauprodukte

V-Stoffe und ihre Metaboliten können aufgrund mangelnder Chromophore in ihrer Struktur nicht mit ultravioletter Strahlung interagieren und sind deshalb nicht über einen UV-Detektor nachweisbar. Die Analyse der reinen V-Stoffe ist aber per Massenspektrometrie (MS) möglich sowohl in Kombination mit Gas- (GC) als auch Flüssigkeitschromatographie (LC) .[37-44]

Die Phosphonsäure-Derivate wie auch die Methylthiophosphorsäureester als Abbauprodukte der V-Stoffe sind hingegen so polar, dass eine Analyse via GC-MS nur nach Derivatisierung, z.B. zu ihren Pentafluorobenzylestern, in Frage kommt.[45] Ein Nachweis mittels LC-MS ist hingegen auch underivatisiert möglich.[39;46]

Die chromatographischen Trennungen konnten auf Reversed-Phase-Säulen mit Acetonitril- oder Methanol-Wasser-Gemischen unter Zusatz von Säuren erreicht werden.

Ellis-Steinborner et al. klärten für V-Stoffe detailliert die Struktur der bei der Ionisierung mittels Electro-Spray-Ionisation (ESI) entstehenden Fragmente auf und D'Agostino et al. führten für 15 Jahre altes VX aus wässriger Lösung eine flüssigkeitschromatographische Trennung mit massenspektrometrischer Detektion durch, fragmentierten die Peaks mittels Electro-Spray-Ionisation (ESI) und charakterisierten die entstandenen Strukturen.[39;43] Neben unverändertem VX wurden 37 weitere Peaks gefunden. Die wesentlichen bestätigen die o.a. Abbauege des VX: EMPS und Bis-[2-diisopropylaminoethyl]disulfid. Daneben waren zahlreiche unterschiedliche Polymerisate der Thiol-Abgangsgruppe zu finden. Es entstanden offensichtlich nicht nur Dimere. Interessanterweise war ebenfalls ein Kondensationsprodukt der EMPS zu finden, das Diethyldimethylpyrophosphat. Auch das toxische Abbauprodukt des VX Methylthiophosphonsäure-S-(2-N,N-diisopropylaminoethyl)ester war nachweisbar.[39]

Die Verwendung von Capillar-Electrophorese (CE) in Kombination mit indirekter Laser-induzierter Fluoreszenz erlaubt den Nachweis von Phosphonsäurederivaten.[47] Diese Technologie angewendet auf Microchips ist in Kombination mit CE zum Nachweis von Organophosphaten und ihrer Abbauprodukte geeignet.[48-52]

Für V-Stoffe wurden Kernspinresonanz-Analysen (NMR) durchgeführt. Auch Phosphonsäure-Derivate wurden per ^{31}P und ^1H -NMR-Spektroskopie nachgewiesen.[53]

Weiterhin sind verschiedene colorimetrische Nachweise von Organophosphaten nach Umsetzung mit Reagenzien publiziert.[54-56] Poziomek et al. und Saville beschreiben den Nachweis von Cyanid, das sich nach der Umsetzung von phosphororganischen Verbindungen mit α -Ketoximen durch Zerfall bildet.[57;58]

V-Stoffe, wie auch andere Organophosphate, können zusätzlich biologisch durch ihre Hemmwirkung auch das Enzym Acetylcholinesterase nachgewiesen werden, wie im Folgenden erläutert wird.

B.1.5 Toxischer Wirkmechanismus

Aus dem Magen-Darm-Trakt, über die Atemwege, Haut oder Schleimhäute in den menschlichen Körper aufgenommene Organophosphate verteilen sich im Organismus und können mit verschiedenen Strukturen in Wechselwirkung treten.

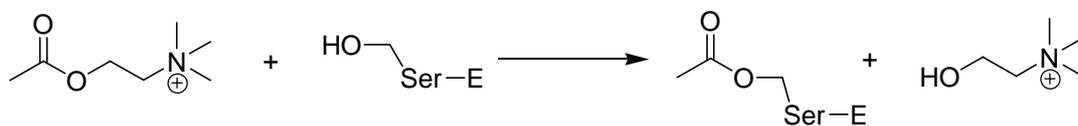
Die starke toxische Wirkung wird durch Inhibition des Enzyms Acetylcholinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7) bedingt. AChE gehört zu der Gruppe der Serin-Hydrolasen. Die wesentliche physiologische Bedeutung besteht in der Inaktivierung des Neurotransmitters Acetylcholin (ACh) durch Spaltung in Acetat und Cholin.[3]

In cholinergen Neuronen, d.h. in Neuronen, deren Erregungsweiterleitung über ACh funktioniert, wird ACh aus Cholin durch Übertragung eines Acetyl-Restes von Acetyl-CoenzymA gebildet und in Vesikeln gespeichert. Eine Erregung des Neurons führt dann zu einer Ausschüttung des ACh in den synaptischen Spalt. Das ACh bewirkt postsynaptisch über Wechselwirkung mit Acetylcholinrezeptoren eine Aktivierung der Effektorzelle.[59]

Um eine Übererregung der Effektorzellen zu vermeiden, muss die Wirkdauer des ACh limitiert werden. Dies geschieht durch raschen hydrolytischen Abbau des ACh zu Cholin und Acetyl. Dieser wird durch das Enzym AChE katalysiert.[60]

AChE findet sich überwiegend im zentralen und peripheren Nervensystem, aber auch in anderen Strukturen des Körpers, z.B. gebunden an die Membranen der Erythrocyten. AChE besteht aus mehreren Untereinheiten. Das katalytische Zentrum wird von den Aminosäuren Serin (Ser^{203}), Histidin (His^{447}) und Glutaminsäure (Glu^{334}) gebildet und liegt am Ende einer ca. 20Å in das Enzym hineinreichenden Tasche.[2]

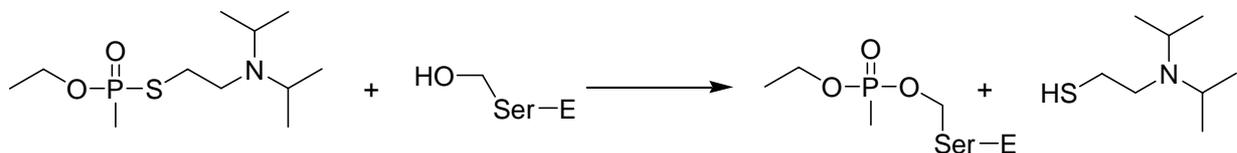
Benachbart zu dieser katalytischen Triade bildet die Aminosäure Tryptophan (Trp⁸⁶) ein elektronenreiches Zentrum. Acetylcholin dringt in die Tasche ein und lagert sich mit seiner Trimethylammoniumgruppe an das elektronenreiche Zentrum an. Dadurch wird es sterisch so ausgerichtet, dass eine optimale Wechselwirkung mit dem katalytischen Zentrum ermöglicht wird. Bei der Spaltung des Acetylcholins wird nun zunächst der Acetylrest auf die Hydroxylgruppe des Serins im aktiven Zentrum übertragen. Histidin und Glutaminsäure unterstützen diesen Vorgang durch Bildung von Wasserstoffbrücken. In einem zweiten Schritt wird dann der Acetylrest vom Serin abgelöst, das Enzym ist wieder funktionsfähig.[60] Schema B.1-1 stellt vereinfacht die Acetylierung des Serins des aktiven Zentrums dar.



Schema B.1-1:

Acetylierung des Serins im aktiven Zentrum der AChE durch Reaktion mit ACh. Dies führt zur Spaltung des natürlichen Substrates zu dem physiologisch inaktiven Cholin.

Organophosphat-Verbindungen treten ebenfalls mit den genannten Strukturen der AChE in Wechselwirkung. Die Serin-OH-Gruppe des aktiven Zentrums greift dabei nucleophil am Phosphoratom des Organophosphats an. So kommt es zu einer Abspaltung der nucleophilen Gruppe, der sogenannten Abgangsgruppe, und zu einer Übertragung des Phosphylrestes auf das Serin des aktiven Zentrums, wie in Schema B.1-2 dargestellt. An dieser Stelle sei noch einmal auf die strukturelle Ähnlichkeit zwischen VX und Acetylcholin hingewiesen, wie aus den Reaktionsschemata hervorgeht.



Schema B.1-2:

Phosphonylierung des Serins im aktiven Zentrum der AChE durch den Nervenkampfstoff VX.

Im Gegensatz zur Acetylierung bei der Spaltung von ACh ist die Phosphorylierung der AChE ein fast irreversibler Vorgang, d.h. der Phosphylrest kann nicht leicht hydrolytisch abgelöst

werden. Durch die Phosphorylierung verliert die AChE ihre Fähigkeit, ACh zu spalten. Eine Übererregung der postsynaptischen Zellen ist die Konsequenz.[60]

Potente Hemmstoffe der AChE zeichnen sich durch eine leicht abspaltbare Abgangsgruppe aus. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass je höher der Elektronenzug der anderen Gruppen am Phosphor ist, sich umso leichter die Abgangsgruppe abspalten lässt. So sind z.B. Organophosphate aufgrund der höheren Elektronegativität des Sauerstoffes bessere Hemmstoffe als Organothiophosphate. Darüber hinaus nehmen die Seitenketten Einfluss, je nach ihrer Stereochemie bzw. ihrer hydrophoben oder ionischen Eigenschaften.[61]

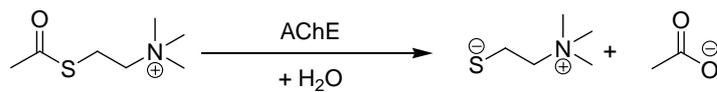
B.1.6 Bestimmung der Toxizität

Die Toxizität der Organophosphate lässt sich über tierexperimentell für verschiedene Aufnahmewege (z.B. oral, perkutan, intravenös) ermittelte letale Dosen, bei denen die Hälfte des untersuchten Kollektivs innerhalb einer festgelegten Zeit verstirbt (LD_{50}), beschreiben. Bei inhalativer Exposition wird das letale Konzentrations-Zeitprodukt herangezogen, d.h. die innerhalb einer bestimmten Expositionszeit zum Tode führende Konzentration (LCt_{50}).

Um Tierversuche zu vermeiden und isoliert die Wirkung der Organophosphate auf das Enzym Acetylcholinesterase untersuchen zu können, kann man *in vitro* die Enzymaktivität der AChE ohne und dann unter Anwesenheit des Organophosphates erfassen.

Die Enzymaktivität wird über die so genannte Ellman-Reaktion messbar, die in Schema B.1-3 gezeigt wird:

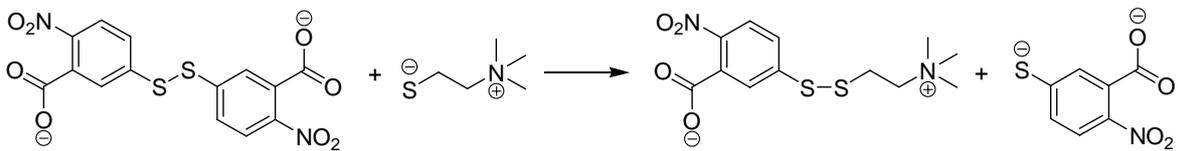
Das native Substrat Acetylcholin (ACh) wird durch das Thio-Derivat Acetylthiocholin (ASCh) ersetzt. Dieses wird von AChE analog dem ACh in Acetat und Thiocholin gespalten. Das so entstehende Thiocholin kann mit 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) versetzt werden. Aufgrund des höheren Redoxpotentials des DTNB gegenüber dem Thiocholin kommt es zu dessen Oxidation unter Bildung eines gemischten Disulfids. Aus DTNB entsteht dabei bei physiologischem pH-Wert das 2-Nitro-5-thiobenzoat, ein Anion, das sich im Bereich von 412 nm bzw. 436 nm im Photometer nachweisen lässt.[62] Auf diese Weise kann die Zunahme der Absorption mit der Zeit gemessen werden. Die Absorptionzunahme ist proportional der Menge an gebildetem Thiocholin und somit proportional der Aktivität des Enzyms. Diese leitet sich folglich aus der Steigung der gemessenen Absorptionskurve ab.[63;64]



Acetylthiocholin

Thiocholin

Acetat

5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)
(DTNB)

gemischtes Disulfid

2-Nitro-5-thio-
benzoat**Schema B.1-3:**

Die Ellman-Reaktion verläuft in zwei Schritten. Zunächst wird Acetylthiocholin von AChE zu Thiocholin und Acetat gespalten. In einem zweiten Schritt reagiert dann das gebildete Thiocholin mit dem Reagenz DTNB unter Bildung eines gemischten Disulfids und eines farbgebenden Benzoats.[62]

Ist die Grundaktivität des Enzyms auf o.g. Weise bestimmt worden, kann die AChE mit phosphororganischen Substanzen versetzt und die Abnahme der Aktivität in Abhängigkeit von Konzentration und Einwirkzeit des Organophosphates bestimmt werden.

Zwei Versuchsdesigns werden prinzipiell angewendet:

a) Diskontinuierliche Methode:

Hier wird eine bestimmte Menge Enzym mit einer definierten Konzentration Organophosphat inkubiert und zu festgelegten Zeitpunkten eine Probe genommen und in einer Küvette mit den o.g. Reagenzien in Kontakt gebracht. Die Zunahme der Absorption wird über einen Zeitraum von i.d.R. 1 min gemessen. Die aus dem resultierenden Graphen ermittelte Steigung ist die Hemmkonstante der Substanz bei gegebener Konzentration. Um die Geschwindigkeit der Hemmung unabhängig von der jeweiligen Konzentration des Organophosphates zu ermitteln, wird diese durch die OP-Konzentration geteilt. So erhält man analog der Formel

$$k_i = \frac{1}{[OP]t} \ln \frac{v_o}{v_t}$$

die molare Hemmkonstante (k_i), also die molare Geschwindigkeitskonstante, mit der eine Hemmung der AChE eintritt, wobei $[OP]$ die anfängliche Konzentration des getesteten Organophosphates und v_0 und v_t die Reaktionsgeschwindigkeiten zu Beginn und zum Zeitpunkt t darstellen.[65]

Je größer die Konstante, desto schneller die Hemmung der AChE und desto giftiger die Organophosphat-Verbindung. I.d.R. wird die Bestimmung mit mehreren verschiedenen Konzentrationen an Organophosphat durchgeführt.

b) Kontinuierliche Methode

Hier wird das Enzym bereits von Anfang an in eine Küvette gegeben, die Puffer und DTNB enthält. Nach Zugabe von ASCh wird die Reaktion gestartet und über einen längeren Zeitraum verfolgt, bis die entstehende Kurve in ein Plateau übergeht. Man verfolgt also den Reaktionsverlauf durch kontinuierliche Messung und nicht durch Vermessen von Stichproben nach verschieden langer Inkubationszeit. Auch hier werden mehrere Konzentrationen des Organophosphates untersucht. Die resultierenden Kurven sind nicht über oben genannte Formel auswertbar. Stattdessen liefert die Anwendung der Formel von Forsberg und Puu lineare Zusammenhänge und k_2 wird bestimmbar:[66]

$$\frac{\Delta t}{\Delta \ln v} = \frac{K_d}{k_2} \cdot \frac{1}{[IX](1-\alpha)} + \frac{1}{k_2}$$

(Formel nach Forsberg und Puu)

K_d stellt die Dissoziationskonstante und somit ein Maß für die Geschwindigkeit des Zerfalls des phosphorylierten Enzyms, k_2 die unimolekulare Phosphorylierungskonstante und $[IX]$ die Organophosphatkonzentration dar. α setzt sich aus der Enzymkonzentration und der Michaelis-Menten-Konstante zusammen wie aus der Formel

$$\alpha = [S]/(K_m + [S])$$

mit $[S]$ als Substratkonzentration (ASCh) und K_m als Michaelis-Menten-Konstante ersichtlich. $1/k_1$ gegen $1/[IX](1-\alpha)$ aufgetragen ergibt eine Gerade, deren Steigung k_i , der Hemmkonstante zweiter Ordnung entspricht.

Für diese Testungen kann AChE verschiedener Genese genutzt werden. Entweder wird gereinigte AChE meist bovinen Ursprungs oder vom Zitteraal verwendet. Eine weitere Quelle

stellt die an die Membranen von Erythrocyten gebundene AChE dar. Durch Blutentnahme und Präparation sogenannter Erythrocyten-Geister (entkernte Erythrocyten) besteht ein einfacher Zugang auch zu menschlicher AChE. Die Generierung humaner Daten ist von besonderer Wichtigkeit, da eine Übertragbarkeit der Ergebnisse von Versuchen mit anderen Spezies auf den Menschen nicht immer gegeben ist.[24;67]

Dass die über dieses Modell in vitro unter Verwendung erythrocytengebundener AChE gewonnenen Hemmkonstanten verlässliche Parameter für die Abschätzung der Toxizität von Organophosphaten im menschlichen Körper darstellen, wurde durch Korrelation mit klinischen Daten gezeigt.[15;68]

B.1.7 Symptome einer Organophosphat-Intoxikation

Cholinerge Neurone finden sich im zentralen Nervensystem, in den Ganglien von Sympathikus und Parasympathikus und im peripheren Nervensystem an der neuromuskulären Endplatte der Skelettmuskulatur, den Erfolgsorganen des Parasympathikus sowie den sympathisch innervierten Schweißdrüsen. Es werden zwei Arten von ACh-Rezeptoren unterschieden, muskarinische und nikotinische Rezeptoren. Die Benennung erfolgte nach den Alkaloiden Muscarin und Nikotin, die isoliert nur den jeweiligen Rezeptortyp erregen. Man unterscheidet von beiden Rezeptortypen noch weitere Subtypen.

Muscarinische Rezeptoren finden sich überwiegend im zentralen Nervensystem sowie postganglionär an den Erfolgsorganen des Parasympathikus und den sympathisch innervierten Schweißdrüsen, d.h. an der glatten Muskulatur und sekretorischen Organen. Nikotinische Rezeptoren hingegen vermitteln Wirkung im zentralen Nervensystem, in den Ganglien des Parasympathikus und Sympathikus sowie an der neuromuskulären Endplatte der Skelettmuskulatur.

Die aufgrund der AChE-Hemmung übermäßige Konzentration an ACh im synaptischen Spalt führt zum klinischen Bild einer cholinergen Krise. Die wesentlichen Symptome sind in Tabelle B.1-1 zusammengestellt.[7;69;70]

Tabelle B.1.1:

Klinische Symptome einer Organophosphatvergiftung [7]

Peripher			
Nicotinisch	Muskarinisch		
Quergestreifte Muskulatur	Glatte Muskulatur	Sekretion	Herz
<ul style="list-style-type: none"> • Muskelschwäche • Faszikulationen • Krämpfe • Periphere Atemlähmung 	<ul style="list-style-type: none"> • Miosis u. Akkommodationsstörungen • Magen-Darm-Krämpfe • Entleerung von Blase und Darm • Bronchokonstriktion 	<ul style="list-style-type: none"> • Tränenfluss • Schweißsekretion • Nasenlaufen • Speichelfluss • Harndrang • Bronchorrhoe 	<ul style="list-style-type: none"> • Bradykardie
Zentral: Unruhe, Verwirrung, Krämpfe, Schwäche, Atemlähmung			

Die sekretorischen Symptome können gut diagnostisch gedeutet werden. Lebensgefahr droht durch zentrale Atemlähmung, Lähmung der peripheren Atemmuskulatur sowie durch eine Bronchorrhoe, die zu einem Fluten der Lunge mit Bronchialsekret und Ersticken führt.

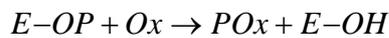
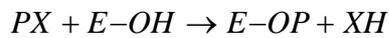
B.1.8 Therapie einer Organophosphat-Intoxikation

Die Vergiftung mit Organophosphaten, speziell mit Nervenkampfstoffen, ist ohne Therapie vielfach tödlich. Als symptomatische Therapie kann das Anticholinergikum Atropin gegeben werden, das kompetitiv zum ACh als Antagonist die muscarinischen Rezeptoren besetzt und somit der Übererregung der Nerven begegnet.[15;60]

Die spontane Hydrolyse der Bindung zwischen Organophosphatrest und Serin des aktiven Zentrums der AChE geht sehr langsam vonstatten, besonders bei Vergiftungen mit starken Hemmstoffen wie den Nervenkampfstoffen. Physiologisch ist deshalb von einer irreversiblen Phosphorylierung der AChE auszugehen.[65]

Durch Gabe von Oxim-Verbindungen kann hingegen über einen nucleophilen Angriff der Oximgruppe am Phosphoratom des Organophosphatrestes eine Ablösung desselben von der Seringruppe des esteratischen Zentrums erreicht werden. Die Acetylcholinesterase kann ihre

Funktion wieder erfüllen und ACh spalten. Oxime stellen also eine kausale therapeutische Option dar. Schema B.1-4 stellt diesen Sachverhalt in vereinfachten Formeln dar.

**Schema B.1-4:**

Obere Zeile: Übersichtsschema über die Reaktion von Organophosphat (PX, wobei X die Abgangsgruppe darstellt) mit dem Enzym AChE (E-OH, wobei OH für die Hydroxylgruppe des Serins im aktiven Zentrum steht) zum phosphorylierten Enzym (E-OP).

Untere Zeile: Schematische Darstellung der Reaktivierungsreaktion des gehemmten Enzyms durch ein Oxim (Ox), was zum phosphorylierten Oxim (POx) führt.

Alterung

In Abhängigkeit von der Struktur des Organophosphatrestes, mit dem die AChE inaktiviert wurde, ist eine Reaktivierung mit Oximen nur innerhalb eines bestimmten Zeitfensters möglich. Danach kann der Phosphylrest nicht mehr vom Enzym abgelöst werden. Grund hierfür ist eine Umwandlung der Struktur des Organophosphatrestes am Enzym. Es kommt zu einer Abspaltung eines Molekülteils in Form einer Dealkylierung unter Bildung eines Carbeniumions. Der verbleibende Rest ist dann einer nucleophilen Substitution nicht mehr zugänglich.[71-74]

Die Geschwindigkeit der Alterung zeigt Abhängigkeit von der Stärke des positiven induktiven Effekts, den die Alkylgruppe ausübt.[75] Soman-gehemmte AChE altert mit einer Halbwertszeit von ca. sechs Minuten, während das Fenster zu einer therapeutischen Reaktivierung bei VX größer ist (Alterungshalbwertszeit ca. 36 h).[65]

Oxime stellen also prinzipiell eine wirksame Therapieoption dar, die jedoch auch Einschränkungen unterliegt. Zum Einsatz kommen z. Zt. ausschließlich Salze von Pyridiniumoximen unterschiedlicher Struktur.

B.2 Salze quartärer Pyridiniumoxime (Oxime)

B.2.1 Struktur und Synthese therapeutisch verwendeter Oxime

Allen therapeutisch eingesetzten Oximen ist eine Pyridinium-Grundstruktur gemeinsam. Die Leitsubstanz Pralidoxim (2-PAM; 2-Pyridinaldoximmethiodid; 2-Formyl-1-methylpyridiniumoximiodid) wurde in den 50er Jahren in den USA entwickelt. Von den möglichen Stellungsisomeren 2-, 3- und 4-Formyl-1-methylpyridiniumoximiodid (2-, 3- und 4-PAM) hat sich therapeutisch das 2-PAM durchgesetzt.[76-78] Einen therapeutischen Fortschritt stellte die Synthese zweikerniger Bispyridinium-Oxime durch Lüttringhaus und Hagedorn in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts dar. Diese zeigen im Allgemeinen eine bessere Reaktivierungsleistung.[79;80] Unter diesen hat das Obidoxim (N,N-Dimethylenoxid-bis-(pyridinium-4-aldoxim)dichlorid) eine besondere Bedeutung erlangt. Während nach wie vor 2-PAM im anglo-amerikanischen Raum als Therapie-Standard gilt, ist Obidoxim heute das wichtigste therapeutische Oxim bei Organophosphatvergiftungen in Europa.[15] Abbildung B.2-1 zeigt die Strukturformeln der stellungsisomeren PAM und des Obidoxims.

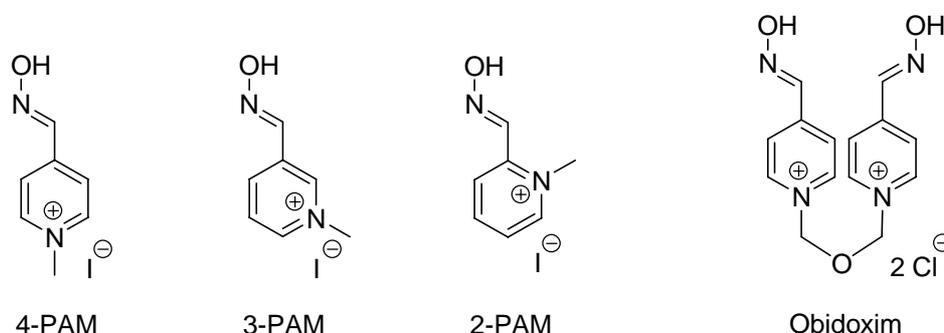


Abbildung B.2-1:

Strukturformeln der 2-, 3- und 4-Formyl-1-methylpyridiniumiodide (PAM) sowie des (N,N-Dimethylenoxid-bis-(pyridinium-4-aldoxim)dichlorids) (Obidoxim).

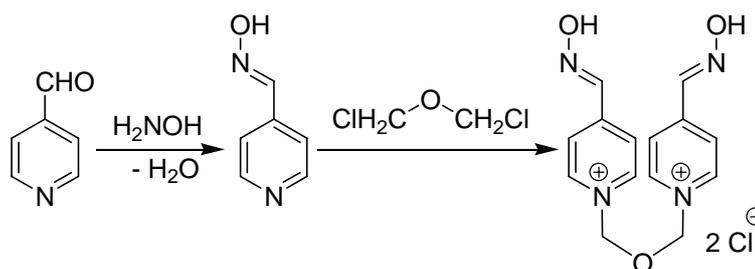
Wie Röntgenstruktur-Analysen und Molecular-Modeling zeigten, liegen Obidoxim und andere Bispyridinium-Verbindungen in einer gestreckten Form vor.[81-83] In der vorliegenden Arbeit wird allerdings die in Abbildung B.2-1 gezeigte Form bevorzugt, die auch in vielen Publikationen verwendet wird. So können die Oximgruppen platzsparend und übersichtlich dargestellt werden.

Synthese von PAM

Die Synthese des Pralidoxims beginnt mit der Bildung von 2-Pyridincarboxaldehydoxim durch Umsetzung einer wässrigen Lösung des 2-Pyridincarboxaldehyds mit neutralisierter Lösung des Hydroxylamins und Auskristallisieren des Produktes. Anschließend werden durch Reaktion mit Methyljodid in organischem Lösungsmittel (Ethanol, Nitrobenzen) unter Erwärmen die quartären Pyridiniumoximiodide gewonnen. Alternativ dazu kann auch erst der Pyridincarboxaldehyd methyliert und dann die Oximgruppe eingeführt werden.[77;84]

Synthese von Obidoxim

In Analogie hierzu erfolgt die Synthese des zweikernigen Obidoxims ausgehend vom 4-Pyridincarboxaldehydoxim. Zwei Moleküle hiervon werden durch Zutropfen von Bischlormethylether in Chloroform über die Stickstoffatome der Pyridinringe unter Bildung der Pyridiniumverbindungen verknüpft (s. Schema B.2-1).[79] Da der Bischlormethylether aufgrund seiner Fähigkeiten zum Cross-linking von DNA-Strängen ein extrem canzerogenes Agens darstellt und der Umgang damit bedenklich ist, wurde ein alternativer Weg zur Bildung der Etherbrücke zwischen den beiden Pyridinringen durch Verwendung des Bis(methylsulfonylmethyl)ethers beschrieben.[85]



Schema B.2-1:

Syntheseweg des Obidoximdichlorides ausgehend vom Pyridin-4-carboxaldehyd, der zunächst durch Umsetzen mit Hydroxylamin zum Oxim reagiert. Anschließend werden zwei dieser Pyridinoxime über Bischlormethylether unter Quartärnierung des Ring-Stickstoffes zum Obidoxim verknüpft.

Es sind unzählige Variationen der Pyridiniumoxime synthetisiert worden, die sich in der Zahl und Stellung der Oximgruppen und der möglichen Substituenten am Pyridiniumring und den Seitenketten unterscheiden, sowie in der Struktur der Brücke zwischen den beiden Ringen im Falle der Bispyridinium-Verbindungen.

An dieser Stelle sei nur die Serie der einkernigen 1-Methyl-acetylpyridiniumketoxime genannt. Das 1-Methyl-2-acetylpyridiniumoximiodid (2-APO) oder die Stellungsisomere 1-Methyl-3-acetylpyridiniumoxim (3-APO) und 1-Methyl-4-acetylpyridiniumoxim (4-APO) wurden in Analogie zu der PAM-Serie synthetisiert, allerdings ausgehend vom 2-, 3- oder 4-Acetylpyridin, durch Umsetzung mit Hydroxylamin und Quartärnierung mit Methyljodid.[84;86] Die Strukturformeln zeigt Abbildung B.2-2.

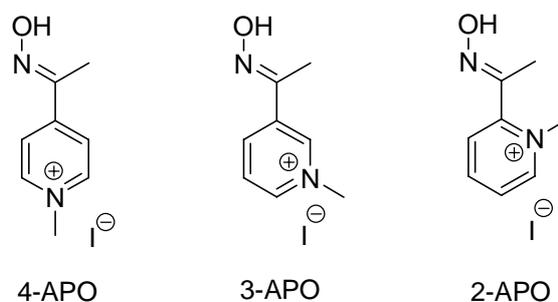


Abbildung B.2-2:

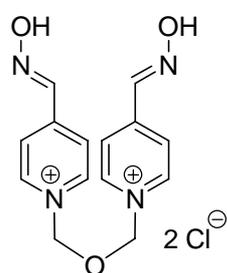
Strukturformeln der stellungsisomeren 2-, 3-, und 4-Acetylpyridiniumoximiodide

B.2.2 Syn- und anti-Isomerie und Betainbildung der Oxime

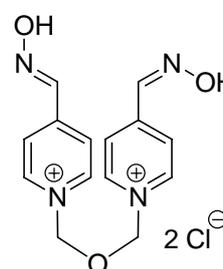
Die Oxime können aufgrund der C-N-Doppelbindung der Oxim-Gruppe in den zwei isomeren Formen syn und anti vorliegen. Beide Formen sind in wässriger Lösung ineinander umwandelbar. Ginsburg et al. beschrieben sowohl für die PAM- als auch für die APO-Reihe zwei Isomere, ohne die genaue Konfiguration zuordnen zu können. Das eine Isomer entsteht bevorzugt bei der Reaktion bereits N-methylierter Acetylpyridiniumverbindungen mit Hydroxylamin bei kalten Reaktions-Temperaturen, hat einen niedrigeren Schmelzpunkt und geht bei Raumtemperatur (RT) in das zweite Isomer über. Dieses entsteht besonders bei der Umsetzung von tertiärem Acetylpyridinoxim mit Methyljodid und zeigt deutlich höhere Schmelzpunkte und scheint auch bei RT stabil zu sein.[84]

Für das 2-PAM ist die syn-Form als die Hauptform nachgewiesen worden und für das 4-PAM ist die syn-Form in der Literatur als die reaktivere in Bezug auf Reaktivierung Sarin-gehemmter AChE beschrieben.[87-90]

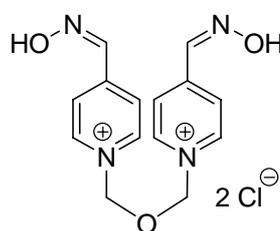
Bei den Bispyridinium-Oximen kann man aufgrund der zwei Doppelbindungen der Oximgruppen drei isomere Formen unterscheiden: syn-syn, syn-anti und anti-anti, wie in Abbildung B.2-3 zu sehen. Obidoxim liegt in frisch zubereiteter wässriger Lösung zu ca. 95% in der stabileren syn-syn-Form, zu ca. 5% in der syn-anti-Form und zu < 0,1% in der anti-anti-Form vor.[91] Leitis et al. beschreiben, dass das syn-Isomer ein zweifach besserer Reaktivator Organophosphat-gehemmter AChE sei als das anti-Isomer. Ob hier das anti-anti oder das syn-anti-Isomer gemeint ist, geht nicht hervor.[92]



Obidoxim; E,E-Form; syn-syn-Isomer



Obidoxim; E,Z-Form; syn-anti-Isomer

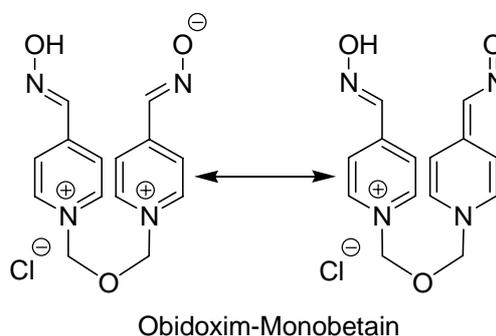


Obidoxim Z,Z-Form; anti-anti-Isomer

Abbildung B.2-3:

Strukturformeln der stereoisomeren anti-anti-, syn-anti- und syn-syn-Obidoximdichloride

Oxime sind schwache Säuren. Abhängig von Ihrem pK_a -Wert können sie bei verschiedenen pH-Werten deprotoniert vorliegen. Im Falle der quartären Pyridiniumoxime entstehen dabei Zwitterionen, sogenannte Betaine. Bei Obidoxim beträgt der $pK_{a1} = 7,61$ und der $pK_{a2} = 8,25$ (bei 25°C), das Monobetain entsteht ab ca. pH 7-8 und geht ab ca. pH 10 in das Dibetain über.[93] Bei der Betainstruktur ist die Möglichkeit zu einem intramolekularen Ladungsaustausch gegeben, wie die mesomeren Grenzstrukturen des Monobetains in Abbildung B.2-4 zeigen.[94]

**Abbildung B.2-4:**

Mesomere Grenzstrukturen des Monooximates

Monobetaine verschiedener Oxime wurden synthetisiert und der Zusammenhang zwischen Nucleophilie und Reaktivierungsleistung festgestellt.[76;79] Gute Oxim-Reaktivatoren sollten also einen möglichst niedrigen pK_a -Wert aufweisen. Die Nucleophilie allein ist aber kein Garant für einen potenten Reaktivator, vielmehr muss dieser auch erfolgreich mit der gehemmten Acetylcholinesterase in Wechselwirkung treten können.[80]

Dies äußert sich auch in der Tatsache, dass die verschiedenen Oxime AChE, die mit unterschiedlichen Organophosphaten gehemmt sind, auch unterschiedlich gut reaktivieren können. Jedes Oxim hat also Einschränkungen in seinem Wirkungsspektrum.

B.2.3 Therapeutisches Spektrum der Oxime

Nicht jedes als Antidot verwendete Oxim ist gleichermaßen gut in der Lage, phosphorylierte AChE zu reaktivieren.[65] Hier machen sich die strukturellen Unterschiede der Oxime bemerkbar. Auffällig ist, wie stark der Einfluss der Struktur des Organophosphatrestes auf das Reaktivierungsvermögen ist. Befindet sich ein elektronenreicher Molekülrest in Nachbarschaft des Phosphoratoms, wird offensichtlich dessen partiell positive Ladung dadurch so abgeschwächt, dass eine nucleophile Substitution durch das Oxim nur schwer oder gar nicht ablaufen kann. So lässt sich mit Tabun, einem Dialkylamid der Phosphorsäure, inhibierte AChE fast gar nicht reaktivieren.

Der Erfolg der therapeutisch eingesetzten Oxime in Bezug auf die Reaktivierung phosphorylierter AChE lässt sich, wie oben schon für die Hemmwirkung der Organophosphate beschrieben, in vitro mit Hilfe der Messung der AChE-Aktivität messen. Hier kommt wieder

die modifizierte Ellman-Reaktion zum Einsatz. AChE wird mit einer phosphororganischen Verbindung inkubiert und somit vorgehemmt.[67] Anschließend wird überschüssiger Hemmstoff z.B. per Dialyse entfernt. Die verbliebene Aktivität der mit Organophosphat gehemmten AChE wird bestimmt und das gehemmte Enzym dann mit Oxim zur Reaktion gebracht. Die Zunahme der Enzymaktivität wird über die Zeit verfolgt, und so kann eine Reaktivierungskinetik erstellt werden. Als Maß für die Reaktivierungsleistung eines Oxims dient die bimolekulare molare Reaktivierungskonstante (k_{r2}). Abbildung B.2-5 zeigt die Reaktivierungskonstanten verschiedener Oxime gegenüber mit unterschiedlichen Organophosphaten phosphorylierter AChE.

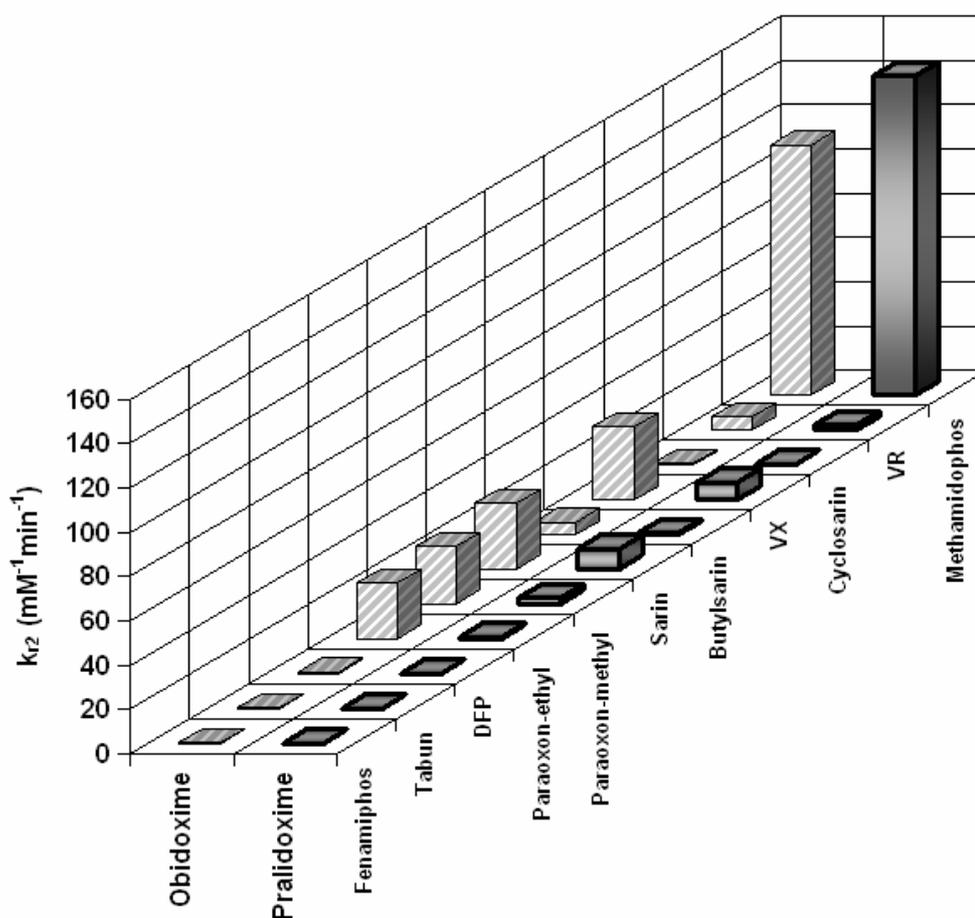


Abbildung B.2-5:

Reaktivierungskonstanten der therapeutischen Oxime Obidoxim und Pralidoxim bei der Reaktivierung von AChE, die mit verschiedenen Organophosphaten gehemmt ist (Quelle: PD Dr. F. Worek).

B.2.4 Abbauprodukte der Oxime

Bernasconi et al. beschreiben für Obidoxim in Analogie zu Untersuchungen am 2-PAM abhängig vom pH-Wert der Lösung folgende Abbau-Wege: Im Sauren Abspaltung des Hydroxylamins und Bildung des entsprechenden Aldehyds, der sich dann zur Carbonsäure umwandeln kann und im Alkalischen Bildung eines Amids aus der Oxim-Gruppe mit anschließender Umwandlung in das Nitril. Dieses wird unter Cyanid-Abspaltung zur Hydroxylgruppe und wandelt sich schließlich in das Pyridon um.[95] Ellin publizierte 1958 denselben Weg, allerdings ohne die Bildung des intermediären Amids.[96] Utey beschrieb für das 2-PAM in saurer wässriger Lösung (pH 3,2) einen Zerfall des Oxims zunächst zum Nitril und eine Umwandlung dieses über das Amid zur freien Säure. Er folgerte außerdem, dass sich in Lösung ein Gleichgewicht von syn- und anti-2-PAM einstellt und der weitere Abbau über das instabilere anti-Isomer des Pralidoxims vonstatten geht.[87] Auch die Abspaltung von Hydroxylamin und die Bildung des entsprechenden Aldehyds bzw. Ketons im Sauren finden sich in der Literatur. Spöhrer zeigt in gealterten Obidoxim-Ampullen, neben den Obidoxim-Isomeren noch das Carbonsäure-Derivat 4'-Carboxy-4-(hydroxyiminomethyl)-1,1'-oxy-dimethyldipyridiniumdichlorid (ca. 2,4%), 4-Pyridinaldoxim (< 1%), Formaldehyd und Blausäure.[91]

B.2.5 Analytik der Pyridiniumoxim-Salze und ihrer Abbauprodukte

Salze der Pyridiniumoxime weisen eine gute chromophore Struktur auf, so dass sie mit ultravioletter Strahlung in Wechselwirkung treten können. Dies erlaubt ihre einfache Detektion mittels UV-Detektor. Eine chromatographische Trennung über HPLC auf Reversed-Phase-Säulen gestaltet sich aufgrund der positiv geladenen Pyridiniumstruktur als schwierig. Sie gelingt durch Verwendung eines Ionenpaarreagenzes als Zusatz zu Methanol- oder Acetonitril-Wasser-Gemischen, wie z.B. Heptan- oder Octansulfonsäure, meist in Kombination mit Phosphatpuffer. Das Ionenpaarreagenz schirmt durch Ionenpaarbildung die positive Ladung ab und der Komplex verhält sich weitgehend wie ein ungeladenes Molekül, was Wechselwirkungen mit einer lipophilen stationären Phase erlaubt.[97-101]

Alternativ hierzu ist die Verwendung einer Kationenaustauscher-Säule beschrieben.[102]

Analyse der Pyridiniumoxime ist auch möglich über Capillar-Zone-Electrophoresis (CZE) in Kombination mit UV-Detektion.[103]

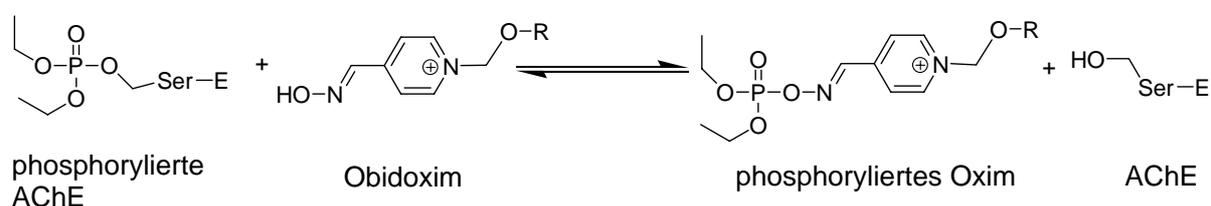
D'Agostino et al. und Kunkel et al. haben mit unterschiedlicher Ionisierungsart die im Massenspektrum sichtbaren Massen diverser Pyridiniumoxime untersucht. Für Obidoxim ergaben sich dabei an wesentlichen Masse-Ladungsverhältnissen (m/z) der Fragmente: m/z 323, 288, 287, 257, 201, 144, 136, 135, 123.[104-106]

IR-Spektren des Obidoxims zeigen Banden bei 850 cm^{-1} auf (4-substituierte Pyridiniumstruktur), $990\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$ (N-OH-Bindung), 1600 cm^{-1} (Oxim-CN-Doppelbindung) und $2900\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ (assoziierte Hydroxylgruppen).[79]

B.3 Phosphylierte Oxime (POx)

B.3.1 Die Reaktivierungsreaktion und POx-Bildung in vivo

Wie oben bereits kurz erwähnt sind die therapeutisch eingesetzten Oxime in der Lage, über einen nucleophilen Angriff der Oximgruppe am Phosphoratom des Organophosphatrestes gehemmter AChE eine Ablösung desselben von der Seringruppe des esteratischen Zentrums zu erreichen. Das Enzym ist dann reaktiviert und kann die Funktion wieder erfüllen, ACh zu spalten. Es wird ein Angriff des Oximates in einer bimolekularen nucleophilen Substitutionreaktion (S_N2) postuliert.[76;107] Somit bildet sich zunächst durch Anlagerung des Oximates ein Phosphorkomplex. Erst in einem zweiten Schritt wird dann durch Elimination des Serins aus diesem Komplex AChE wieder regeneriert.[108] Neben ungehemmter AChE entstehen dabei phosphylierte Oxime (POx). Schema B.3-1 erläutert diese Reaktion.



Schema B.3-1:

Reaktivierung Organophosphat-gehemmter AChE (im gezeigten Beispiel durch Paraoxon phosphoryliert) mit dem Oxim Obidoxim, das hier aus Platzgründen mit nur einem Ring und ohne Gegenion dargestellt ist (-R bedeutet den Rest des Obidoxim-Moleküls).

Die Entstehung von phosphorylierten Oximen (POx) bei der Reaktivierung ist also dem Reaktivierungsmechanismus immanent. Es ist von einer Gleichgewichtsbildung zwischen dem Oxim und dem POX auszugehen.[107;109-111]. Das Phosphoryloxim kann aus dem Gleichgewicht heraus im Rahmen einer Rückreaktion seinerseits den Organophosphat-Rest erneut auf das esteratische Zentrum der AChE übertragen, d.h. also zu einer erneuten Inhibition führen.[112-114] Für eine gelungene Reaktivierung ist also der Zerfall des POx der entscheidende Schritt, da es so dem Gleichgewicht entzogen wird.[107] Neben der o.e. möglichst hohen Acidität der Oximgruppe und der in der Folge leichteren Bildung nucleophilen Oximats ist also auch ein rascher Zerfall des POx für eine gute Reaktivatorleistung entscheidend. Bei der Reaktivierung gehemmter AChE mit Obidoxim reagiert in der Regel nur eine Oximgruppe, so dass nur mit Bildung eines monophosphorylierten Oxims (Mono-POx) zu rechnen ist.

B.3.2 Zerfall der phosphorylierten Oxime

Der Zerfall des POx läuft entweder über eine Hydrolyse zu Oxim und Phosphonsäure-Derivat oder über eine β -cis-Eliminierung unter Bildung des aus der Zerfallsreaktion des Oxims bekannten Nitrils und der entsprechenden Phosphonsäure bzw. Phosphorsäure ab.[107] Auf diese Weise wird POx dem Gleichgewicht entzogen. Da die Phosphonsäure-Derivate i.d.R. keine Hemmstoffe der AChE mehr sind, ist dann die Entgiftung abgeschlossen. Das Nitril baut sich anschließend, durch Hydroxylionen katalysiert, unter Freisetzung eines Cyanidions weiter zum Pyridon ab. Für Obidoxim beschreibt dies Kiderlen, für PAM-POx Ashani.[11;115] Harvey et al. fanden für 2-PAM-POx neben der Bildung von Pyridon zu 20% auch das Pyridiniumamid. Die Hauptabbauprodukte von phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem Oxim sind also die gleichen.

Auch POx kann, ähnlich wie die Organophosphate selbst, über bestimmte hydrolytische Enzyme abgebaut werden. Kiderlen beschreibt die Hydrolyse von Diethylphosphoryl-Obidoxim (DEP-Obidoxim) über das Enzym Paraoxonase. Dabei entstehen Obidoxim und Diethylphosphorsäure.[115] Leader et al. fanden beschleunigten Abbau von Diethylphosphoryl-4-PAM unter PAM- und Phosphorsäureester-Bildung nach Zusatz von Phosphotriesterase (PTE) aus *Pseudomonas* sp.[116]. Herkenhoff et al. leiteten einen POx-zerstörenden Effekt des Enzyms OPH ab.[33]

Interessant ist die Geschwindigkeit der POx-Hydrolyse. Diese geht in verschiedenen Medien unterschiedlich schnell vonstatten. Für O-Ethyl-methylphosphonyl-Obidoxim (EMP-Obidoxim) ist z.B. die Halbwertszeit in Phosphatpuffer (20 mM, pH 7,2) 71 min, in HEPES-Puffer (20 mM, pH 7,2) hingegen 169 min. In beiden Fällen ist die Stabilität ausreichend, um eine erneute Inhibition der AChE zu bewirken. Die Ermittlung der Hydrolysehalbwertszeit erfolgte durch Messung der Abnahme der POx-Hemmeigenschaften mit der Zeit bei 25°C.[10]

B.3.3 Phosphylierte Oxime als Hemmstoffe der AChE

Wie bereits erwähnt können POx selbst Hemmstoffe von AChE sein.

Analog den Organophosphaten kann die molare Hemmkonstante der phosphylierten Oxime mittels Ellman-Assay ermittelt werden. Kinetiken der AChE-Inhibition durch POx wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen für unterschiedliche POx und an AChE unterschiedlicher Spezies durchgeführt.

Luo et al. z.B. fanden für O-Ethyl-methylphosphonyl-Obidoxim eine gegenüber dem zugrunde liegenden MEPQ 22fach höhere Hemmkonstante gemessen an Maus-AChE während Ashani et al. ebenfalls für Maus-AChE eine 16fach höhere Hemmkonstante von POx aus 2-PAM und VX als die von reinem VX beschreiben.[10;11] Kiderlen et al. fanden für Diethylphosphoryl-Obidoxim aus Paraoxon und Obidoxim sogar eine ca. 350fach stärkere Hemmwirkung des POx gegenüber humaner AChE. Diese Daten sind die einzigen an menschlicher AChE ermittelten.[12]

Das Ersetzen der Abgangsgruppe der Organophosphate durch Oxime scheint also zu einer Giftung zu führen.

B.3.4 Synthese von phosphylierten Oximen

Es wurden zahlreiche Versuche zum Beweis der Existenz und zur Ermittlung der Stabilität von POx und der Charakterisierung ihrer Hemmwirkung auf die AChE vorgenommen.

Die meisten Versuchsansätze gingen von einer Inkubation des Oxims und des Organophosphates aus. Das POx bildete sich dabei dann per Direktreaktion der beiden Substanzen. Die Reaktionslösung wurde i.d.R. durch Ausschütteln vom Organophosphat

gereinigt und die POx-enhaltende Lösung für Zerfalls- und Hemmkinetik-Untersuchungen herangezogen. Eine Isolierung des POx fand nicht statt.[114;117-120]

Einigen Arbeitsgruppen gelang aber auch eine Isolierung von POx aus verschiedenen Oximen und Organophosphaten. So erreichten z.B. Hackley et al. die Synthese und Isolierung von O-(Isopropylmethylphosphonyl)-2-formyl-1-methylpyridiniumiodidoxim aus der Reaktion von 2-PAM mit dem Chloridivat des Sarins.[112]

Ashani et al. nutzten ebenfalls die Chloridate bestimmter Organophosphate zur Synthese der 2-, 3- und 4-PAM-POx-Moleküle.[11] Luo setzte das Organophosphat MEPQ (7-(Methylethoxyphosphinyloxy)-1-methylchinoliniumiodid mit Obidoxim zum O-Ethylmethylphosphonyl-Obidoxim (EMP-Obidoxim) um.[10] Das gleiche Molekül ist bei der Reaktion von VX mit Obidoxim zu erwarten. Kiderlen et al. erzeugten Mono(diethylphosphoryl)obidoxim über Direktreaktion von Paraoxon mit Obidoxim und anschließender Isolierung über präparative HPLC.[12] Bei äquimolaren Konzentrationen an Obidoxim und Paraoxon entstand fast ausschließlich das Mono-POx, obwohl Obidoxim bei der Direktreaktion mit einem Organophosphat theoretisch auch zur Bildung des Di-POx unter Reaktion beider Oximgruppen befähigt wäre.

B.3.5 Analytik der phosphorylierten Oxime und ihrer Abbauprodukte

POx-Verbindungen sind, wie die zugrunde liegenden Salze der Pyridiniumoxime in der Lage, UV-Licht zu absorbieren. Es ist hierbei eine hypsochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima der Oxime bei POx-Bildung beschrieben. Eine Abtrennung von POx aus dem Reaktionsgemisch über HPLC ist von Kiderlen et al. und Luo et al. durchgeführt worden.[10;12]

Per LC-MS-Analytik wurden von Kiderlen das Mono(diethylphosphoryl)obidoxim und die sich daraus bildenden Abbauprodukte Mononitril und Monopyridon identifiziert.[115]

Röntgenstruktur, ^{13}C - und ^1H -NMR von 4-PAM-Sarin-POx wurden von Portman et al. aufgezeichnet, während Luo et al. ein ^{31}P -NMR von O-Ethyl-methylphosphonyl-Obidoxim und Ashani u.a. von O-Ethyl-methylphosphonyl-2-, 3- und 4-PAM erfasst haben.[10;121]

C Problemstellung

Obwohl das Phänomen der POx-Bildung schon verschiedentlich untersucht worden ist, liegen nur wenige Daten für phosphylierte Oxime aus Obidoxim, dem in Europa wichtigsten therapeutisch verwendeten Oxim, vor. EMP-Obidoxim als ein POx aus V-Stoffen und Obidoxim wurde nur von einer Arbeitsgruppe generiert und untersucht. Daten zur Hemmkinetik gegenüber humaner AChE fehlen gänzlich.

Außerdem konnten in der Literatur keine Angaben zum Reaktionsablauf einer Direktreaktion von Obidoxim mit V-Stoffen gefunden werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb zunächst die bei der Direktreaktion der konstitutionsisomeren V-Stoffe VX, VR und CVX mit dem Oxim Obidoxim in wässrigen Medien entstehenden Reaktionsprodukte identifiziert und dann die so dargestellten phosphonylierten Oxime isoliert werden.

Ebenfalls sollten kinetische Aspekte der Direktreaktion betrachtet werden, wie z.B. das Verhalten der isomeren Formen des Obidoxims.

Daraus erwuchs die Aufgabe, geeignete analytische Methoden zur Isolierung, Identifizierung und Quantifizierung der Substanzen zu entwickeln. Es war nämlich damit zu rechnen, dass übliche Methoden wie NMR und Elementaranalyse nicht angewendet werden könnten, zum einen da die V-Stoffe aufgrund ihrer starken Giftwirkung nur in geringen Konzentrationen eingesetzt werden sollten, zum anderen wegen der zu erwartenden Instabilität und Toxizität der phosphonylierten Oxime.

Um die humane Toxizität der isolierten phosphonylierten Oxime abschätzen zu können, war das Ziel, in in-vitro Tests ihre Zerfallsgeschwindigkeit in annähernd physiologischen Medien und ihre Hemmaktivität gegenüber humaner AChE zu ermitteln.

D Ergebnisse und Diskussion

D.1 Allgemeine Betrachtungen zur Darstellung, Isolierung sowie Analytik von POx

D.1.1 Mögliche Wege zur Darstellung der phosphorylierten Oxime

Eine mehrstufige, aufbauende Synthese der phosphorylierten Oxime (POx) ist nur von wenigen Arbeitsgruppen beschrieben worden und dies ausschließlich für solche mit einem einzelnen Pyridiniumring. Verwendet wurden u.a. die Chloridate der Nervenkampfstoffe Sarin, Soman, Cyclosarin und VX, die dann zunächst mit tertiärem Pyridinaldoxim umgesetzt wurden. Da die verwendeten Chloridate eine deutlich geringere Toxizität aufweisen als die eigentlichen Kampfstoffe, konnte im normalen präparativen Maßstab gearbeitet werden (Ansätze von 0,1 mol). Die so erhaltenen tertiären POx wurden, teils nach einer säulenchromatographischen Aufreinigung, teils direkt, durch Methylierung des Pyridin-Stickstoffes mit Methyljodid in die quartäre Form umgewandelt. Da die so gebildeten, positiv geladenen Pyridinium-Verbindungen aus dem etherischen Reaktionsansatz auskristallisieren, somit also eine gute Trennung von anderen Bestandteilen der Reaktionslösung erreicht wird, waren die Ausbeuten sehr gut (91%).[11;112;122] Während sich so phosphonylierte Pyridiniumoxime, abgeleitet von einkernigen Pyridiniumverbindungen, darstellen lassen, gestaltet sich dieser Weg bei Bispyridiniumverbindungen als schwieriger, besonders bei solchen, bei denen die Ringe über eine Etherbrücke verknüpft sind, wie z.B. Obidoxim. Hier müssten zunächst die einzelnen Pyridinoxime mit Organophosphat umgesetzt werden, das dabei entstandene POx dann mit dem hoch kanzerogenen Dichlorethylether oder ersatzweise Bis(methylsulfonylmethyl)ether zur Bispyridiniumverbindung verknüpft werden. Diese Umsetzung erfordert Temperaturen von 40-50°C und es ist davon auszugehen, dass die erwarteten thermolabilen POx dabei zerstört werden.[79;85]

Die meisten Arbeitsgruppen, die sich mit phosphonylierten Oximen befassten, und alle, die POx mit zweikernigen Oximen synthetisierten, generierten diese aus Direktreaktionen von Organophosphat und Oxim. Oft unterblieb ein Abtrennen des POx aus der Reaktionslösung, und diese wurde insgesamt für weitere Untersuchungen, z.B. die Bestimmung von Hemmkonstanten, herangezogen. Da i.d.R. nie von einer 100%igen Umsetzung auszugehen ist, kann man immer noch Reste der Edukte Organophosphat und Oxim erwarten. Darüber

hinaus dürften sich neben dem POx noch, wie später in Kapitel D.2. beschrieben, sonstige Reaktionsprodukte und Abbauprodukte der Edukte finden. Eine mit dieser Reaktionslösung gemessene Hemmkinetik erfasst also immer die Summe aller Effekte der in der Mischung enthaltenen Substanzen und kann nicht identisch mit der der reinen POx sein.

Aufgrund der o.g. Schwierigkeiten wurde in dieser Arbeit für die Darstellung der verschiedenen POx der Weg über die Direktreaktion von V-Stoff und Oxim gewählt. Um alle weiteren Versuche mit möglichst reinem POx durchführen zu können, war eine Isolierung des POx aus dem Reaktionsgemisch vonnöten. Hierzu wurden flüssigkeitschromatographische Trennmethode erarbeitet. Aufgrund der Giftigkeit der V-Stoffe konnte nur in kleinen Ansätzen von wenigen Millilitern im Konzentrationsbereich bis 10 mM gearbeitet werden.[7]

D.1.2 Entwicklung der Analytik

Um die Reaktion zwischen Organophosphat und Oxim überhaupt nachvollziehen zu können und eine Isolierung des POx zu ermöglichen, musste eine gute Trennmethode entwickelt werden. Nach Möglichkeit sollte ein und dieselbe Methode die Trennung und Isolierung aller zu generierenden POx ermöglichen.

Aufgrund des polaren Charakters und der geringen Flüchtigkeit der Edukte und Produkte schied die Verwendung gaschromatographischer Methoden aus. Mittel der Wahl waren also flüssigkeitschromatographische Analysensysteme. Hierfür standen verschiedene Pumpensysteme gekoppelt mit zwei Detektionsprinzipien zur Verfügung: UV-Detektion und massenselektive Detektion.

Betrachtung der Struktur und Literaturrecherche der einzelnen Komponenten legten nahe, dass Obidoxim und Derivate im UV-Licht detektiert werden können, V-Stoffe und Derivate aufgrund fehlender Chromophore allerdings nur massenspektrometrisch nachweisbar sein dürften (s. hierzu Kapitel B.1.4, B.2.5 und B.3.5). UV-Scans von wässrigen Obidoxim-Lösungen bestätigten ein deutliches Absorptionsmaximum bei 284 nm, gelöst in Methanol-Wasser-Gemischen von 285 bzw. 286 nm. Das Monobetain des Obidoxims, das durch Abstrahieren eines Protons einer Oximgruppe im Alkalischen entsteht, zeigt ein Absorptionsmaximum bei 353 nm.[94] Die durchgeführten eigenen Untersuchungen bei pH-Werten zwischen 5 und 7 zeigten kein Absorptionsmaximum bei dieser Wellenlänge.

Monobetain lag also offensichtlich nicht vor, was sich durch den pK_a -Wert von 7,6 für die Abspaltung des Protons der ersten Oximgruppe erklären lässt.

Für VX ließ sich keine zur Detektion verwertbare Wellenlänge feststellen.

Orientierende Vorversuche mit äquimolaren Reaktionsansätzen von Obidoxim und VX ergaben bei der chromatographischen Trennung via HPLC mit UV-Detektion mit zunehmender Inkubationszeit eine große Anzahl an entstehenden Peaks, was eine hochauflösende Chromatographie erforderte.

Die chromatographische Trennung erfolgte zunächst nach publizierten Methoden unter Verwendung einer Reversed-Phase-Säule und Acetonitril-Wasser-Gemischen, die als Ionenpaar-Reagenz PIC B7 mit dem Hauptbestandteil Heptansulfonsäure enthielten.[98] Es stellte sich bei dem Versuch, die Peaks der HPLC-Trennung über LC-MS zu identifizieren, heraus, dass der verwendete Eluent die selektierte Massenspur des aus VX und Obidoxim entstehenden EMP-Obidoxims mit Störsignalen überlagerte. Dies erforderte eine Änderung in der Zusammensetzung des Eluenten. Das Reduzieren oder Weglassen der Heptansulfonsäure als Ionenpaarreagenz ging mit dem Verlust der Retention von Obidoxim und seinen Derivaten auf der Reversed-Phase-Säule einher. Grund dafür war wohl die nicht mehr gegebene Abschirmung der positiven Ladung des Pyridiniumrings. Nur durch diese kann eine Interaktion zwischen Pyridiniumoxim und der hydrophoben Säule erreicht werden.

Daraufhin wurden verschiedene Säulen mit unterschiedlichen Trennprinzipien verwendet: Diol-Phasen und Silica-Phasen ermöglichen polare Wechselwirkungen. Allerdings waren die Trennleistungen nicht ausreichend. Zur Elution waren, besonders bei der Silica-Säule, extreme Salzkonzentrationen nötig, um die polaren Wechselwirkungen zwischen Analyt und stationärer Phase wieder aufzuheben. Ein weiterer Ansatzpunkt war eine Kationenaustauschersäule, die vom Trennprinzip geeignet erschien, die positiv geladenen Moleküle zurückzuhalten. Es zeigte sich aber, dass eine fraktionierte Elution von Oxim und phosphoryliertem Oxim nur schwer zu erreichen war und somit keine zufrieden stellende Trennung bewerkstelligt werden konnte. Die Tests neuartiger Säulenmaterialien wie Carbonsäulen und Polymersäulen lieferten z.T. zwar akzeptable Oxim-Peaks, waren aber ebenfalls nicht zur Trennung des komplexen Gemisches im POx-Reaktionsansatz geeignet.

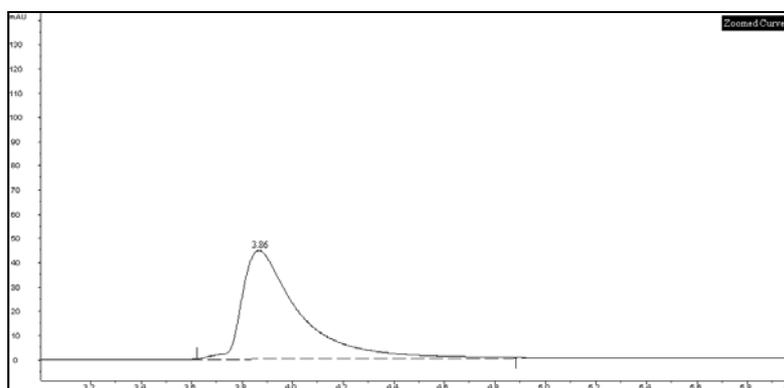
Die Lösung brachte die Atlantis dC18-Säule, eine Reversed-Phase-Säule (s. Kapitel E.2), die neben einer hydrophoben Wechselwirkung auch zur Ausbildung polarer Interaktionen in der Lage ist. Ziel war es, einen Eluenten zu verwenden, der auch in der LC-MS keine störenden Peaks hinterlässt. Eine als „flüchtig“ geltende Salzverbindung war also zu bevorzugen.

Ammoniumacetat brachte keine zufrieden stellende Peakform. Dagegen gelang durch die Verwendung von Ammoniumformiat als Zusatz zu Methanol-Wasser-Gemischen eine gute Trennung auf der gerade beschriebenen Säule. Offensichtlich sind die Formiat-Ionen in der Lage, ähnlich wie ein Ionenpaarreagenz die positive Ladung des Pyridiniumringes des POx abzuschirmen. Methanol als organischer Anteil im Eluenten brachte bessere Ergebnisse als Acetonitril.

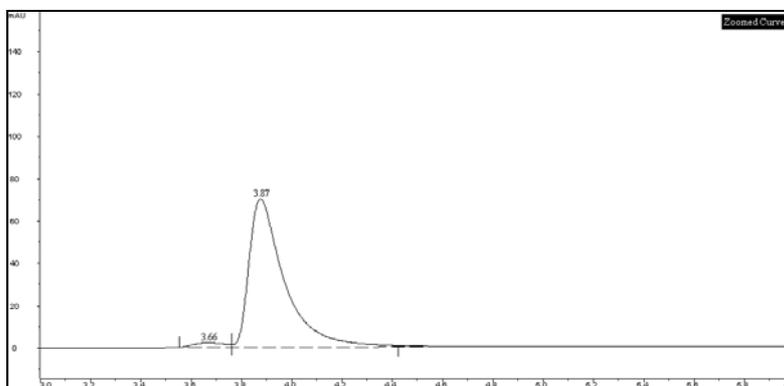
Obidoxim neigte bei niedrigen Salz-Konzentrationen unter o.g. Konditionen allerdings zum Tailing. Dies konnte aber durch Steigerung der verwendeten Ammoniumformiat-Konzentration deutlich verringert werden.

Die ungewöhnlich hohen, im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Konzentration an Ammoniumformiat (s. Kapitel E.2) waren Ergebnis dieser Peakform-Optimierung. Im Zuge einer universell einsetzbaren Methode sollte auch eine Quantifizierung kleinster Oxim- und POx-Konzentrationen möglich sein. Die folgenden Abbildungen D.1-1 a-d zeigen die Peakverschmälerung am Beispiel von Obidoxim.

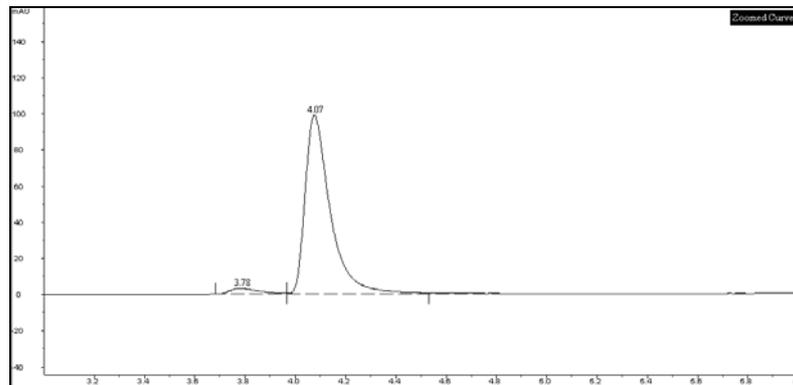
a)



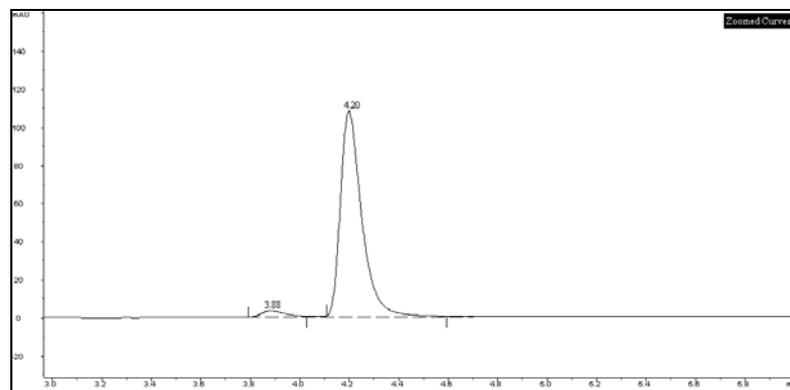
b)



c)



d)

**Abbildung D.1.1 a)-d):**

Gezeigt sind hier die Effekte der Erhöhung der Ammoniumformiat-Konzentration im Fließmittel am Beispiel der Trennung von syn-anti- (zuerst eluierender Peak) und syn-syn-Obidoxim über eine einfache Gradientenmethode. Eluent A bestand aus Ammoniumformiat in Wasser, Eluent B aus der gleichen Konzentration Ammoniumformiat in Methanol 50%. Bei Chromatogramm a) betrug die Konzentration an Ammoniumformiat 10 mM, bei b) 20 mM, bei c) 50 mM und bei d) 100 mM in Wasser. Die Konzentration des Obidoxims betrug 10 μ M. Die Peaks werden schmaler und höher und die Trennung besser, bis eine Basislinientrennung bei einer Konzentration von 100 mM Ammoniumformiat erreicht wird.

In der LC-MS-Analyse ergab das AF keine Störsignale, allerdings war aufgrund der hohen Ionenkonzentration ein erhöhtes Grundrauschen im Full-Scan-Modus zu beobachten.

Die an der HPLC auf einer Säule mit dem Durchmesser 4,6 mm entwickelte Trennmethode konnte unter Verwendung einer Säule kleineren Durchmessers (2,1 mm) und im gleichen Verhältnis reduzierter Flussrate auf eine LC-MS-Anlage übertragen werden. Hier offenbarten sich noch eine Fülle weiterer Peaks, die über UV-Detektion nicht sichtbar und deshalb wohl der Abbaukaskade von VX zuzuordnen waren. Die besten Ergebnisse lieferte eine Analyse mit positiver Ionisierungsspannung (s. Kapitel E.2).

Aufgrund der vielen Substanzen im Gemisch führte die Entwicklung der Trennung zu relativ langen Läufen mit mehrstufigen Gradienten.

Im Zusammenwirken beider Detektionsmethoden (UV und MS) wurde die Trennung so optimiert, dass die wesentlichen Peaks voneinander ausreichend getrennt wurden und so eine Identifizierung möglich war und dass die dargestellten POx sauber über präparative HPLC aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt werden konnten.

D.1.3 Reinheitsbestimmung, Identifizierung und Quantifizierung von POx

Reines POx wurde durch chromatographische Auftrennung des Reaktionsansatzes und Fraktionierung des entsprechenden Peaks dargestellt, mehrere Fraktionen verschiedener Läufe fusioniert und die Reinheit erneut per HPLC-UV-Trennung und per LC-MS mittels Spritzeninfusion im Full-Scan mit positiver und negativer Ionisierung kontrolliert.

Aufgrund der guten präparativen HPLC-Trennungen konnten alle dargestellten POx sauber isoliert werden. Die für die einzelnen POx jeweils verwendete Trennmethode und die resultierenden Chromatogramme sind im entsprechenden Kapitel genannt.

Da über die verwendeten Darstellungsmethoden POx nur im Mikrogramm-Maßstab in Lösung gewonnen werden konnten, kam eine klassische Identifizierung über NMR und Elementaranalyse nicht in Betracht. Dazu erlaubte die aus den Literaturangaben zu erwartende Toxizität der POx keine Analytik in einer universitären Einrichtung.[10;12;116]

Alternativ wurde die POx-Identifizierung über folgende Wege durchgeführt:

a) per LC-MS-MS

Das Masse-Ladungsverhältnis m/z der POx-Molekülpeaks wurde im massenselektiven Detektor bestimmt. Die POx ließen sich, wie oben erwähnt, hierbei mit positiver Ionisierung detektieren.

Darüber hinaus ließen sich die Fragmentierungsmuster typischen Zerfallsmustern der Oxime zuordnen und die Entstehung von Methylphosphonsäure-Derivaten zeigen.

Die LC-MS-Analytik gab ebenfalls Hinweise auf die Identität vieler anderer Substanzen, die im Reaktionsgemisch entstehen.[12;39;105;106]

b) per UV-Vis-Detektion

Wie in der Literatur beschrieben, tritt durch PO_x-Bildung eine Verschiebung des Absorptionsmaximums im UV-Spektrum zu niedrigeren Wellenlängen im Vergleich zum Oxim auf.[115;118;123] So zeigte z.B. Obidoxim als Wellenlänge maximaler Absorption 286 nm, das EMP-Obidoxim hingegen 275 nm.

c) Umsetzung mit Lauge

Wird PO_x mit Lauge versetzt, kann es entweder über Hydrolyse oder β -cis-Eliminierung zerfallen. Folglich bilden sich sowohl Oxim als auch Nitril und andere Abbauprodukte. In jedem Fall aber entstehen die jeweiligen Phosphonsäuren.[107;115] Deren Nachweis über MS nach Versetzen der PO_x mit Lauge kann zur Identifizierung der PO_x herangezogen werden, da die Ausgangssubstanz also ein Phosphonsäure-Element enthalten haben muss.

d) Hemmeigenschaften gegenüber der Acetylcholinesterase

Als Abkömmlinge der Organophosphate zeigen PO_x mehr oder wenige starke Hemmeigenschaften gegenüber AChE. Da nur wenige Substanzklassen (überwiegend Organophosphate und Carbamate) in der Lage sind, AChE zu hemmen, ist dies ein Hinweis auf die vorliegende Struktur.[7;10;12]

D.2 Darstellung phosphonylierter N-Methyl-acetylpyridiniumoximiodide

In ersten Versuchen wurde deutlich, dass bei der Reaktion von Obidoxim mit V-Stoffen sehr viele Substanzen gebildet werden. Um das Reaktionsgeschehen besser zu verstehen und Hinweise für die Zuordnung der Peaks aufgrund des Reaktionsablaufes zu erhalten, wurde nach einer Möglichkeit zur Vereinfachung gesucht. Die meisten der in der Reaktion zwischen Obidoxim und VX entstehenden Peaks sollten Neben- und Abbauprodukten sein. Da sie im UV-Licht sichtbar waren, mussten sie wohl Elemente der Pyridiniumoximstruktur enthalten. Da der Abbauweg des Oxims wie auch des PO_x maßgeblich über eine cyclische β -Eliminierung zum Nitril und dann zum Pyridon und weiteren Abbauprodukten verläuft, sollte die Inhibierung dieses Zerfallsweges eine deutliche Reduktion an UV-sichtbaren Peaks bringen.[107]

Zu diesem Zweck wurden N-Methyl-acetylpyridiniumoximiodide (APO) synthetisiert. Diese Derivate der PAM-Reihe (N-Methyl-formylpyridiniumoxime) weisen statt des zur Oximgruppe β -ständigen Wasserstoffatoms eine Methylgruppe auf. Die aus der Reaktion der APO mit V-Stoff resultierenden POx sollten also nicht mehr zur cyclischen β -cis-Eliminierung befähigt sein. Somit dürfte keine Nitril-Bildung und folglich kein weiterer Abbau stattfinden. Darüber hinaus ist bei APO nur eine Oximgruppe zur Reaktion mit dem V-Stoff vorhanden. Dagegen ist bei Bispyridiniumoximen theoretisch die Reaktion beider Oximgruppen oder nur einer Oximgruppe möglich, was die Anzahl möglicher Produkte erhöht.

D.2.1 Synthese der N-Methyl-acetylpyridiniumoximiodide (APO)

Die Synthese der N-Methyl-acetylpyridiniumoxime erfolgte in zwei Stufen. Zunächst wurde in Analogie zu La Mattina et al. der entsprechende Aldehyd mit neutralisiertem Hydroxylamin in wässriger Lösung zur Reaktion gebracht, um die tertiären Oxime zu erhalten.[86] Die Produkte 2-Acetylpyridinoxim, 3-Acetylpyridinoxim und 4-Acetylpyridinoxim kristallisierten aus dem eisgekühlten Kolben innerhalb ca. 2-3 h vollständig aus. Die Präzipitate wurden mehrfach aus heißem Wasser umkristallisiert und bei 30-40°C abfiltriert. Dabei blieben einige Mengen an Substanz in Lösung und wurden nicht weiter verarbeitet, weshalb die Ausbeuten relativ gering waren. Die erhaltenen Kristalle wurden im Vakuum getrocknet und Schmelzpunkte bestimmt. NMR-Analytik aus D₂O zeigte Identität und Reinheit der Substanzen.

In einem zweiten Schritt wurde dann die Quartärnierung des Pyridinstickstoffes durch Umsetzung mit Methyljodid in Acetonitril, analog eigener Methylierungs-Vorschriften, unter Rückfluss durchgeführt und die Reaktionsverläufe über HPLC-Analysen kontrolliert. Es ergab sich folgendes Bild:

Während die N-Methylierung des 3- und 4-Acetylpyridins innerhalb von 5 h abgeschlossen war, verlief die Reaktion des 2-Acetylpyridins sehr viel langsamer. Diese Reaktion wurde erst nach 1 Woche mit schlechten Ausbeuten beendet, als sich kein weiterer Reaktionsfortschritt mehr abzeichnete. Grund hierfür könnte die direkte Nachbarschaft der Seitenkette mit

Oximgruppe und Methylrest zum Pyridin-Stickstoff, an dem die Methylierung abläuft, sein, was zu einer sterischen Hinderung führen könnte.

Ginsburg et al. synthetisierten syn- und anti-Isomere der APO getrennt voneinander auf unterschiedlichen Wegen. Da keine absolute Konfiguration zugewiesen werden konnte, wurden diese als A und B bezeichnet. Die A-Serie zeigt für alle drei Stellungsisomere deutlich niedrigere Schmelzpunkte als die B-Serie. Die Schmelzpunkte der in der vorliegenden Arbeit synthetisierten N-Methyl-acetylpyridiniumoximiodide indizieren das Vorliegen reiner B-Serie. Während der Schmelzpunkt des 4-APO-Iodids mit 190-191°C mit der Literaturangabe (B-Serie: 191-193°C, A-Serie 104-109°C) übereinstimmt, ist der des 3-APO-Iodids mit 217-218°C etwas höher als der Literaturwert (B-Serie: 213-214°C, A-Serie 103-106°C), der des 2-APO-Iodids mit 182-183°C allerdings niedriger (B-Serie: 185-196°C, A-Serie 101-103°C).[84]

Die Ausbeuten der B-Serie betragen bei Ginsburg et al. 46% für das N-Methyl-2-acetylpyridiniumoxim, 45% für das N-Methyl-3-acetylpyridiniumoxim und 50% für das N-Methyl-4-acetylpyridiniumoxim.[84]

In der Reinheitsanalyse der APO nach Lösen in Wasser über HPLC mit UV-Detektion trat in geringer Intensität jeweils ein kleiner Peak neben einem Hauptpeak auf, der vor diesem eluierte.

Mit der Standard-Trennmethode (HPLC-Methode 1) und Diodenarray-Detektion ergaben sich folgende Retentionszeiten und UV-Spektren:

2-APO-Lösung:	4,1 min: λ_{\max} = 217 und 266 nm
	5,2 min: λ_{\max} = 222 und 271 nm
3-APO-Lösung:	4,4 min: λ_{\max} = 231 und 265 nm
	6,7 min: λ_{\max} = 230 und 257 nm
4-APO-Lösung:	4,6 min: λ_{\max} = 217 und 267 nm
	8,3 min: λ_{\max} = 218 und 278 nm

Die zuerst eluierenden kleinen Peaks hatten eine Fläche von 0,4% (2-APO), 2,3% (3-APO) und 2% (4-APO) der jeweiligen Hauptpeaks. Die UV-Spektren ähnelten sich.

Abbildung D.2-1 zeigt ein exemplarisches Chromatogramm einer 4-APO-Trennung.

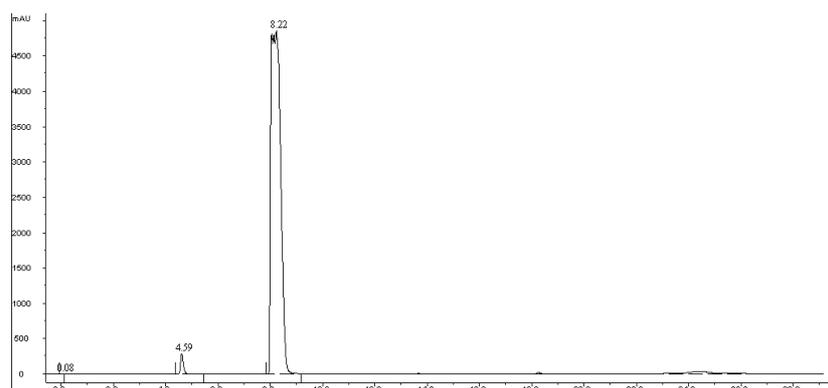


Abbildung D.2-1:

Chromatogramm der Trennung einer 5 mM 4-APO-Lösung mit HPLC-Methode 1

Wie eine LC-MS-MS-Analyse zeigte, besaßen diese unbekannt Peaks ein Masse-Ladungsverhältnis von m/z 151 und zeigten das gleiche Zerfallsmuster wie die APO-Oxime. Es kann also mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass es sich um syn- und anti-Isomere der APO handelte. Im $^1\text{H-NMR}$ zeigte sich kein Hinweis auf das Vorliegen von Isomeren. Allerdings könnte die Konzentration des zuerst eluierenden Isomers zu gering gewesen sein, also unter der Nachweisgrenze des NMR gelegen haben.

Auch mehrere Wochen alte APO-Lösungen zeigten keine Anzeichen eines Zerfalls, die Moleküle sind also auch in wässriger Lösung stabil.

D.2.2 Synthese von EMP-APO

D.2.2.1 Reaktionsansatz und Isolierung

Die, wie in E.2.1.1. beschrieben, synthetisierten 2-, 3- und 4-APO-Oxime wurden in einer wässrigen Lösung in einer Konzentration von 5 mM mit 5 mM VX bei Raumtemperatur (23°C) zur Reaktion gebracht. Die Größe des Reaktionsansatzes betrug je $1000\ \mu\text{l}$ (s. E.2.2.4). Aliquote des Reaktionsgemisches wurden zu je $50\ \mu\text{l}$ mit der für den Referenz-Reaktionsansatz von VX mit Obidoxim entwickelten HPLC-Methode 1 getrennt und die POx-Peaks durch Peak-Fraktionierung gesammelt. Die Auftrennung des Reaktionsansatzes erfolgte für 2-, 3- und 4-APO-POx nach der gleichen Methode. So ließ sich ein Vergleich der Retentionszeiten und Bildungskinetiken erreichen.

D.2.2.2 Reaktionsprodukte

Die Retentionszeiten der reinen APO betragen 5,2 min für 2-APO, 6,7 min für 3-APO und 8,3 min für 4-APO (s.o.). Neben dem Oxim-Peak wurde nur ein weiterer Peak sichtbar (Ret. 15,7 min bei 2-APO-, 18,6 min bei 3-APO- und 19,5 min bei 4-APO-Ansatz), der zunächst mit zunehmender Inkubationsdauer wuchs und dann einen annähernd konstanten Wert erreichte (s. Abbildung D.2-2). LC-MS-Analysen bestätigten das für das EMP-APO erwartete Masse-Ladungsverhältnis m/z 257 (s. D.2-3). Es bildete sich offensichtlich ein Gleichgewicht zwischen Oxim und POx aus, wie dies auch zu erwarten war. Weitere Peaks traten nicht in Erscheinung, was auf eine hohe Stabilität des EMP-APO hinweist. APO-POx ist aufgrund der β -ständigen Methylgruppe nicht zum Zerfall zum Nitril über β -Eliminierung befähigt, was sich in einer erhöhten Stabilität niederschlägt.

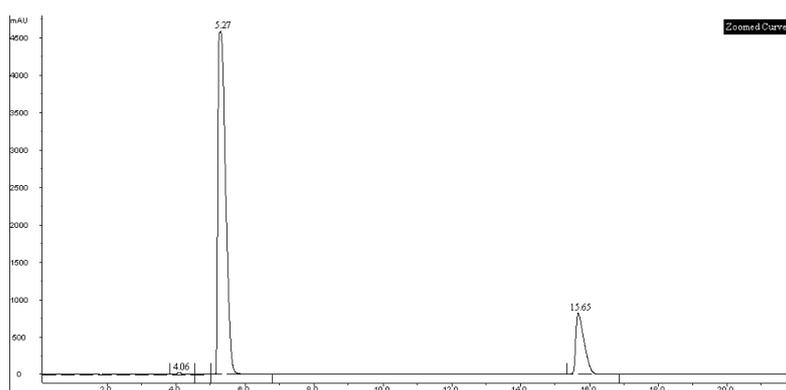


Abbildung D.2-2:

Chromatogramm der HPLC-Trennung eines 2-APO-VX-Ansatzes (beide 5 mM) nach 8,5 h Reaktionszeit, HPLC-Methode 1

Eine auffällige Beobachtung war bei der Umsetzung von 4-APO mit VX zu machen. Der 4-APO-Peak bei 8,3 min verschwand zunehmend mit längerer Inkubationsdauer und ein Peak bei 7,6 min entstand. Und das bei weitgehend konstanter POx-Menge. Der o.g. Effekt wurde mit den gegebenen Analysemethoden nur bei 4-APO, nicht bei 2- und 3-APO sichtbar. Da dieser bei reiner 4-APO-Lösung auch bei längerem Stehen nicht auftrat, schien die Reaktion durch die POx-Bildung ermöglicht zu werden. Um dies zu beweisen wurde 4-APO mit Diisopropylfluorophosphat (DFP), einem anderen Organophosphat, bei RT inkubiert. Hier fanden weder POx-Bildung noch das beschriebene Phänomen statt.

Zur weiteren Analytik über LC-MS-MS wurden beide Peaks fraktioniert. Zur Kontrolle der Reinheit wurden beide Fraktionen jeweils getrennt erneut über die HPLC-UV-Methode analysiert. Erstaunlicherweise zeigte dabei die Fraktion des neu gebildeten Isomers (Retentionszeit 7,5 min) ausschließlich einen Peak bei der Retentionszeit des ursprünglichen Isomers (Retentionszeit 8,3 min), genauso wie die zweite Fraktion. Dieses Phänomen trat auch auf, als die gewonnene Fraktion des ersten Peaks sofort auf Eis gelagert und direkt 5 min später unter Verwendung einer anderen HPLC-Anlage analysiert wurde. Somit schien eine sofortige, vollständige Umlagerung nach Abtrennung aus dem Reaktionsgemisch im Medium der HPLC-Eluenten stattzufinden. Online-Detektion über eine LC-MS-MS-Analyse mit Trennsäule und bis auf eine angepasste Flussrate gleichem Trennprogramm wie bei der HPLC-UV-Trennung (LC-MS-Methode 1) zeigte das gleiche Masse-Ladungsverhältnis von m/z 151 und dasselbe Fragmentmuster. Peak 1 und 2 scheinen also sehr eng verwandt zu sein. Abbildung D.2-3 zeigt das Chromatogramm der 4-APO-Trennung.

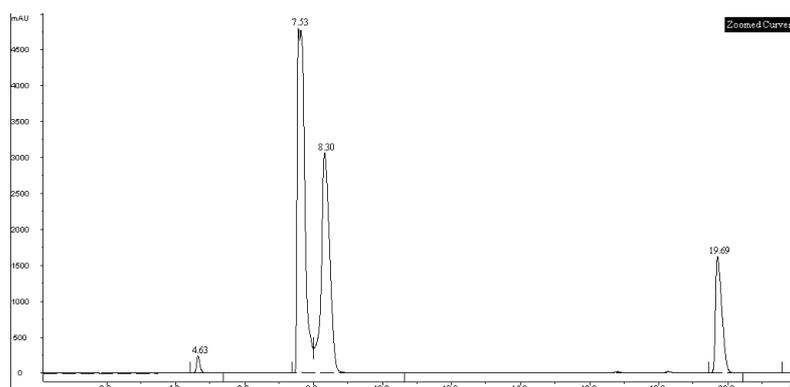


Abbildung D.2-3:

Chromatogramm der HPLC-Trennung eines äquimolaren 5mM Reaktionsansatzes von 4-APO und VX nach 11 Stunden, HPLC-Methode 1

Das mit einem Diodenarray-Detektor nach HPLC-Trennung erfasste UV-Spektrum beider Substanzen wies große Ähnlichkeit auf:

Peak 1 7,6 min: $\lambda_{\max} = 280 + 220$ nm

Peak 2 8,3 min: $\lambda_{\max} = 278 + 218$ nm

Eine Baseline-Trennung beider Peaks mittels HPLC gelang nicht, es lag vielmehr eine recht hohe Absorption am Talpunkt vor. Diese Tatsache weist auf eine Isomerisierung während der Trennung auf der Säule hin, da ja dort schon die einzelnen Substanzen aus dem Gleichgewicht der Lösung entzogen werden. Dies beschreiben John et al. für 11-OH-Thromboxan B₂.^[124] Ihnen gelang eine vollständige Trennung beider Peaks durch Absenken der Temperaturen bei der Chromatographie.

Auf Grundlage dieser Publikation wurde ein Versuch mit durch Eis-Wasser auf ca. 3°C gekühlten Eluenten und Säule durchgeführt. Die Probe war ein Reaktionsansatz nach 20 h Reaktionszeit bei RT, der vor der Injektion eisgekühlt wurde. Das Chromatogramm zeigte tatsächlich nur den POx-Peak und einen weiteren Peak im Bereich der APO-Elutionszeit. Die Gegenprobe mit reinem 4-APO ließ dieses ca. 0,5 min später eluieren. Das würde dafür sprechen, dass in dem POx-Ansatz ausschließlich die neu gebildete Substanz vorgelegen hat, die dann bei höheren Temperaturen auf der Säule die Struktur ändert und wiederum zum eigentlichen Oxim wird.

Denkbar wären zwei Reaktionswege einer Isomerisierung:

1. POx-Bildung und anschließender Zerfall zu Oxim unter Isomerisierung an der Oxim-Doppelbindung. Dies ist allerdings weitgehend auszuschließen, da ja schon das Isomer in der 4-APO-Lösung vorhanden war und deutlich früher eluierte.
2. POx-Bildung und anschließende Umlagerung analog einer Beckmann-Umlagerung unter Abspaltung des Phosphonsäure-Restes und Bildung eines intermediären Iminocarboxiumrestes. Dieser kann dann mit Wasser reagieren, so dass wieder ein Molekül mit derselben Masse wie die des ursprünglichen Oxims entsteht.^[125] Dagegen spricht die Tatsache, dass diese Reaktion hier nur schwer stattfinden dürfte, da EMP-4-APO aufgrund der positiven Ladung desaktiviert sein müsste.

Durch LC-MS-MS-Analyse konnte kein Hinweis auf eine Adduktbildung oder ähnliches gefunden werden, so dass auch hierüber das Phänomen nicht zu erklären ist.

D.2.3 Identität der EMP-APO

UV-Spektren

Tabelle D.2-1 stellt die Wellenlängenmaxima der EMP-APO im UV-Licht denen der reinen APO entgegen. Hier wird bei allen drei Stellungsisomeren die hypsochrome Verschiebung, die als typisch für POx-Bildung beschrieben ist, deutlich.[118;123]

Tabelle D.2-1:

Gegenüberstellung der Absorptionsmaxima im UV-Licht der stellungsisomeren APO und EMP-APO. Werte in Klammern stellen Schultern und keine isolierten Maxima dar. Die APO-Maxima beziehen sich auf das Hauptstereoisomer. Aufgenommen mit Diodenarray-Detektor in Methanol-Wassergemisch mit 0,1M Ammoniumformiat.

Stellungsisomer	λ_{\max} APO [nm]	λ_{\max} EMP-APO [nm]
2-	222 + 271	220 + 269
3-	230	221 (+ 241 + 273)
4-	218 + 278	213 + 258

MS-Analyse

Die massenspektrometrische Analyse der EMP-APO zeigte für alle Stellungsisomere eindeutig den Peak bei m/z 257, was dem einfach geladenen POx-Molekül entspricht. m/z 257 fragmentiert beim Product-Ion-Scan u.a. in m/z 151, 93 und 78, was eindeutig die Pyridin-Struktur beweist (s. Abbildung D.2-4).

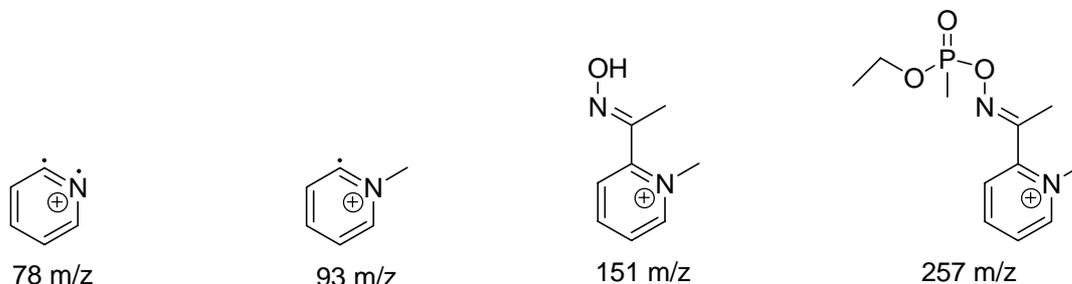


Abbildung D.2-4:

Mögliche Strukturen der bei EMP-APO-Fragmentierung im MS-MS-Mode auftretenden Fragmente

Alkalische Hydrolyse zur EMPS

Durch Versetzen mit KOH fand eine Spaltung des EMP-APO in Oxim und EMPS statt, was als Beweis der Struktur gesehen werden kann. Ersteres ließ sich im UV-Detektor der HPLC erkennen, letztere im MS detektieren.

Hemmeigenschaften gegenüber AChE

Alle drei stellungsisomeren EMP-APO wiesen Hemmeigenschaften gegenüber dem Enzym AChE auf (s. dazu Kapitel D.5), was als Hinweis auf die Organophosphatstruktur dient.

D.2.4 Quantifizierung des EMP-APO

Die Quantifizierung erfolgte über Versetzen der POx-Lösung mit KOH, wodurch eine Hydrolyse zu Oxim und EMPS stattfand. Letztere wurde über LC-MS erfasst und anhand einer Kalibriergerade ($R^2 = 0,9987$) in Doppelbestimmung quantifiziert (s. E.2.5 und D.4.3). Die Konzentration der gebildeten EMPS wurde gleich der der APO-POx gesetzt. Dies ergab in den Fraktionen eine Konzentration von bis zu 200 μM APO-POx. Da das Fraktionsvolumen größer als das Injektionsvolumen war, fand beim Fraktionieren eine Verdünnung gegenüber der Reaktionslösung statt.

Durch die Quantifizierung konnte die jeweilige Konzentration an APO-POx in der Fraktion ermittelt werden. Die parallel dazu mit der reinen POx-Fraktion unternommene HPLC-UV-Analyse lieferte eine dieser Konzentration entsprechende Peakfläche bei einer bestimmten Wellenlänge. Setzte man die für die Fraktion bekannter Konzentration ermittelte Peakfläche mit der Peakfläche des POx im gesamten Reaktionsansatz (unfraktioniert) ins Verhältnis, konnte die Konzentration des POx im Reaktionsansatz abgeschätzt werden. Für den Gleichgewichtszustand eines 5 mM äquimolaren Ansatzes liegt diese in der Größenordnung von 600 μM , was 12% der Ausgangskonzentration der Reaktionspartner entspricht.

D.2.5 **Bildungskinetiken des EMP-APO in verschiedenen Reaktionsmedien**

Die Reaktion der EMP-APO-Bildung in Wasser verlief relativ langsam. Maximale POx-Konzentrationen wurden bei 2-, 3-, und 4-APO jeweils nach ca. 25 h (1500 min) erreicht, hier bildete sich ein Plateau.

Durch Variation des Inkubationsmediums wurde versucht, die Reaktion der POx-Bildung zu optimieren:

Da dem Mechanismus nach pro Mol gebildeten POx ein Mol Protonen entsteht, sollte sich der pH-Wert mit zunehmender Reaktion zum Säuren verschieben. Dies belegte eine als Vorversuch durchgeführte potentiometrische pH-Messung.

Eine Pufferung des Systems schien also sinnvoll, um eine Veränderung des pH-Wertes während der POx-Bildung zu verhindern. Ferner sollten pH-Werte im alkalischen Bereich die POx-Bildung beschleunigen, da das Oximat, also die deprotonierte Form die reaktivere, da nucleophilere Form des Oxims darstellt. Mit dem vereinfachten System des 4-APO wurden Versuche zum optimalen Reaktionsmedium und pH-Bereich unternommen.

Hierzu wurde die POx-Bildung in einem äquimolaren Ansatz von 1 mM 4-APO und VX in Glycin-Puffer 100 mM pH 9, MOPS-Puffer 100 mM pH 7,5, Phosphatpuffer 100 mM pH 7,4 und Formiat-Puffer 100 mM pH 3 mit der Reaktion in purem Aqua puriss. verglichen.

Wie für eine S_N-Reaktion zu erwarten, verlief die POx-Bildung in Glycin-Puffer bei pH 9 schneller als in allen anderen Puffern. Auch die maximalen POx-Konzentrationen waren zufrieden stellend. Diese wurden bereits nach ca. 750 min, also nach ca. der Hälfte der Zeit verglichen mit dem Ansatz in Wasser erreicht.

Im Formiat-Puffer, d.h. bei pH 3, war keine POx-Bildung zu beobachten. Reaktion in Phosphatpuffer ergab trotz des leicht alkalischen pH-Wertes von 7,4 nur eine minimale POx-Bildung, ca. 10 % derer in Wasser. Das Maximum wurde nach ca. 1500 min erreicht. Interessanterweise verlief die Reaktion im auf pH 7,5 gepufferten MOPS-Puffer gänzlich anders. Hier bildeten sich POx-Konzentrationen in Höhe derer der Reaktion im Glycin-Puffer, allerdings sehr viel langsamer, nämlich ab ca. 3000 min. Ein relevanter Zerfall des POx konnte während des Messzeitraumes nicht festgestellt werden. Vielmehr blieben die Konzentrationen konstant.

Die POx-Konzentrationen, die sich in reinem Wasser bildeten, wurden allerdings durch keine Reaktion im gepufferten Medium erreicht. Erstaunlicherweise lieferte reines Wasser als Inkubationsmedium mit Abstand die höchsten Ausbeuten. Grund hierfür könnte eine Behinderung der POx-Bildung durch hohe Pufferkonzentrationen sein.[115]

Um diesen Effekt abschätzen zu können, wurden vergleichende Versuche mit reduzierten Pufferkonzentrationen und sonst gleichen Reaktionsbedingungen (RT, äquimolar 1 mM Oxim und VX) durchgeführt. So zeigte die Reaktion in einem MOPS-Puffer der Konzentration 10 mM (pH 7,5) einen ähnlichen Reaktionsverlauf wie schon mit 10fach höherer Pufferkonzentration. Auch Glycin-Puffer der Konz. 10 mM (pH 9) ergab weder deutliche Änderungen in der Reaktionsgeschwindigkeit noch in der Ausbeute. Als Gegenbeweis wurde APO mit VX in einer Kochsalz-Lösung der Konzentration 100 mM unter sonst gleichen Bedingungen zur Reaktion gebracht und der Reaktionsverlauf mit dem in reinem Wasser verglichen. Die POx-Bildung verlief zu Beginn etwas langsamer, die Ausbeute erreichte dann aber das gleiche hohe Niveau wie in wässriger Lösung. Da Kochsalz keine Pufferkapazität aufweist, ist während der Reaktion von einer pH-Verschiebung analog der Reaktion in Wasser auszugehen. Die Anwesenheit reiner Salzkonzentrationen beeinflusst die Reaktionsgeschwindigkeit nur wenig. Somit scheint die verlangsamte POx-Bildung in den übrigen Puffermedien durch den pH-Wert oder die Struktur der Puffersubstanzen bedingt zu sein. Eventuell sind die im Vergleich zum Kochsalz größeren Moleküle Glycin und MOPS zu einer Abschirmung der Reaktionskomponenten besser befähigt. Dass die Ausbeuten in allen gepufferten Medien geringer als in Wasser sind, lässt sich nur ansatzweise erklären. Bei niedrigen pH-Werten (Citrat- und Formiat-Puffer) liegt evtl. zu wenig Oximat für einen guten Reaktionsverlauf vor.[89;107] Bei neutralen bis alkalischen pH-Werten könnte wiederum die Hydrolyse des gebildeten POx zum Oxim und der, im Falle von VX, EMPS für eine geringere absolute Ausbeute verantwortlich sein. Durch Zerfall des POx bildet sich zwar wieder Oxim, aber kein VX, sondern EMPS, so dass die Konzentration an VX mit zunehmendem Reaktionsverlauf abnimmt, während die des Oxims auf einem höheren Niveau bleibt.

Wasser zeigte sich also von allen verwendeten Inkubationsmedien als das, welches die besten Ausbeuten an POx lieferte.

D.3 Darstellung phosphonylierter N-Methyl-formylpyridiniumoximiodide

D.3.1 Synthese der N-Methyl-formylpyridiniumoxime

Während 3- und 4-PAM-Iodid analog der APO-Reihen synthetisiert wurden, wurde 2-PAM-Iodid aus dem käuflich zu erwerbenden 2-PAM-Chlorid durch Umsalzen in wässriger Lösung erhalten.

Ginsburg et al. hatten wie schon für APO auch für PAM zwei isomere Formen dargestellt, wobei auch hier die B-Serie deutlich höhere Schmelzpunkte zeigte, die mit denen der synthetisierten Stoffe harmonierten, was für das Vorliegen reiner B-Serie spricht.[84] Die Kontrolle der Reinheit der synthetisierten PAM-Oxime erfolgte mittels der für Obidoxim entwickelten HPLC-Trennung mit UV-Detektion (HPLC-Methode 1). Bei 2-, 3- und auch 4-PAM zeigten sich dabei jeweils 2 Peaks, nämlich ein kleiner Peak, der kurz vor einem großen Peak eluiert. Die zuerst eluierenden kleinen Peaks hatten eine Fläche von 0,7 % (2-PAM), 2,0 % (3-PAM) und 1,7 % (4-PAM) des jeweiligen Hauptpeaks. Der Vergleich der mit einem Diodenarray-Detektor aufgenommenen Spektren der Peaks ergab folgendes Bild:

2-PAM-Lösung: 3,8 min: $\lambda_{\max} = 216$ und 273 nm

4,2 min: $\lambda_{\max} = 222$ und 294 nm

3-PAM-Lösung: 4,0 min: $\lambda_{\max} = 225$ und 249 nm

4,2 min: $\lambda_{\max} = 226$ und 253 nm

4-PAM-Lösung: 4,3 min: $\lambda_{\max} = 216$ und 277 nm

4,8 min: $\lambda_{\max} = 218$ und 279 nm

Die Ähnlichkeit der UV-Spektren und das Eluieren mit ähnlichen Retentionszeiten legen eine verwandte Struktur nahe. Es wurde postuliert, dass es sich, wie bei den APO-Oximen, um das syn- und das anti-Isomer handelt. Publikationen belegen das Vorhandensein dieser Isomere in Lösung, auch wenn es selten gelungen ist, diese voneinander zu trennen oder zu isolieren.[87;91]

Um weitere Indizien für die Theorie zu finden, wurden jeweils beide Peaks fraktioniert. Zunächst musste, nach der Erfahrung mit 4-APO, herausgefunden werden, ob ebenfalls eine

rasche Umwandlung der Peaks ineinander eine weitere Analytik erschwerte. Zu diesem Zweck wurden beide Fraktionen jeweils in einem erneuten HPLC-Lauf analysiert. Dabei zeigte sich, dass eine ausreichende Stabilität vorlag und keine rasche Umlagerung stattfand. Nun konnten die Fraktionen mittels FIA im MS untersucht werden. Das Spektrum im Full-Scan-Modus ergab für alle Peaks das Masse-Ladungsverhältnis m/z 137. Dies entspricht der für PAM errechneten Molekülmasse. Fragmentierung des Moleküls mit m/z 137 bei einer Collision Energy von 23 ergab als Hauptfragmente m/z 120 und 93. Bei höherer Collision Energy (53) wurden als weitere Bruchstücke m/z 119, 92, 78 und 66 sichtbar. Das Fragmentmuster aller untersuchten Fraktionen glich sich, so dass in allen Fällen von PAM ausgegangen werden konnte.

Die Fragmente lassen sich durch die in Abbildung D.3-1 gezeigten Strukturen erklären:

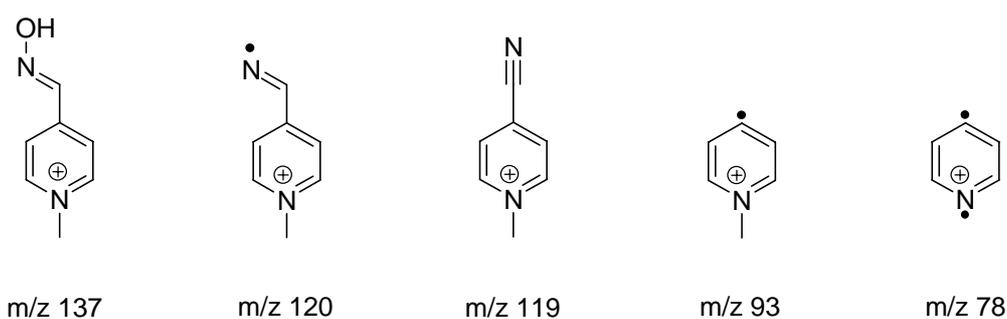


Abbildung D.3-1:

Mögliche Strukturen der bei Product-Ion-Scan von m/z 137 sichtbaren Fragmente

Somit konnte gezeigt werden, dass es sich bei beiden Peaks um isomere Formen derselben Substanz handeln muss. Hierfür kommt nur eine syn- und anti- Isomerie in Frage. Das Vorhandensein der Isomere zeigten bereits Ginsburg et al. Diese gaben auch an, dass die A-Serie sich als Feststoff bei RT in das B-Isomer umwandelt.[84] Carlström identifizierte das stabile 2-PAM-Isomer mittels Röntgenstruktur als das syn-Isomer.[90] Somit sollte die B-Serie syn-Konfiguration besitzen. Utley konnte das Vorhandensein von zwei 2-PAM-Isomeren in Lösung mittels HPLC-Trennung an einer RP-Phase nachweisen. Der kleinere Peak eluierte vor dem großen und zeigte eine Fläche von ca. 3% der Gesamtfläche beider Peaks. UV-Bestrahlung der Lösung führte zu einer Zunahme des zuerst eluierenden Peaks mit einer maximalen Fläche von 55 % nach 24 h, stellt also die energiereichere Form dar. Utley definierte den zuerst eluierenden Peak als anti-2-PAM.[87]

D.3.2 Synthese des EMP-PAM-Iodids

D.3.2.1 Reaktionsansatz und Isolierung

Um den Beweis anzutreten, dass die gute Ausbeute an APO-POx und die geringe Anzahl der bei der Reaktion entstandenen Peaks an der nicht vorhandenen Möglichkeit der cyclischen β -cis-Eliminierung am APO-Oxim liegt, wurden zum Vergleich die Versuche analog mit 2-, 3- und 4-PAM durchgeführt. In Wasser gelöst wurden sie, wie auch die 2-, 3- und 4-APO-Oxime, in Konzentrationen von 5 mM mit 5 mM VX bei Raumtemperatur (23°C) zur Reaktion gebracht. Die Größe des Reaktionsansatzes betrug ebenfalls je 1000 μ l. Aliquote des Reaktionsgemisches wurden zu je 50 μ l mit der für den Referenz-Reaktionsansatz von VX mit Obidoxim entwickelten HPLC-Methode 1 getrennt und die POx-Fraktion sowie andere relevante Peaks durch Peak-Fraktionierung gesammelt.

Diese gesammelten Fraktionen wurden dann massenspektrometrisch durch FIA identifiziert.

D.3.2.2 Reaktionsprodukte

Hier zeigten sich in den Chromatogrammen neben den PAM-Peaks wie erwartet weitere Absorptionsmaxima. Eine bei Umsetzung des 3- und 4-PAM entstandene Substanz eluierte in einigem Abstand hinter den Oximen (Ret. 12,4 min bei EMP-3-PAM und 13,8 min bei EMP-4-PAM) und konnte als POx identifiziert werden (s D.3.2.3.).

Neben den PAM-Isomeren und den POx fiel in allen drei Fällen vor allem noch ein weiterer Peak auf, der nur eine geringe Retention auf der Säule zeigte und nach 2,3 min eluierte. Da ein solcher Peak bei den APO-POx-Ansätzen gefehlt hat, lag die Vermutung nahe, dass es sich um ein Abbauprodukt der POx über die bei der PAM-POx ermöglichte, bei der APO-POx aber verhinderte cyclische β -Eliminierung handelt. Die Literatur gibt das Entstehen eines Nitrils an.[107]

Um das Entstehen des Nitrils nachzuweisen, wurde das N-Methyl-3-cyanopyridiniumiodid durch N-Methylierung des 3-Cyanopyridins synthetisiert, das auch beim Zerfall des EMP-3-PAM entstehen müsste (s. E.2.1.3). Durch HPLC-Trennung mit derselben Methode, die zur Trennung der PAM-POx-Ansätze verwendet wurde (HPLC-Methode 1), konnte die gleiche Retentionszeit festgestellt werden. Auch das UV-Spektrum im Diodenarray-Detektor war identisch. Die LC-MS-MS-Analyse der Nitril-HPLC-Fraktion und der Vergleich der

entstehenden Fragmente mit denen des synthetisierten Standards ergaben Deckungsgleichheit. Auch die Massen und Zerfallsmuster der Fraktionen des bei 2- und 4-PAM-POx entstehenden Peaks stimmten mit dem des Standards überein.

Die Entstehung des Nitrils konnte für den 3-PAM-VX-Ansatz also nachgewiesen werden. Wässrige 3-PAM-Lösungen waren sehr stabil und zeigten auch nach mehreren Tagen keine relevante Nitrilbildung. Dies legt den Schluss nahe, dass die Reaktion mit VX die Nitrilbildung begünstigt und das Nitril überwiegend aus dem POx hervorgeht.

Es lässt sich also schlussfolgern, dass POx tatsächlich unter Beteiligung eines betaständigen H-Atoms abgebaut wird, da APO und PAM sich nur im Substituenten an dieser Position unterscheiden. Dies legt den in der Literatur beschriebenen Mechanismus einer β -Eliminierung nahe.

D.3.3 Identität der EMP-PAM

In den Reaktionsansätzen konnten Peaks entdeckt werden, die von ihren Retentionszeiten her aus der Erfahrung mit den EMP-APO heraus POx hätten sein können.

UV-Spektren

Die Absorptionsmaxima stellten sich wie in Tabelle D.3-1 gezeigt dar.

Tabelle D.3-1:

Gegenüberstellung der Absorptionsmaxima im UV-Licht der stellungsisomeren PAM und EMP-PAM. Werte in Klammern stellen Schultern und keine isolierten Maxima dar. Die PAM-Maxima beziehen sich auf das Hauptstereoisomer. Aufgenommen mit Diodenarray-Detektor in Methanol-Wassergemisch mit 0,1M Ammoniumformiat.

Stellungsisomer	λ_{\max} PAM [nm]	λ_{\max} EMP-PAM [nm]
2-	222 + 294	224 + 297
3-	226 + 253	218 (+ 243 + 281)
4-	218 + 279	211 + 255

Das UV-Spektrum der POx-Peaks zeigt eine Verschiebung der Absorptionsmaxima gegenüber dem der reinen Oxime zu kleineren Wellenlängen hin, wie dies in der Literatur beschrieben ist und für APO-POx nachgewiesen werden konnte.[118;123]

Hier traf dies nur auf 3- und 4-PAM-POx-Ansätze zu, nicht jedoch auf 2-PAM, was bei diesem gegen das Vorliegen von POx spricht.

MS-Analyse

Um die Identität des POx nachzuweisen, wurden wiederum Fraktionen des entsprechenden Peaks gesammelt. Analyse des Masse-Ladungsverhältnisses des Molekülpeaks und der Fragmente für EMP-3- und EMP-4-PAM mittels MS-MS ergab folgendes Bild:

Der Molekülpeak zeigte das Masse-Ladungsverhältnis m/z 243. Das Molekül fragmentierte zu Bruchstücken mit den Masse-Ladungsverhältnissen m/z 119, 103, 92, 78, was sich mit den unter D.3.1 gezeigten Molekülen erklären und somit eindeutig der Pyridinium-Strukturen zuordnen lässt.

Für 2-PAM gelang kein Nachweis der POx-Bildung bei Reaktion mit VX. Zwar zeigte sich bei HPLC-Trennung ein Peak bei 11,5 min, der eventuell einem POx entsprechen könnte, allerdings fiel der optische Test auf Hemmaktivität für die gesammelte Fraktion des vermeintlichen EMP-2-PAM negativ aus. Außerdem lagen die Absorptions-Maxima bei 224 und 297 nm und somit hypsochrom verschoben, während bei den übrigen POx eine bathochrome Verschiebung erschien. Die Analysen der Fraktionen per LC-MS zeigten keinen Molekül-Peak von m/z 243.

Hemmeigenschaften gegenüber AChE

Ein qualitativer optischer Test auf Hemmaktivität gegenüber erythrocytärer AChE war für EMP-3- und EMP-4-PAM positiv.

Alle gezeigten Ergebnisse wiesen auf das Vorliegen von EMP-3- und EMP-4-PAM hin, während kein Hinweis auf das Vorhandensein von EMP-2-PAM gefunden werden konnte.

Dies deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, in denen gezeigt wurde, dass 3- und 4-PAM stabile POx bilden, während bei 2-PAM keine relevante POx-Bildung, bzw. ein schneller Zerfall zu beobachten sein soll (Halbwertszeit < 2 min).[11;112] Es ist also denkbar, dass sich zwar zunächst EMP-2-PAM bildete, aber nach der auf der Säule erfolgten Abtrennung des POx aus dem Reaktionsgemisch bereits ein weitgehend kompletter Zerfall stattfand, was seine Detektion verhinderte.

D.3.4 Quantifizierung der EMP-PAM

Da eine weitergehende Analyse der EMP-PAM nicht vorgesehen war, erfolgte die Quantifizierung ohne die bei EMP-APO angewendete MS-Analytik. Vielmehr wurde nur eine einfache Abschätzung aufgrund der Peakflächen bei der HPLC-Trennung vorgenommen. Dieses Vorgehen basierte auf der Annahme, dass in etwa gleiche Verhältnisse in den Extinktionskoeffizienten zwischen PAM und PAM-POx vorliegen wie bei APO und APO-POx (s. hierzu D.2.4.). Die Ausbeuten lagen im Bereich von 3-5% der Eduktkonzentrationen.

D.4 Darstellung von EMP-, n-BMP- und i-BMP-Obidoxim

D.4.1 Synthese des EMP-, n-BMP- und i-BMP-Obidoxims

D.4.1.1 Reaktionsansatz und Isolierung

Wie auch schon bei der Darstellung der APO- und PAM-POx wurde eine wässrige Lösung des Obidoxims mit V-Stoff versetzt, so dass sich eine äquimolare Lösung der Konzentration 5 mM ergab. Im Gegensatz zu D.2. und D.3. kamen dabei aber neben VX auch VR und CVX zum Einsatz.

Aliquote des Reaktionsgemisches wurden zu je 50 µl im Falle des EMP-Obidoxims über HPLC-Methode 1, bei n- und i-BMP-Obidoxim über HPLC-Methode 2 getrennt.

D.4.1.2 Reaktionsprodukte

Es zeigte sich die bereits erwähnte Vielfalt an entstehenden Peaks. Aus der Literatur waren einige Substanzen bekannt, mit deren Auftreten auch hier zu rechnen sein sollte.[115]

Die Verwendung der Edukte wie V-Stoffe und Obidoxim als Standards sowie die Ermittlung der Masse-Ladungsverhältnisse der Molekülpeaks und deren Fragmente nach LC-MS-MS-Analyse ermöglichten die Zuordnung der meisten Peaks (Details s. D.4.2). Hilfreich war hierbei auch die Erfahrung aus den vorangegangenen Versuchen mit APO und PAM.

Für eine HPLC-Trennung eines VX-Obidoxim-Ansatzes ergab sich das in Abbildung D.4-1 und Tabelle D.4-1 gezeigte Bild. Die Zuordnung der Masse-Ladungsverhältnisse erfolgte über eine LC-MS-Trennung mittels LC-MS-Methode 1.

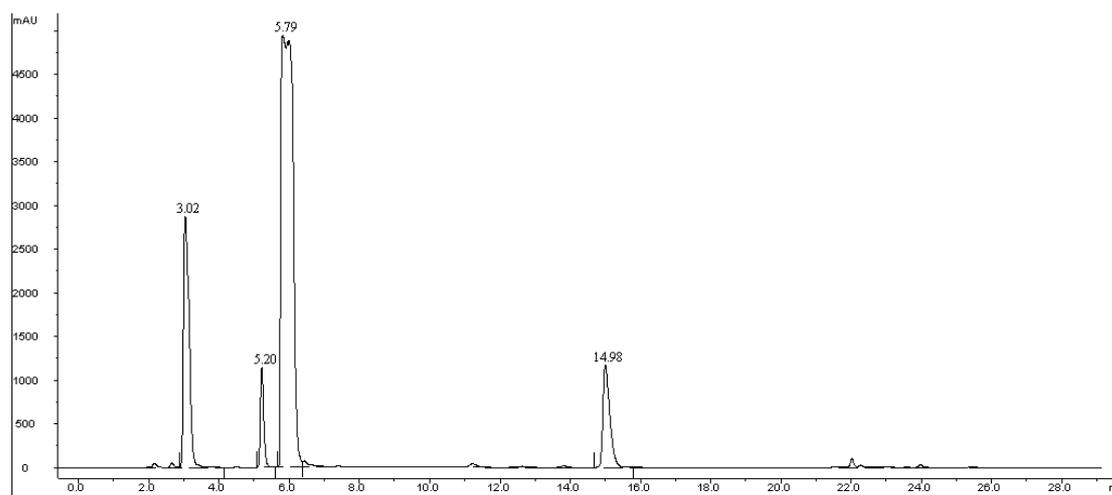


Abbildung D.4-1:

Chromatogramm der HPLC-Trennung eines äquimolaren Reaktionsansatzes von VX und Obidoxim der Konzentration 5 mM nach 1h 20 min bei 3°C über HPLC-Methode 1. Zuordnung der Peaks wie in Tabelle D.4-1

Tabelle D.4-1:

Zuordnung der Peaks des Chromatogramms D.4-1 zu verschiedenen Masse-Ladungsverhältnissen m/z und den identifizierten Substanzen. Details dazu in D.4.2.

Retentionszeit [min]	m/z	Substanz
3,02	135	Obidoxim-Mononitril
5,20	287, 144	syn-anti-Obidoxim
5,79	287, 144	syn-syn-Obidoxim
14,98	397, 197	EMP-Obidoxim

Nach längeren Reaktionszeiten als den hier gezeigten wurde ein weiterer Peak bei ca. 6,2 min erkennbar, der nahezu basisliniengetrennt direkt nach dem syn-syn-Obidoxim eluierte. Er besaß das Masse-Ladungsverhältnis von m/z 260 und ließ sich als Obidoxim-Monopyridon identifizieren (Details s. D.4.2).

Aufgrund der im UV-Detektor sichtbaren Peakzahl scheint der lange HPLC-Lauf mit dem recht aufwendigen Gradienten eventuell übertrieben. Betrachtet man dagegen die im Massenselektiven Detektor zusätzlich erscheinenden Peaks, wie in Tabelle D.4-2 gezeigt, wird deutlich, dass sich die Trennung komplizierter darstellt. Zu ähnlichen Retentionszeiten wie EMP-Obidoxim eluierten nämlich auch Methylthiophosphorsäure-S-(2-N,N-diisopropylaminoethyl)ester, der selbst noch Hemmaktivität auf AChE ausüben kann (s. auch B.1.3) und die Abgangsgruppe des VX, das N,N-Diisopropylaminoethylsulfid. Das Abtrennen

dieser Substanzen vom POx erwies sich als kompliziert und konnte nur mit dieser langen Trennmethode erreicht werden. Der giftige Metabolit des VX war eine Verunreinigung der Substanz, die nicht durch die Reaktion mit Obidoxim gebildet wurde. Dies zeigten Vergleichsanalysen mit reinem VX. Auch das Thiol als Abgangsgruppe des VX lag in gewissem Maß als originäre Verunreinigung vor. Hier zeigte sich aber eine Zunahme mit Fortschreiten der nucleophilen Substitution am Phosphor.

Tabelle D.4-2:

Zusätzlich in einer LC-MS-Analyse eines VX-Obidoxim-Reaktionsansatzes der äquimolaren Konzentrationen 1 mM mit Q1-Scan identifizierte Peaks

Retentionszeit [min]	m/z	Substanz
13,5	240	Methylthiophosphonsäure-S-(2-N,N-diisopropylaminoethyl)ester
13,8	162	N,N-Diisopropylaminoethylsulfid
24,4	321	Bis(2-N,N-diisopropylaminoethyl)disulfid
25-25,5	268	VX

Die Trennmethode HPLC 1 wurde zuerst am Modell des VX und Obidoxims etabliert und kam dann auch für die VR- und CVX-Ansätze zum Einsatz. Hierbei eluierten Obidoxim-Mononitril und beide Obidoxim-Isomere in etwa nach gleichen Retentionszeiten wie beim VX-Obidoxim-Ansatz, was den Schluss nahe legt, dass es sich um die selben Substanzen handelt, wie dies auch zu erwarten ist. Es trat jedoch anders als bei EMP-Obidoxim kein POx-Peak bei ca. 15 min in Erscheinung, vielmehr aber ein Peak bei 23,1 min bei VR- und CVX-Obidoxim-Ansätzen. Diese Peaks konnten als POx identifiziert werden (s. auch D.4.2).

Das Ergebnis der chromatographischen Trennung des VR-Ansatzes zeigt Abbildung D.4-2.

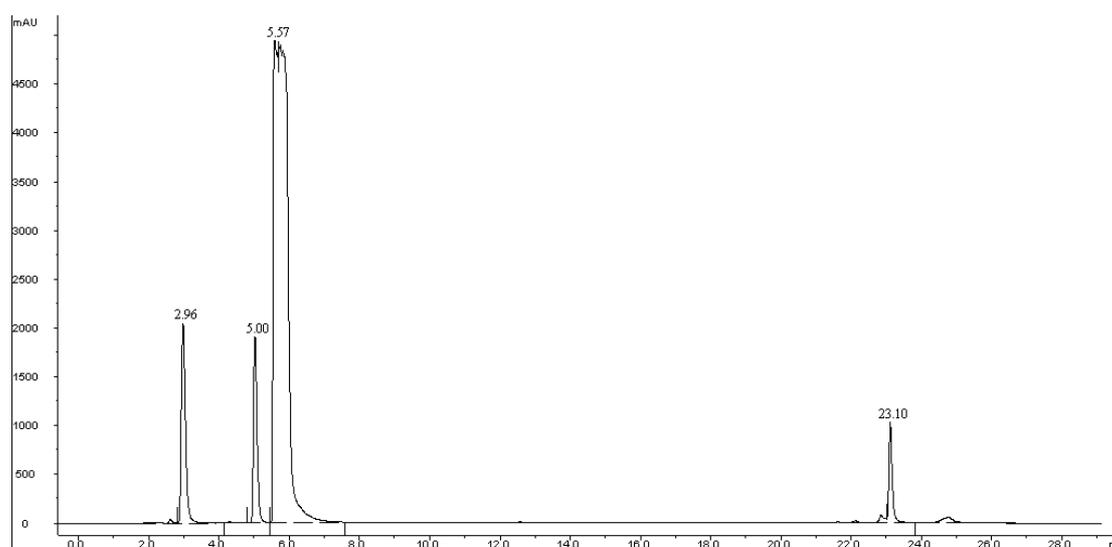


Abbildung D.4-2 :

Chromatogramm der HPLC-Trennung eines äquimolaren Reaktionsansatzes von VR und Obidoxim der Konzentration 5 mM nach 1h bei 3°C über HPLC-Methode 1. Elution von Mononitril erfolgte bei 2,96 min, die des syn-anti-Obidoxims bei 5 min und die des syn-syn-Obidoxims bei 5,6 min, nahezu wie beim VX-Obidoxim-Ansatz. Hingegen eluierte n-BMP-Obidoxim erst nach 23,1 min.

Die drastische Verschiebung in der Retentionszeit ist bemerkenswert, da die relativ geringen strukturellen Unterschiede zwischen den konstitutionsisomeren V-Stoffen dies so nicht erwarten ließen.

Offensichtlich findet zwischen der stationären Phase und n-BMP- bzw. i-BMP-Obidoxim eine sehr starke Wechselwirkung statt, denn es sind hohe Konzentrationen an Methanol nötig, um diese zu überwinden. Der Grund hierfür dürfte in der im Vergleich zum Ethylrest des EMP-Obidoxims längeren Seitenkette zu suchen sein.

Durch die lange Retention der BMP-Obidoxime eluierten diese bei Verwendung der HPLC-Methode 1 in der Nähe der V-Stoffe und anderer Derivate, so dass diese nicht zu einer Fraktionierung reiner POx führte.

Die Entwicklung einer neuen Trennmethode zur Sammlung reinen BMP-Obidoxims war also nötig. HPLC-Methode 2 brachte die Lösung durch einen schnelleren Anstieg des Gradienten auf einen hohen Gehalt an Methanol und somit frühere Elution des POx ohne wesentliche Verschiebung der VR und CVX-Retentionszeit.

Es ergaben sich die in Tabelle D.4-3 aufgelisteten neuen Retentionszeiten für die im UV-Detektor sichtbaren Substanzen. Auch hier entstammen die angegebenen Masse-Ladungsverhältnisse einer mit derselben chromatographischen Methode durchgeführten LC-

MS-Analyse. Tabelle D.4.4 gibt weitere nur massenselektiv zu detektierende Substanzen des Gemisches an.

Tabelle D.4-3:

Auftretende Peaks einer HPLC-Trennung eines Reaktionsgemisches aus VR und Obidoxim in äquimolaren Konzentrationen von 5 mM unter Verwendung der HPLC-Methode 2.

Retentionszeit [min]	m/z	Substanz
2,81	135	Obidoxim-Mononitril
4,31	287, 144	syn-anti-Obidoxim
4,72	287, 144	anti-anti-Obidoxim
13,8	421	i-BMP-Obidoxim

Tabelle D.4-4:

Zusätzlich zu den in Tabelle D.4-3 auftretende Peaks einer LC-MS-Analyse eines VR-Obidoxim-Reaktionsansatzes der äquimolaren Konzentrationen 1 mM mit Q1-Scan über LC-MS-Methode 2.

Retentionszeit [min]	m/z	Substanz
5,6	212	Methylthiophosphonsäure-S-(2-N,N-diethylaminoethyl)ester
9,6	134	2-N,N-Diethylaminoethylsulfid.
17,5-18	268	VR

Für die CVX-Obidoxim-Reaktion ergab sich ein ganz ähnliches Bild wie das für VR gezeigte. Das BMP-Obidoxim eluierte nun deutlich früher als mit HPLC-Methode 1 und war deutlich getrennt von VR bzw. CVX.

Auch die Abgangsgruppe und vor allem der toxische Metabolit eluieren deutlich früher.

D.4.2 Identität und Reinheit des EMP-, i-BMP- und n-BMP-Obidoxims

D.4.2.1 Identität

Verschiebung des UV-Absorptionsmaximums

Im Diodenarray-Detektor zeigten EMP-, n-BMP- und i-BMP-Obidoxim maximale Absorption bei der Wellenlänge 275 nm. Da das Absorptionsmaximum des Obidoxims je nach Lösungsmittel zwischen 284 und 286 nm liegt, lässt sich hier die von Waser et al. und Becker et al. beschriebene hypsochrome Verschiebung nachweisen[118;123].

LC-MS-MS-Analyse

Die verschiedenen POx wurden auch hier wieder durch die Fraktionierung der entsprechenden Peaks und Fusion der Fraktionen mehrerer Trennungen gewonnen und wie in D.1.3. beschrieben identifiziert.

Der Molekülpeak bei der LC-MS-Analyse zeigte m/z 397 im Falle des EMP-Obidoxims, was der Gesamtmasse -1 entspricht. Dies kommt zustande durch Abstrahieren eines Protons der Oximgruppe, wodurch das Molekül zu einem partiellen Ladungsaustausch befähigt ist und nur noch eine positive Ladung trägt. Als Cluster des POx konnte auch ein Peak bei m/z 439 nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte ein Peak von m/z 197 als Molekülpeak mit zwei positiven Ladungen identifiziert werden. Ein Scan der Product-Ions der m/z 197 lieferte verschiedene Fragmente (s. Abbildung D.4-3). Das Fragmentierungsmuster zeigte aufgrund der gefundenen m/z 136 und 119, 105 und 93 das Vorliegen einer Pyridin-Struktur an. Product-Ion-Scan von m/z 397 wies zusätzlich noch m/z 367, 269, 239 und 135 auf.

Abbildung D.4-4 zeigt die vermuteten zugrunde liegenden Strukturen.[105;106;115]

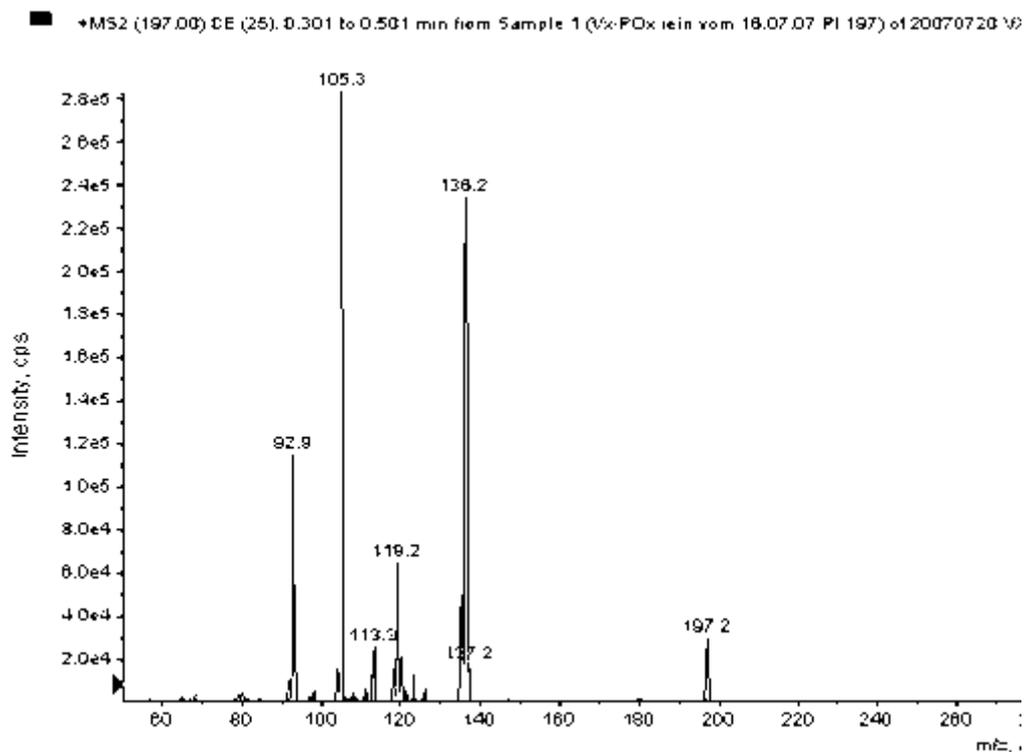


Abbildung D.4-3:

Fragmentmuster eines Scans der Product-Ions von m/z 197 aus reinem EMP-Obidoxim.

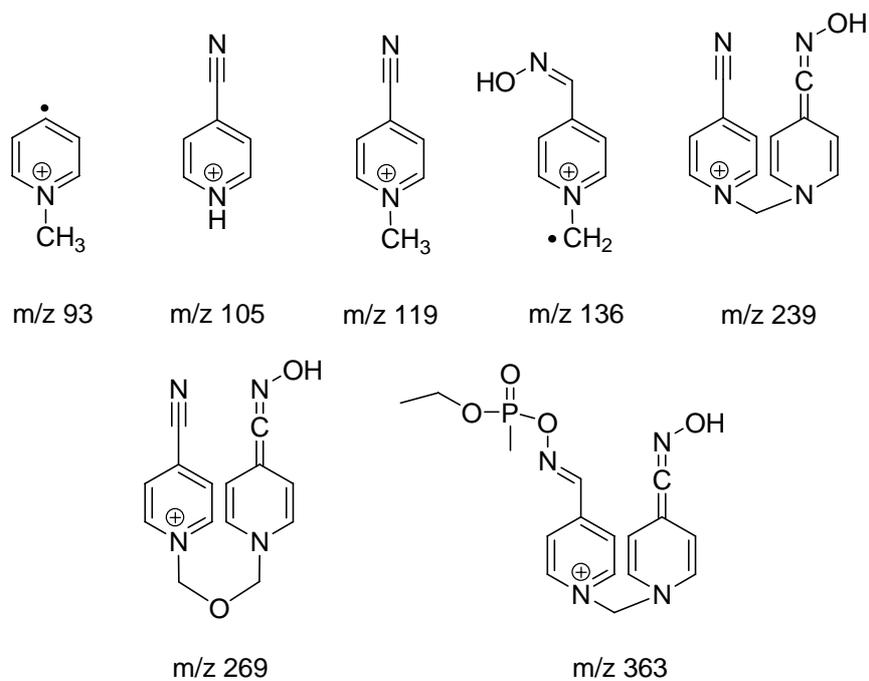


Abbildung D.4-4:

Mögliche Strukturen der EMP-Obidoxim-Fragmente.

Offensichtlich kommt es bei der Ionisierung des POx im Elektrospray teilweise zur Nitril-Bildung durch Eliminierung.

Im Falle von n- und i-BMP-Obidoxim zeigten die Molekülpeaks reiner POx-Fractionen Masse-Ladungsverhältnisse von m/z 421, was wieder der um eine Einheit reduzierten Molekülmasse entspricht. m/z 211 stellt das doppelt positiv geladene BMP-Obidoxim-Molekül dar. Auch hier ist ein Peak mit höherer Masse, in diesem Fall mit m/z 467 zu sehen, was vermutlich auf ein Formiat-Cluster (Molekülpeak + m/z 45) zurückzuführen ist.

Betrachtet man den Product-Ion-Scan für m/z 421 fallen folgende Fragmente auf: m/z 391, 269, 239, 165 und 135. Während m/z 269 und 135 den o.g. Fragmenten des EMP-Obidoxims entsprechen, stellt 391 ebenfalls wieder das um m/z 31 gegenüber dem Molekülpeak reduzierte Fragment nach Eliminierung der Etherbrücke zwischen den beiden Pyridiniumringen dar. Auf welche Struktur m/z 165 zurückzuführen ist, ist nicht eindeutig klar. Butylmethylphosphonsäure besitzt die Molekülmasse 152 (m/z 153 im positiven Modus), so dass sie nicht für diesen Peak in Frage kommt. Abbildung D.4-5 zeigt das Spektrum der genannten Fragmente.

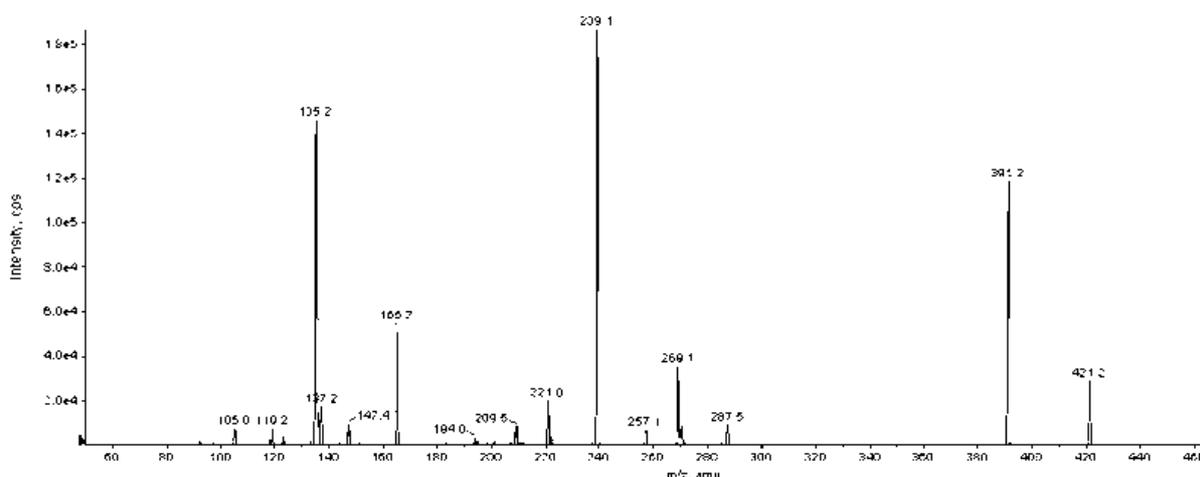


Abbildung D.4-5:

Fragmente der Product-Ion-Analyse von m/z 421 einer reinen i-BMP-Obidoxim-Fraktion

Inkubation mit KOH

Die Inkubation von EMP-Obidoxim mit KOH führte zur Abspaltung von EMPS, die sowohl zur Identifizierung wie auch zur Quantifizierung herangezogen wurde (D.4.3). EMPS konnte über LC-MS-Analytik nachgewiesen werden (s. LC-Methode 3).

Hemmaktivität gegenüber AChE

Die Fraktionen des EMP-Obidoxims zeigten deutliche Hemmaktivität (Details s. D.5).

D.4.2.2 Reinheit

Die Reinheitskontrolle über einen erneuten HPLC-Lauf (s. E.2.4) ergab, dass in Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen des gewonnenen POx und der vergangenen Zeit zwischen Fraktionierung und Reinheitsanalyse neben POx bis zu ca. 10 % Verunreinigungen auftraten. Diese konnten über LC-MS-MS-Analyse als Obidoxim, Obidoxim-Mononitril und Methylphosphonsäurederivate identifiziert werden, waren somit allesamt auf eine Spaltung des POx zurückzuführen. Die Fraktionierungsmethode war also geeignet, reines POx zu gewinnen, das dann allerdings z.T. einer Hydrolyse unterlag. Wurde das gewonnene phosphylierte Oxim direkt auf Eis gekühlt und anschließend bei -80°C gelagert, erwies es sich als stabil über Monate.

D.4.3 Quantifizierung des EMP-, i-BMP- und n-BMP-Obidoxims

Auch zur Quantifizierung der Obidoxim-POx wurde, wie schon für APO-POx (D.2.4) beschrieben, die Methode der alkalischen Hydrolyse verwendet. Zunächst wurden Kalibriergeraden der EMPS, i-BMPS oder n-BMPS in Doppelbestimmung angefertigt. Für den untersuchten Konzentrationsbereich von 5 – 50 μM ergab sich gute Linearität ($R^2 = 0,9987$ EMPS; $R^2 = 0,9963$ n-BMPS; $R^2 = 0,9976$ i-BMPS). Eine Fraktion des reinen POx wurde in Wasser auf 75%, 50% und 25% der Ausgangskonzentration verdünnt und je zwei Aliquote der reinen Lösung wie der Verdünnungen mit 10 % des vorgelegten Volumens an KOH (1 M) versetzt und für 2 h inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte Neutralisation des Ansatzes mit dem gleichen Volumen an HCl (1 M) und anschließend Analyse über LC-MS (LC-MS-Methode 3). Die jeweils aus den beiden Aliquoten einer Konzentration gemessenen Werte lagen eng beieinander (Variationskoeffizient in allen Fällen $< 3\%$). Über die vier so gemessenen POx-Konzentrationen ließ sich eine gute Linearität des entstandenen POx feststellen (R^2 in allen Fällen $> 0,99$). Um die Reproduzierbarkeit zu testen, wurden verschiedene POx-Fraktionen mit entsprechend jeweils unterschiedlichen Konzentrationen auf diese Art vermessen, mit Resultaten gleicher Güte. Zur absoluten Quantifizierung konnte

die so erhaltene Fläche mit der jeweiligen Kalibriergerade der Phosphonsäure verglichen werden. Zuvor musste jedoch die bereits durch Spontanhydrolyse vor KOH-Behandlung vorliegende Fläche, bestimmt in einem eigenen Lauf, abgezogen werden. Um eine Korrelation der POx-Konzentrationen mit ihren Peakflächen in der HPLC bei UV-Detektion untersuchen zu können, wurden o.g. Verdünnungen der POx in Wasser über HPLC-UV analysiert. Auch hier ergaben sich gute Korrelationen ($R^2 > 0,995$). Setzte man die so ermittelten Peakflächen der reinen POx-Fraktion nun bekannter Konzentration ins Verhältnis zu den bei der Fraktionierung aus dem POx-Reaktionsansatz gemessenen Flächen, lässt sich die Konzentration im Reaktionsansatz abschätzen. Die Ausbeuten lagen für äquimolare Ansätze (1 mM) in der Regel bei Konzentrationen zwischen 10 und 20 μM reinen POx bei ca. 300 μl Volumen pro Fraktion, die maximal in einem 5 mM äquimolaren Reaktionsansatz erreichten POx-Konzentrationen bei ca. 300 μM .

D.4.4 Kinetische Betrachtungen

D.4.4.1 Reaktionsgeschwindigkeit und Reaktionsordnungen

Wie bereits oben erwähnt, läuft bei der Direktreaktion zwischen Organophosphatverbindungen und Oximen, die ein zur Oximgruppe betaständiges Wasserstoffatom besitzen, ein komplexes Geschehen ab.

Durch Messung von Ab- oder Zunahme der Edukte oder Produkte einer Reaktion kann die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt werden.

Die Reaktionsgeschwindigkeit v ist wie folgt definiert:

$$v = -\frac{dc(A)}{dt},$$

wobei $c(A)$ die Konzentration des Stoffes A und t die Zeit darstellen. Die Reaktionsgeschwindigkeit gibt also die Veränderung der Konzentration von Stoffen mit der Zeit an.[126;127]

Die bei POx-Bildung und Zerfall auftretenden Reaktionen sollten mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten ablaufen, was sich über die Messung der Veränderung der Konzentrationen der reagierenden Stoffe mit der Zeit erfassen lässt.

Die Reaktionsgeschwindigkeit kann in unterschiedlicher Weise, je nach zugrunde liegendem Reaktionsmechanismus, von den vorliegenden Konzentrationen der Reaktanden abhängig sein. Nach dieser Konzentrationsabhängigkeit unterscheidet man üblicherweise verschiedene sog. Reaktionsordnungen:

Reaktion 0. Ordnung

Die Reaktionsgeschwindigkeit einer Reaktion 0. Ordnung ist unabhängig von der Reaktandenkonzentration.

Es gilt das Geschwindigkeitsgesetz

$$v(A) = \frac{dc(A)}{dt} = -k$$

wobei $v(A)$ die Geschwindigkeit der Veränderung der Konzentration von A, t die Zeit und k die Reaktionskonstante darstellen.

Durch Integration erhält man

$$c(A) = -k \cdot t + c_0(A),$$

wobei $c_0(A)$ die Ausgangskonzentration des Stoffes A ist.

Hier wird der lineare Zusammenhang zwischen Konzentration und Zeit deutlich. Auftragung der Konzentration $c(A)$ gegen die Zeit liefert eine Gerade mit der Steigung $-k$ und dem Ordinatenabschnitt $c_0(A)$. Die Halbwertszeit als Reaktionszeit, nach der die Hälfte des

Reaktanden umgesetzt ist, errechnet sich aus $t_{1/2} = \frac{c_0(A)}{2k}$.

Reaktion 1. Ordnung

Bei einer Reaktion 1. Ordnung gilt das Geschwindigkeitsgesetz

$$v(A) = \frac{dc(A)}{dt} = -k \cdot c(A)$$

v ist also abhängig von der Konzentration nur eines Stoffes.

Integration ergibt

$$\ln c(A) = -k \cdot t + \ln c_0(A)$$

Während die direkte Auftragung von $c(A)$ gegen t einen nichtlinearen Verlauf beschreibt, ergibt sich eine lineare Beziehung, wenn $\ln c(A)$ gegen t aufgetragen wird. Die resultierende Gerade weist die Steigung $-k$ und den Ordinatenabschnitt $\ln c_0(A)$ auf.

Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ errechnet sich für $c(A) = \frac{1}{2} c_0(A)$ aus

$$\ln \frac{\frac{1}{2} c_0(A)}{c_0(A)} = -k \cdot t_{1/2}$$

weshalb

$$t_{1/2} = \frac{1}{k} \ln(2) = \frac{0,693}{k}$$

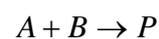
und somit unabhängig von der Konzentration des Reaktanden ist.

Reaktion 2. Ordnung

Reaktionen 2. Ordnung folgen dem Geschwindigkeitsgesetz

$$v = \frac{dc(A)}{dt} = -k \cdot c(A) \cdot c(B)$$

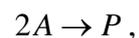
wenn zwei verschiedene Edukte zu einem Produkt reagieren, z.B. für die Reaktion



und

$$v = \frac{dc(A)}{dt} = -k \cdot c^2(A),$$

bei Beteiligung von zwei Molekülen nur eines Eduktes, z.B. für eine Reaktion



wobei A ein Edukt und P das Produkt darstellen.

Hier geht also die Anfangskonzentration des Eduktes A in der zweiten Potenz ein.

Integration ergibt

$$\frac{1}{c(A)} = k \cdot t + \frac{1}{c_0(A)}.$$

Auch hier zeigt die Auftragung der Konzentration gegen die Zeit einen nichtlinearen Verlauf. Der Kehrwert der Konzentration hingegen ist linear zur Zeit t . Es resultiert eine Gerade mit der Steigung k und dem Ordinaten-Abschnitt $\frac{1}{c_0(A)}$. Für $c(A) = \frac{1}{2}c_0(A)$ ergibt sich die

Halbwertszeit nach

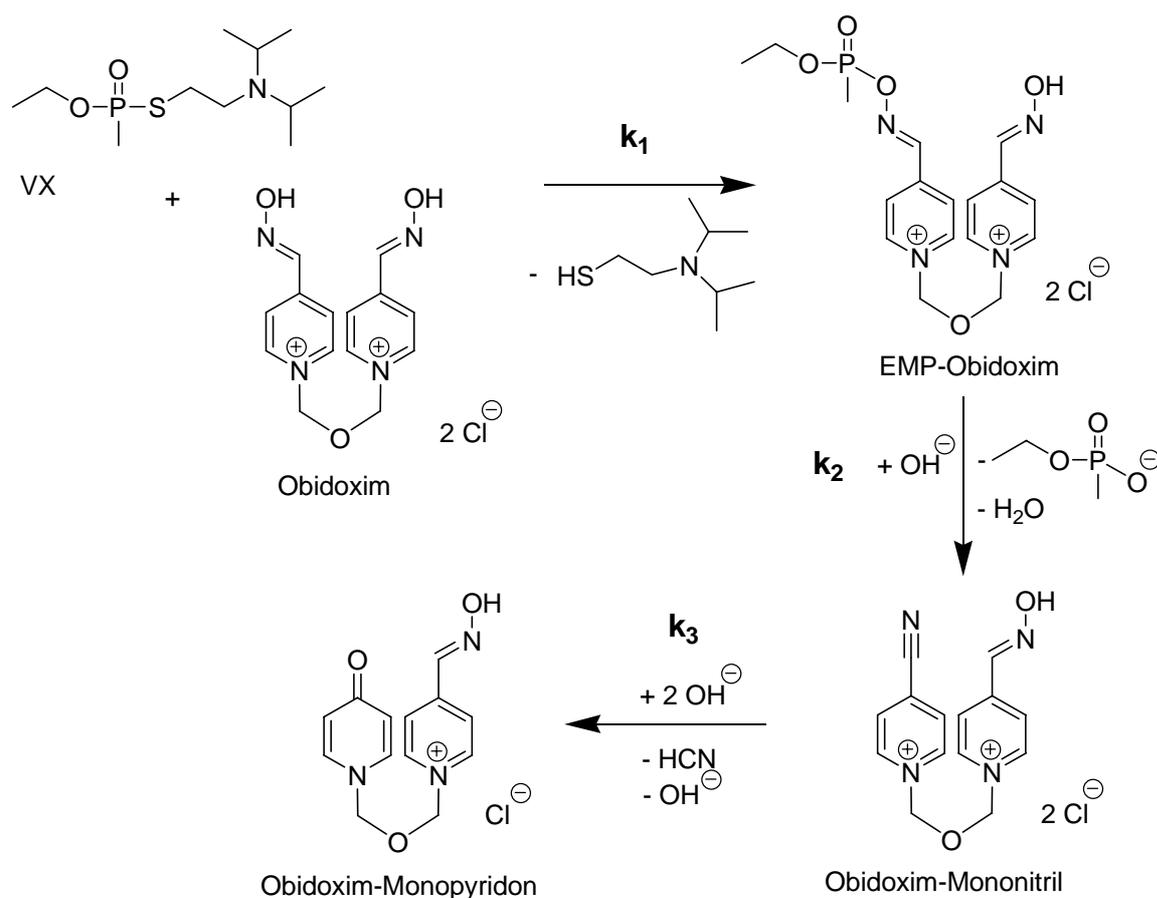
$$t_{1/2} = \frac{1}{k \cdot c_0(A)},$$

diese ist also abhängig von der Konzentration des Reaktanden.

Die Abhängigkeit der Geschwindigkeit von den Konzentrationen der Edukte ist unterschiedlich je nach zugrunde liegendem Mechanismus.[126;127] Wichtig sind also Informationen über den Mechanismus der ablaufenden Reaktion. Für einstufige Elementarreaktionen lässt sich dann unter Umständen die Reaktionsordnung aus der Reaktionsgleichung einer Reaktion und somit der Molekularität ableiten. Dann entspricht die Reaktionsordnung der Summe der Exponenten der an einer Reaktion beteiligten Stoffe.

D.4.4.2 Kinetische Betrachtung der Reaktion von VX und Obidoxim

Im vorliegenden Fall der POx-Bildung aus VX und Obidoxim und der sich anschließenden Zerfallsreaktionen laufen verschiedene Prozesse unterschiedlicher theoretischer Reaktionsordnung als Folgereaktionen ab, wie Schema 4-1 zeigt:



Schema D.4-1:

Reaktionswege der Bildung von EMP-Obidoxim durch Direktreaktion von VX und Obidoxim und Zerfall des EMP-Obidoxims über Bildung von Obidoxim-Mononitril zu Obidoxim-Monopyridon. k_1 , k_2 und k_3 stellen die Geschwindigkeitskonstanten der jeweiligen Reaktionen dar.

Die Veränderungen der Konzentrationen der Obidoxim-Isomere, des POx, des Mononitrils und des Monopyridons mit der Zeit wurden durch Entnahme von Aliquoten aus dem Reaktionsansatz zu bestimmten Zeitpunkten und deren Analyse über HPLC-UV gemessen. Die Fläche der resultierenden Peaks war dabei proportional der Konzentration der Stoffe.

Für die Reaktion von Obidoxim und VX, jeweils in der Konzentration 1 mM, bei einer Reaktionstemperatur von 37°C ergab sich folgendes Bild (Abbildung D.4-6):

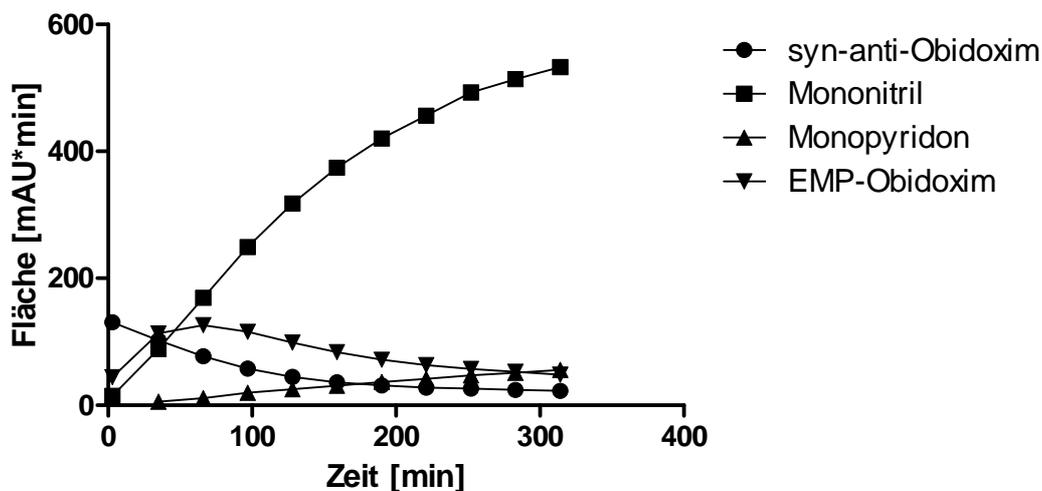


Abbildung D.4-6:

Veränderungen der Konzentrationen von syn-anti-Obidoxim, EMP-Obidoxim, Obidoxim-Mononitril und Obidoxim-Monopyridon mit der Zeit in einem Reaktionsansatz von 2 mM VX und 2 mM Obidoxim in Wasser bei 23°C. Auf die Darstellung des syn-syn-Obidoxims wurde hier verzichtet, da dessen Flächenwerte im Bereich 1000 mAU*ml und somit in einem anderen Größenbereich lagen.

Es wird deutlich, dass syn-anti-Obidoxim mit fortschreitender Reaktion abnimmt, während sich zunächst rasch POx bildet, das nach Überschreiten eines Höhepunktes wieder in der Konzentration absinkt. Die Konzentration von Mononitril nimmt bereits am Anfang stark zu, während Monopyridon erst zu einem späteren Zeitpunkt, mit einer gewissen Latenz, gebildet wird. Es liegt das typische Bild von konsekutiven Reaktionen vor.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der kinetischen Analysen der einzelnen Reaktionen gezeigt und diskutiert werden.

D.4.4.2.1 EMP-Obidoxim-Bildung und -Zerfall

Es wurden äquimolare Reaktionsansätze der Edukte Obidoxim und VX der Konzentrationen 0,75, 1, 2 und 4 mM bei RT zur Reaktion gebracht. Die Konzentrations-Zeit-Kurven zeigten einen biphasischen Verlauf. Nach einem initial raschen Anstieg wurde ein Plateau bzw. Maximum erreicht, aus dem heraus dann die Konzentration wieder abnahm. Abbildung D.4-7 zeigt die Veränderungen des EMP-Obidoxims mit der Zeit bei diesen Reaktionen.

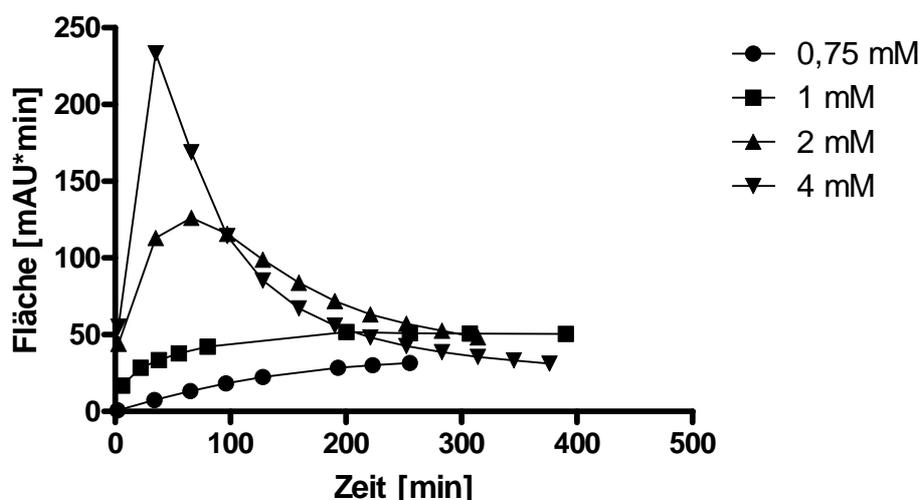


Abbildung D.4-7:

Veränderung der EMP-Obidoxim-Konzentration über die Zeit in wässrigen Reaktionsansätzen der Konzentrationen 0,75 mM, 1 mM, 2 mM und 4 mM bei 23°C (RT).

Während bei Konzentrationen der Reaktanden von 0,75 mM das Maximum der POx-Konzentrationen erst nach mehr als 250 min erreicht wurde, waren bei Konzentrationen von 1 mM VX und Obidoxim 200 min nötig. Bei Konzentrationen von 2 mM verkürzte sich die Zeit weiter auf 60 min, bei 4 mM auf < 35 min. Außerdem erhöhten sich die maximal erreichten POx-Konzentrationen deutlich. Die Bildung des EMP-Obidoxims zeigt also eine deutliche Abhängigkeit von den eingesetzten Konzentrationen der Edukte. Je höher diese sind, desto schneller läuft die Bildung des POx, desto schneller ist allerdings auch wieder sein Zerfall.

Wie bereits erwähnt, wird für die POx-Bildung via Direktreaktion von Obidoxim und VX ein S_N2-Mechanismus angenommen. Es kommt zur Bildung eines Übergangszustandes. Über Molecular Modelling ermittelte Daten für die Reaktivierung Sarin-gehemmter AChE mit Formoximat-Ionen legen die Existenz eines echten pentakoordinierten Phosphor-Intermediates nahe.[108]

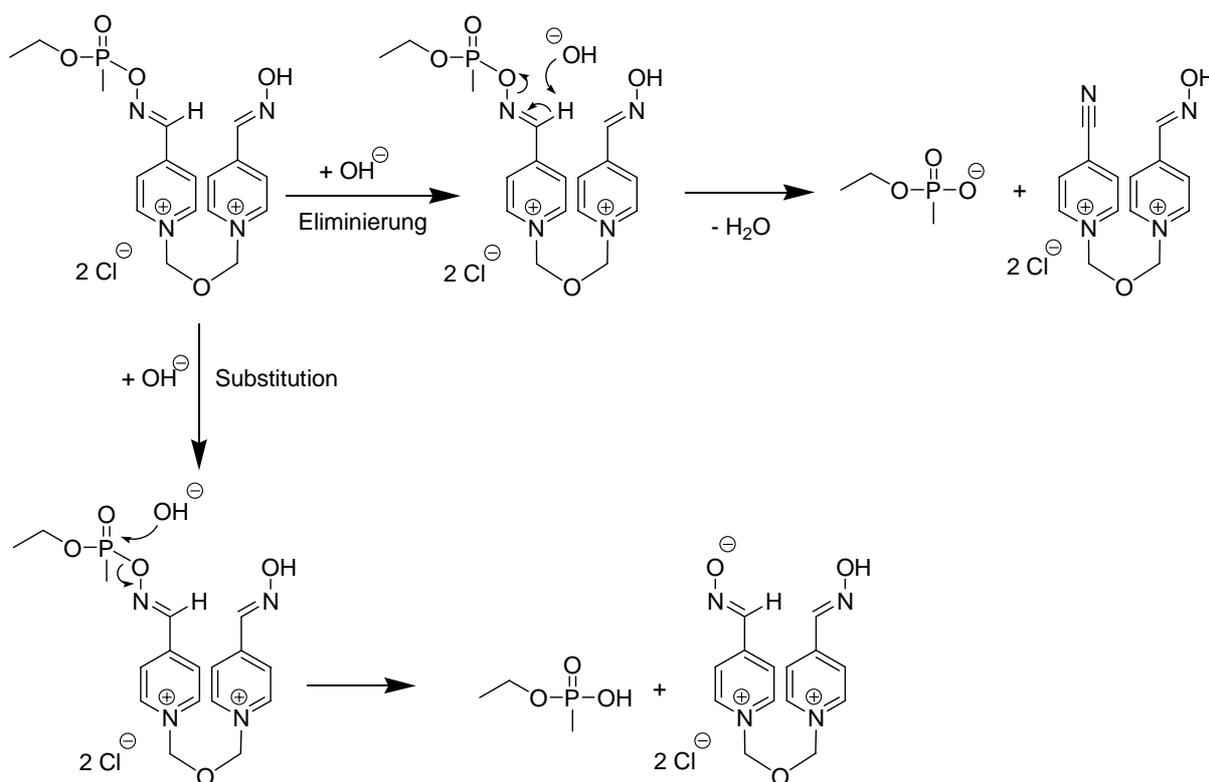
Es ist also von einer Reaktion 2. Ordnung auszugehen. Somit sollte die Geschwindigkeit der POx-Bildung sowohl von der Konzentration des Obidoxims als auch von der des VX abhängig sein.

Die Geschwindigkeitskonstante der POx-Bildung lässt sich über

$$v = \frac{dc(\text{POx})}{dt} = -^2k_1 \cdot c(\text{Obidoxim}) \cdot c(\text{VX})$$

beschreiben.

Prinzipiell existieren zwei Wege des POx-Abbaus: Eliminierungsreaktion zum Nitril und Substitution mit Spaltung des Phosphonyl-Oxim-Esters unter Regenerierung des Oxims und Bildung einer Phosphonsäure (s. Schema D.4-2).



Schema D.4-2:

Abbauwege des POx am Beispiel des EMP-Obidoxims. Möglich sind eine β -Eliminierungsreaktion unter Bildung eines Nitrils sowie eine nucleophile Substitution am Phosphoratom, was zu einer Regenerierung von Obidoxim führt.

Der Mechanismus der Nitrilbildung wurde von Hagedorn et al. als der einer cyclischen β -cis-Eliminierungsreaktion pseudo-1.-Ordnung postuliert.[107] Steinberg et al. fanden für den photometrisch beobachteten Abbau der 4-PAM-Sarin-POx eine Kinetik 1. Ordnung.[128] Auch de Jong et al. geben den Zerfall verschiedener P2S- und Obidoxim-POx mit Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung an.[129]

Harvey et al. gingen für den Zerfall von POx aus dem Oxim P2S und G-Stoffen wie z.B. Sarin von einer durch Hydroxidionen katalysierten Eliminierung aus und ermittelten eine

monomolekulare Geschwindigkeitskonstante für Reaktionen bei pH 7,4 und eine bimolekulare Geschwindigkeitskonstante für Reaktionen bei pH 8,6-10,4.[130]

Die Nitrilbildung als Abbauweg des POx wird besonders für schwach alkalische Lösungen beschrieben, während bei höheren pH-Werten die nucleophile Substitution am Phosphoratom durch Hydroxylionen bevorzugt zu sein scheint.[107;130]

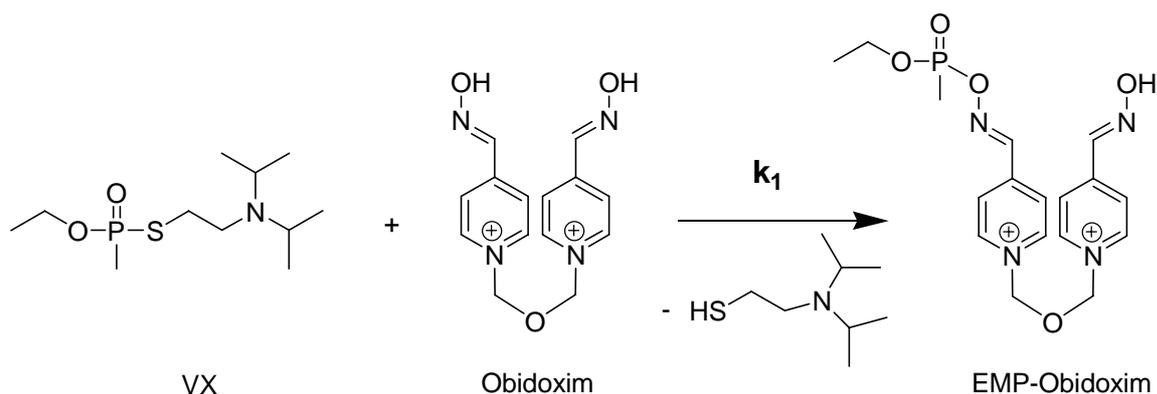
Diese Tatsache weist auf einen S_N2 -Mechanismus der Substitutionsreaktion und somit auf eine Reaktion 2. Ordnung hin. Dies deckt sich dann mit den Daten von Harvey et al. Auch Kiderlen beschreibt bei pH 7,4 den Zerfall von DEP-Obidoxim zum Nitril.

Zur Analyse der kinetischen Daten und Bestimmung einer Reaktionsordnung kann neben der bereits vorgestellten Integrations-Methode auch eine differentielle Methode herangezogen werden. Hierbei werden die Kinetiken verschiedener Experimente unterschiedlicher Konzentrationen ausgewertet. Der Logarithmus der Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen bei unterschiedlichen Konzentrationen wird gegen den Logarithmus der jeweiligen Anfangskonzentrationen aufgetragen. Resultiert eine Gerade, entspricht ihre Steigung der Reaktionsordnung in der Konzentration.[126] Im Falle des EMP-Obidoxims ließ sich allerdings kein linearer Zusammenhang zeigen, was auf eine kompliziertere Reaktionsordnung hinweist.

Die Entwicklung der POx-Konzentration ist also das Resultat der POx-Bildung und des Zerfalls. Da die biphasischen Verläufe schwer kinetisch ausgewertet werden können, lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten besser über die Betrachtung der Abnahme der Oximkonzentration und der Zunahme der Mononitril-Konzentration ermitteln.

D.4.4.2.2 Veränderungen der Obidoximkonzentrationen

Die Abnahme der Oximkonzentration ist durch die Reaktion des Obidoxims mit VX unter Bildung von POx erklärbar. Die Reaktionsgleichung hierzu zeigt Schema D.4-3:

**Schema D.4-3:**

Reaktion von VX mit Obidoxim unter EMP-Obidoxim-Bildung.

Es wird der Mechanismus einer nucleophilen Substitution 2. Ordnung postuliert (S_N2 -Mechanismus). Die Geschwindigkeiten der POx-Bildung und Oximabnahme werden also sowohl durch die Konzentrationen des Obidoxims als auch des VX bestimmt. Es gilt somit

$$v = \frac{dc(\text{Obidoxim})}{dt} = {}^2k_1 \cdot c(\text{Obidoxim}) \cdot c(\text{VX})$$

Obidoxim-Abnahme und POx-Bildung werden also über dieselbe Gleichung beschrieben.

Bei dem betrachteten Fall gleicher Ausgangskonzentrationen von Obidoxim und VX, also $c_0(\text{VX}) = c_0(\text{Obidoxim})$ vereinfacht sich die Gleichung zu

$$v = \frac{dc(\text{Obidoxim})}{dt} = {}^2k_1 \cdot c(\text{Obidoxim})^2$$

Durch Integration ergibt diese Gleichung

$$\frac{1}{c(\text{Obidoxim})} = {}^2k_1 \cdot t + \frac{1}{c_0(\text{Obidoxim})}$$

und die Auftragung von $\frac{1}{c(\text{Obidoxim})}$ gegen t

müsste bei einer Reaktion 2. Ordnung eine Gerade ergeben, deren Steigung der Geschwindigkeitskonstante k entspricht.

Die Halbwertszeit ergibt sich aus

$$t_{1/2} = \frac{1}{{}^2k_1 \cdot c_0(\text{Obidoxim})}$$

Die zur Aufzeichnung der kinetischen Daten verwendete HPLC-Methode 1 ermöglichte eine getrennte Erfassung des syn-anti- und des syn-syn-Obidoxims. Es war also möglich, die Veränderungen der Konzentrationen beider Isomere getrennt zu messen.

Tatsächlich zeigte sich für beide Isomere ein linearer Zusammenhang, wenn auch nicht mit perfekter Korrelation, zwischen dem Kehrwert der Oximkonzentration und der Zeit, und es konnten die in Tabelle D.4-5 zusammengestellten Geschwindigkeitskonstanten für eine Reaktionstemperatur von 23°C ermittelt werden. Für den 4 mM Ansatz galt die Linearität nur innerhalb der ersten 100 min der Reaktion, beim 2 mM Ansatz innerhalb von 150 min nach Reaktionsbeginn. Danach verringerte sich die Geschwindigkeit.

Tabelle D.4-5:

Geschwindigkeitskonstanten für die Abnahme der Obidoxim-Isomeren bei der Reaktion von Obidoxim mit VX verschiedener Anfangskonzentrationen. Standardabweichungen in Klammern.

Anfangskonzentration VX und Obidoxim [mM]	² k Abnahme syn-anti-Obidoxim [M ⁻¹ min ⁻¹]	² k Abnahme syn-syn-Obidoxim [M ⁻¹ min ⁻¹]
0,75	1,66 * 10 ⁻⁵ (± 1,37 * 10 ⁻⁷)	2,5 * 10 ⁻⁷ (± 2,97 * 10 ⁻⁸)
1	4,153 * 10 ⁻⁵ (± 1,03 * 10 ⁻⁶)	2,8 * 10 ⁻⁷ (± 3,05 * 10 ⁻⁸)
2	1,26 * 10 ⁻⁴ (± 4,39 * 10 ⁻⁶)	5,66 * 10 ⁻⁷ (± 2,51 * 10 ⁻⁸)
4	1,78 * 10 ⁻⁴ (± 8,94 * 10 ⁻⁶)	7,59 * 10 ⁻⁷ (± 3,01 * 10 ⁻⁸)

Mit zunehmender Konzentration der Reaktionspartner trat für beide Obidoxim-Isomere eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit auf.

Es zeigte sich eindeutig, dass die Abnahme des syn-anti-Isomers um ca. 2 Größenordnungen schneller vonstatten geht als die des syn-syn-Isomers. Offensichtlich besitzt ersteres eine höhere Reaktivität.

Dies steht im Einklang mit Veröffentlichungen, die sich mit der Stabilität von Obidoxim befassen. Hier wurde die syn-syn-Form als das Isomer mit der höheren Stabilität gefunden. Dies kommt auch darin zum Ausdruck, dass es in wässriger Lösung mit ca. 95% den Hauptanteil der Obidoxim-Peakflächen ausmacht, während das syn-anti-Isomer ca. 4-5% einnimmt.

Eine weitere Publikation untersuchte die Reaktivator-Wirkung der isolierten Obidoxim-Isomere bei mit Organophosphaten gehemmter AChE. Dabei wurde das syn-syn-Isomer als das zweifach wirksamere Isomer beschrieben. Daraus lässt sich ableiten, dass dessen Reaktionsgeschwindigkeit bei der Reaktivierungsreaktion am gehemmten Enzym also höher ist. Für die Reaktivierungsreaktion an der AChE wird ebenfalls, wie auch für die hier vorliegende Direktreaktion, ein S_N2 -Mechanismus angenommen. Wenn nun dennoch umgekehrte Verhältnisse zu den hier ermittelten Daten der Direktreaktion vorliegen, könnte dies über Spezifika der AChE-Bindungsstelle im aktiven Zentrum bedingt sein. Eventuell ist das eine Isomer besser in der Lage, sich in der engen Gorge der AChE optimal für einen nucleophilen Angriff auszurichten.[91;92;107]

Trägt man die Logarithmen der bei den verschiedenen Konzentrationen ermittelten k-Werte im Sinne der differentiellen Methode gegen die Logarithmen der verwendeten Konzentrationen auf, so ergibt sich auch im Falle des Obidoxim, wie schon bei der POx, kein direkter linearer Zusammenhang, so dass von daher nicht auf eine einfache Reaktionsordnung geschlossen werden kann.

Bildet man Quotienten der jeweils zu einem bestimmten Zeitpunkt vorliegenden Konzentrationen (bzw. Flächen) von syn-anti-Obidoxim gegen die Konzentrationen (Flächen) des POx zum gleichen Zeitpunkt, erkennt man, dass mit zunehmender Ausgangskonzentration der Quotient sehr schnell < 1 wird, POx also in Überschuss gerät. Der Zeitpunkt, an dem dieses passiert, korreliert gut mit den Zeitpunkten maximaler POx-Konzentrationen. Für 4 mM-Ansätze sind dies < 35 min, für 2 mM-Ansätze ca. 35 min, für 1 mM-Ansätze ca. 200 min während bei 0,75 mM-Ansätzen der Zustand nach 220 bis 250 min erreicht wird. Danach scheint POx-Bildung durch das langsamer reagierende syn-syn-Isomer bestimmt zu sein und aufgrund der nun deutlich verlangsamten Bildungsgeschwindigkeit der Abbau des POx zu überwiegen. Dies erklärt die steilen Anstiege und spitzen Maxima in den POx-Kurven besonders höherer Ausgangskonzentrationen (s. Abbildung D.4-2).

Durchgeführte Versuche mit Ansätzen von 1 mM Obidoxim und 0,1 mM VX sowie 0,1 mM Obidoxim und 1 mM VX zeigen, dass die im Vergleich zum VX erhöhte Obidoxim-

Konzentration bessere POx-Ausbeuten liefern als bei umgekehrten Verhältnissen, was auch auf den Einfluss der Höhe der Obidoxim-Konzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit hinweist.

Wenn nun also die Konzentration des syn-anti-Obidoxims die Gesamtreaktionsgeschwindigkeit der POx-Bildung bestimmt, müssen die Konzentrationsverhältnisse der reagierenden Komponenten neu kalkuliert werden. Syn-anti-Obidoxim liegt in den untersuchten wässrigen Lösungen zu nur ca. 4% vor. Es überwiegt das syn-syn-Obidoxim. D.h., dass VX, das ja äquimolar eingesetzt worden ist, in Wahrheit in einem ca. 25 fachen Überschuss in Bezug auf das reaktive syn-anti-Isomer vorliegt. Die Höhe des Überschusses rechtfertigt die Annahme, dass die Abbaureaktion des syn-anti-Obidoxims auch einer apparenten 1. Ordnung, einer pseudo-1.Ordnung, folgen könnte.

Anpassung der gemessenen Werte für die untersuchten Ausgangskonzentrationen analog einer Kinetik 1. Ordnung, d.h. Auftragung von $\ln c$ gegen t , ergab tatsächlich hervorragende Linearität. Bei 4 mM-Ansätzen allerdings wieder nur für die ersten 100 min. Die so ermittelten Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung zeigt Tabelle D.4-6.

Tabelle D.4-6:

Geschwindigkeitskonstanten für die Abnahme der Obidoxim-Isomeren bei der Reaktion von Obidoxim mit VX verschiedener Anfangskonzentrationen. Die Anfangskonzentrationen beziehen sich auf beide Isomere des Obidoxims, davon sind ca. 4% syn-anti-Obidoxim.

Anfangskonzentration VX und Gesamt-Obidoxim [mM]	1k Abnahme syn-anti-Obidoxim [min ⁻¹]
0,75	-0.001712 ± 0.00004821
1	-0.001826 ± 0.00002076
2	-0.008415 ± 0.0001849
4	-0.01666 ± 0.001728

Zum Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten 1. (1k) und 2. Ordnung (2k) konnten die 1k durch die jeweilige Konzentration des syn-anti-Obidoxims, in diesem Fall angenommenen 4%, bei 1 mM Gesamt-Obidoxim z.B. 40 μ M, geteilt werden. Die so aus der 1k errechneten 2k lagen in guter Näherung zu den nach Auswertung der Kinetik 2. Ordnung erhaltenen.

Allerdings war die Abweichung mit zunehmender Anfangskonzentration stärker. Berechnung der Halbwertszeiten nach 1. und 2. Ordnung und Vergleich mit den Verläufen der nicht transformierten Kurven zeigten, dass eine Auswertung nach 1. Ordnung bessere Annäherung ergibt.

D.4.4.2.3 Veränderungen der Obidoxim-Mononitrilkonzentrationen

Die Aufzeichnung der Veränderungen in der Obidoxim-Mononitrilkonzentration ergab das in Abbildung D.4-8 gezeigte Bild.

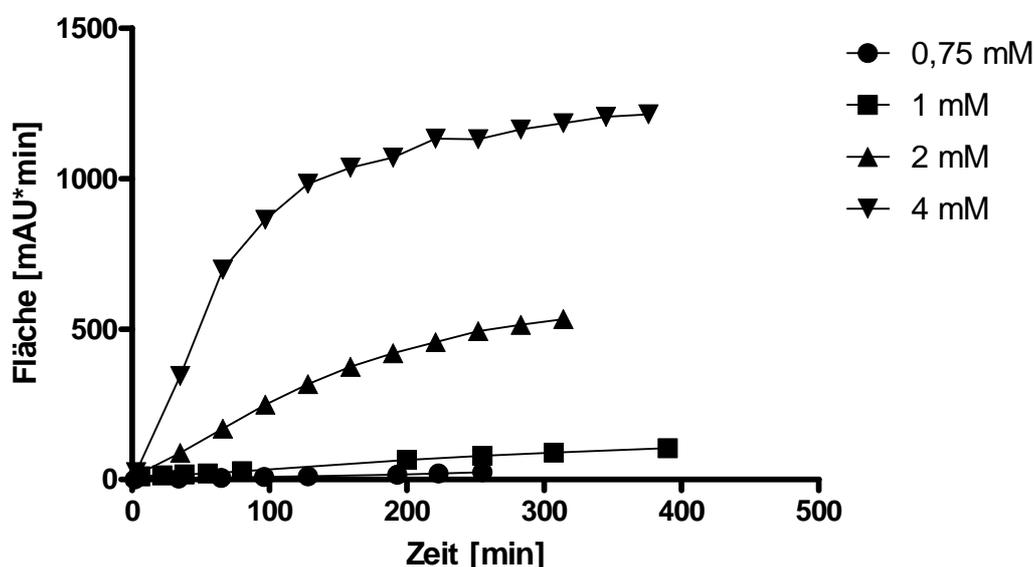


Abbildung D.4-8:

Obidoxim-Mononitrilbildung bei äquimolaren, wässrigen Reaktionsansätzen der Konzentrationen 0,75 mM, 1 mM, 2 mM und 4 mM VX und Obidoxim bei 23°C.

Während bei den niedrigen Konzentrationen 0,75 mM und 1 mM der Kurvenverlauf über einen weiten Zeitraum Linearität zeigte, fiel dieser Zeitraum mit zunehmender Konzentration kürzer aus. Bei dem 4 mM Ansatz trat eine nahezu biphasige Reaktion zu Tage.

Setzte man die höchsten in einer Datenreihe gemessenen Mononitrilkonzentrationen gleich 100% und trug im Sinne einer Auswertung der Messwerte als Reaktion 2. Ordnung $1/c(\text{Mononitril})$, bzw. $1/\%$ Fläche, gegen die Zeit auf, ergab sich kein deutlich linearer Zusammenhang. Hingegen führte die Analyse der gemessenen Daten unter der Annahme einer Reaktion 1. Ordnung, also Auftragung von $\ln \% c(\text{Mononitril})$ gegen die Zeit zu Linearität für die ersten 4-5 Messwerte der 0,75 und 1 mM Reaktionsansätze.

Es würde somit für die Bildung des Mononitrils folgende Geschwindigkeitsgleichung gelten:

$$v = -\frac{dc(\text{Nitril})}{dt} = {}^1k_2 \cdot c(\text{POx})$$

und die Halbwertszeit ließe sich nach

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{{}^1k_2}$$

bestimmen.

Die analog einer Reaktion 1. Ordnung ermittelten Werte für k betragen $0,011 \text{ min}^{-1}$ (0,75 mM) und $0,013 \text{ min}^{-1}$ (1 mM). Sie liegen somit um eine Größenordnung über denen des syn-anti-Obidoxim-Abbaus.

Auch die Daten des hydrolytischen Zerfalls isolierter POx (s. D.6.) konnten unter Annahme einer Reaktion 1. Ordnung ausgewertet werden, ebenso die Messwerte einer Reaktion bei verschiedenen Temperaturen mit Anfangskonzentrationen von 1 mM (s. D.4.4.4).

Für höhere Konzentrationen ließen sich hingegen keine linearen Zusammenhänge finden.

Grund hierfür dürfte die stark schwankende POx-Konzentration bei höheren VX- und Obidoxim-Konzentrationen im Ansatz sein, die ja, wie vorhin gezeigt, sehr rasch zu, aber dann aufgrund mangelnder Nachbildung, schnell wieder abnimmt. Nur aus dem zum jeweiligen Zeitpunkt vorhandenen POx kann sich ja Nitril bilden.

Außerdem existiert theoretisch die Möglichkeit der hydrolytischen Spaltung des POx in Obidoxim und Phosphonsäure ohne Bildung von Nitril, was die kinetischen Auswertungen weiter erschweren würde.

Wie oben beschrieben, sind in der Literatur unterschiedliche Ansichten bezüglich der Reaktionsordnung der Eliminierungsreaktion des POx zum Nitril existent. Die eigenen Daten legen für niedrige Konzentrationen das Vorliegen einer Reaktion 1. Ordnung bzw. pseudo-1. Ordnung nahe.

Mit zunehmender Zeit flachten die Kurven ab und gerieten aus der Linearität. Der Grund könnte sein, dass hier, wie auch beim POx, in den Gesamtverlauf der Konzentrationskurve sowohl die Kinetik der Nitrilbildung aus zerfallendem POx als auch die der Monopyridonbildung aus zerfallendem Mononitril eingehen.

Unter Einbeziehung des Abbaus zu Monopyridon folgt die Geschwindigkeitsgleichung für Mononitril

$$v = -\frac{dc(\text{Nitril})}{dt} = {}^1k_2 \cdot c(\text{POx}) - {}^2k_3 \cdot c(\text{Nitril}).$$

D.4.4.2.4 Veränderungen der Obidoxim-Monopyridonkonzentrationen

Monopyridon bildet sich erst nach einiger Reaktionszeit signifikant. Der Verlauf der Konzentrationsänderungen ist ähnlich denen des Mononitrils. D.h. auch hier zeigt bereits die direkte Auftragung von Fläche bzw. Konzentration gegen die Zeit, besonders bei niedrigen Konzentrationen, in der ersten Zeit Linearität. Mit Fortschreiten der Reaktion kommt es zu einer Verlangsamung der Reaktion, wie aus Abbildung D.4-9 zu erkennen.

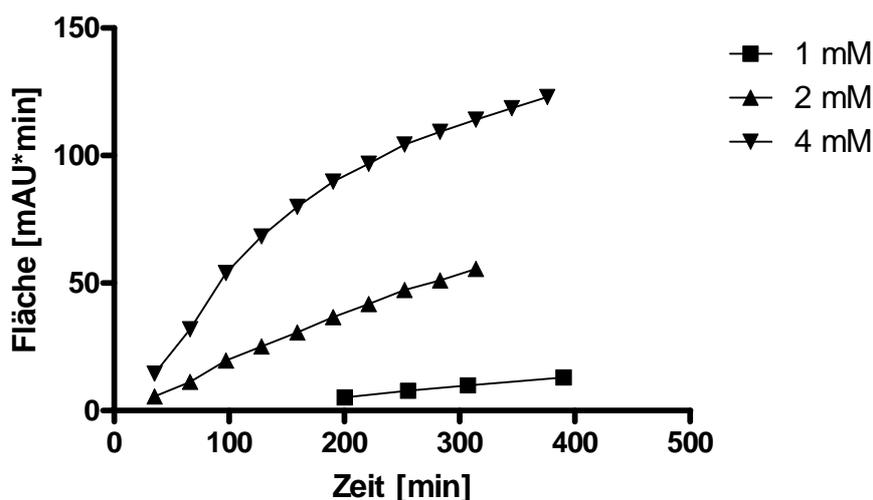
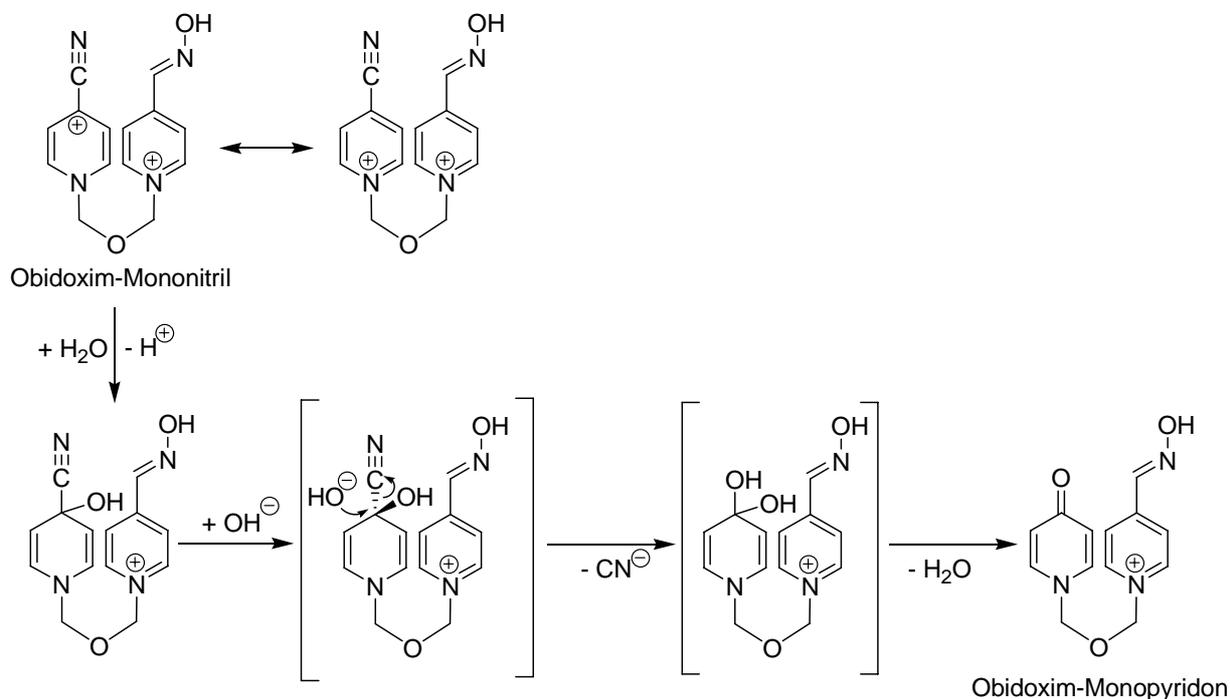


Abbildung D.4-9:

Obidoxim-Monopyridonbildung bei Anfangskonzentrationen der POx-Ansätze von 1, 2 und 4 mM bei 23°C; bei der Konz 0,75 mM konnte im betrachteten Zeitraum keine Pyridonbildung beobachtet werden.

Weder die Auftragung von $1/c$ noch von $\ln c$ ergaben Geraden. Vielmehr erschienen für 1 mM, 2 mM und 4 mM-Ansätze die Werte zumindest im Anfangsbereich direkt ohne Transformation linear. Ein linearer Kurvenverlauf weist auf eine Reaktion 0. Ordnung hin, bei dem sich die Konzentration immer um denselben Betrag verändert, unabhängig von der vorliegenden Konzentration. Da aber der Betrag der Veränderung bei den verschiedenen Konzentrationen unterschiedlich ausfällt, liegt keine tatsächliche Reaktion 0. Ordnung vor.

Als Mechanismus der Reaktion lässt sich der in Schema D.4-4 gezeigte Reaktionsweg postulieren.



Schema D.4-4:

Postulierter Reaktionsmechanismus der Reaktion von Obidoxim-Mononitril zu Obidoxim-Monopyridon

Bei der Bildung von Pyridon aus Nitril wird zunächst ein Wassermolekül an das Carboniumion des Ringes addiert. Anschließend findet eine Substitution des Cyanids durch ein Hydroxylion unter Hydrat-Bildung statt. Durch Wasserabspaltung entsteht dann das Monopyridon.

Was aus den Daten deutlich wird, ist, dass sich außer für Obidoxim keine klaren Reaktionsordnungen der unterschiedlichen, am POx-Bildungs- und Zerfallsgeschehen beteiligten Stoffe ableiten lassen. Dies ist in sofern nachvollziehbar, da sich die Konzentrationen der Edukte der Folgereaktionen aus der Bildungsgeschwindigkeit der Produkte der vorgelagerten Reaktion ableiten. Dass somit extreme Schwankungen in den vorliegenden Konzentrationen vorliegen können, zeigt die Graphik des Reaktionsverlaufes von EMP-Obidoxim (Abbildung D.4-2).

D.4.4.3 Direktreaktion von VR und CVX mit Obidoxim

Die Reaktion von CVX mit Obidoxim zeigte einen ganz ähnlichen Verlauf wie die von VR mit Obidoxim. Bei einem äquimolaren Ansatz von 1 mM Obidoxim und VR bzw. CVX bei 23°C wurden Spitzenkonzentrationen jeweils nach ca. 70 min erreicht, dann überwog der Zerfall. Somit lief die Reaktion der POx-Bildung zwischen Obidoxim und VR bzw. CVX schneller als die mit VX, wo bei 23°C und ebenfalls Konzentrationen von 1 mM erst nach 190 min maximale POx-Konzentrationen erreicht wurden. Die maximalen POx-Konzentrationen lagen in etwa in derselben Höhe.

Die Literatur beschreibt höhere Hemmkonstanten von CVX und VR gegenüber AChE als von VX. Die S_N-Reaktion am Phosphoratom der Phosphonylgruppe mit der Hydroxylgruppe des Serins im aktiven Zentrum des Enzyms findet also schneller statt. Offensichtlich gilt dies auch für die S_N-Reaktion am Phosphor des Phosphonylrestes bei der Reaktion mit der Oximgruppe des Obidoxims.

D.4.4.4 Einfluss der Reaktionstemperatur

Äquimolare, wässrige Reaktionsansätze von je 1mM Obidoxim und VX wurden bei verschiedenen Temperaturen zur Reaktion gebracht und die entstehenden Produkte mittels HPLC-Analyse (HPLC-Methode 1) über die Zeit aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

D.4.4.4.1 EMP-Obidoxim-Bildung

Die EMP-Obidoxim-Bildung lief bei verschiedenen Temperaturen unterschiedlich schnell und wies teils große Differenzen in den entstehenden POx-Konzentrationen auf. Abbildung D.4-10 zeigt den Verlauf bei 3 verschiedenen Temperaturen.

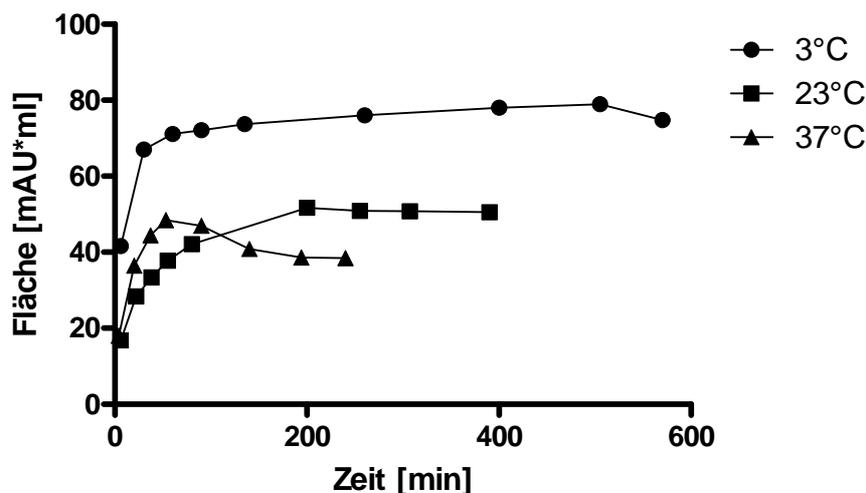


Abbildung D.4-10:

Reaktionsverlauf der EMP-Obidoxim-Bildung eines wässrigen Ansatzes von 1 mM Obidoxim und 1 mM VX bei den Reaktionstemperaturen 3, 23 und 37°C.

Während bei 37°C das Maximum der PO_x-Konzentrationen bereits nach ca. 50 min erreicht wurde, waren bei 23°C ca. 130 min nötig. Bei 3°C kam es zu einem deutlichen Anstieg der PO_x-Konzentration innerhalb von 30 min nach Start der Reaktion. Anschließend bildete sich ein stabiles Plateau, dessen Konzentration noch leicht zunahm und nach ca. 400-500 min zum Maximum gelangte. Die Konzentration des gebildeten PO_x war bei 3°C am höchsten. Setzt man die hier gemessenen Werte gleich 100% wurden im Maximum bei 23°C ca. 66% und bei 37°C ca. 61 % der Konzentration bei 3°C erreicht.

D.4.4.4.2 Syn-anti- und syn-syn-Obidoxim-Abnahme

Analysen der bei den Temperaturen 3, 23 und 37°C gemessenen Daten ergaben wie bereits vorher gezeigt unter Annahme einer Reaktion 2. Ordnung einen linearen Zusammenhang. Tabelle D.4-7 führt die Geschwindigkeitskonstanten einer Reaktion zweiter Ordnung (2k) für die Abnahme beider Isomere bei verschiedenen Temperaturen auf.

Tabelle D.4-7:

Geschwindigkeitskonstanten der Abnahme von syn-anti- und syn-syn-Obidoxim bei Reaktion mit VX (äquimolarer Ansatz, 1mM), bei verschiedenen Temperaturen und unter Annahme einer Reaktion 2. Ordnung ermittelt.

T [°C]	² k Abnahme syn-anti-Obidoxim [M ⁻¹ min ⁻¹]	² k Abnahme syn-syn-Obidoxim [M ⁻¹ min ⁻¹]
3	1,357 * 10 ⁻⁵ (± 4,0 * 10 ⁻⁷)	1,346 * 10 ⁻⁷ (± 8,1 * 10 ⁻⁹)
23	4,153 * 10 ⁻⁵ (± 1,0 * 10 ⁻⁶)	4,268*10 ⁻⁷ (± 2,3 * 10 ⁻⁸)
37	12,81 * 10 ⁻⁵ (± 2,6 * 10 ⁻⁶)	9,792*10 ⁻⁷ (± 9,2 * 10 ⁻⁸)

Mit zunehmender Reaktionstemperatur verläuft die Abnahme des Obidoxims schneller. Dies gilt für beide Isomere. Wie schon bei den Versuchen mit unterschiedlich konzentrierten Reaktionsansätzen wird auch hier deutlich, dass das syn-anti-Obidoxim deutlich schneller reagiert als das syn-syn-Obidoxim.

D.4.4.4.3 Obidoxim-Mononitril-Bildung

Die Obidoxim-Mononitrilkonzentrationen aus Reaktionsansätzen von 1 mM zeigten eine fast lineare Zunahme mit der Zeit. Der schnellste Anstieg war bei 37°C zu sehen. Bei dieser Temperatur kam es ab ca. 200 min zu einer Abschwächung des Anstiegs und einem Ende der Linearität (s. Abbildung D.4-11).

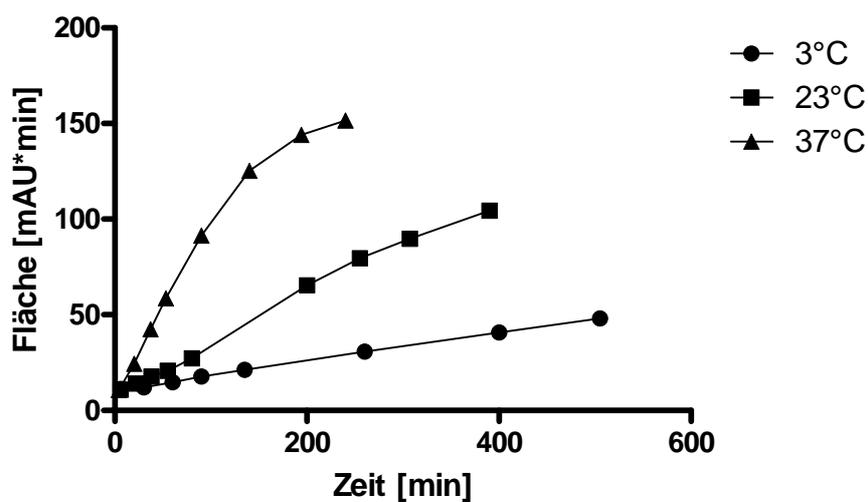


Abbildung D.4-11:

Obidoxim-Mononitril-Bildung in einer Reaktionslösung aus 1mM Obidoxim und 1 mM VX bei den Reaktionstemperaturen 3, 23 und 37°C

Es resultierten die in Tabelle D.4-8 dargestellten Werte für k , ermittelt unter der Annahme einer Reaktion 1. Ordnung

Tabelle D.4-8:

Geschwindigkeitskonstanten der Mononitrilbildung in einem äquimolaren Reaktionsansatz (1 mM) aus VX und Obidoxim unter Annahme einer Reaktion 1. Ordnung

T [°C]	1k_2 Zunahme Mononitril [min^{-1}]
3	$0,00517 \pm 0,0003364$
23	$0,01213 \pm 0,0007413$
37	$0,03426 \pm 0,004771$

D.4.4.4.4 Obidoxim-Monopyridon-Bildung

Für die Zunahme der Obidoxim-Monopyridonkonzentration mit der Zeit ergab sich das in Abbildung D.4-12 gezeigte Bild.

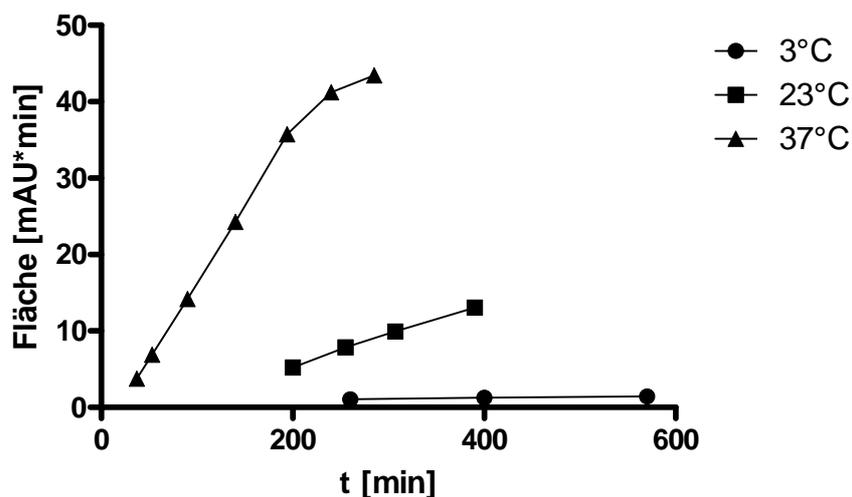


Abbildung D.4-12:

Verlauf der Monopyridonbildung in einem 1mM äquimolaren Reaktionsansatz von VX und Obidoxim bei den Reaktionstemperaturen 3, 23 und 37 °C

Auch hier zeigten die Werte der Fläche aufgetragen gegen die Zeit einen über weite Strecken nahezu linearen Verlauf. Es ist eine deutliche Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Temperatur erkennbar. Während bei niedrigen Temperaturen Monopyridon-Bildung erst nach > 200 h Reaktionszeit (3°C) nachweisbar ist, verringert sich die Zeit bei 37°C auf ca. 30 min. Bei einer Reaktionstemperatur von 37°C verlässt der Graph ab 200 min die Linearität, die Monopyridonkonzentration scheint einem Plateau entgegenzustreben.

D.4.4.4.5 Arrhenius-Plot

Die Reaktionskinetiken der bei der Direktreaktion von VX mit Obidoxim auftretenden Stoffe wurden, wie oben bereits angesprochen, bei verschiedenen Reaktionstemperaturen aufgenommen.

Die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen veränderten sich mit der Temperatur.

Die Arrhenius-Gleichung stellt einen Zusammenhang zwischen Reaktionsgeschwindigkeit, Temperatur und Aktivierungsenergie einer Reaktion her:

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_A}{R \cdot T}}$$

Arrhenius-Gleichung (k = Geschwindigkeitskonstante, A = Häufigkeitsfaktor, T = Temperatur in K, R = allg. Gaskonstante; 8,31 J/mol*K)

Stehen die logarithmierten Geschwindigkeitskonstanten einer Reaktion bei verschiedenen Reaktionstemperaturen in einer linearen Beziehung, kann ein Arrhenius-Plot angefertigt werden. Beim Arrhenius-Plot werden die bei verschiedenen Temperaturen ermittelten logarithmierten Geschwindigkeitskonstanten ($\ln k$) einer Reaktion gegen die jeweilige reziproke absolute Reaktionstemperatur in Kelvin ($1/T$) aufgetragen. Der y-Achsenabschnitt der resultierenden Gerade entspricht $\ln A$ und ihre Steigung (m) entspricht $-E_A/R$.

Wenn also

$$m = \frac{-E_A}{R},$$

ergibt sich

$$E_A = -m \cdot R$$

mit $R = 8,3143 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$.

Ein Arrhenius-Plot ließ sich zwar nicht für die POx-Bildung, aber für die Abnahme der Konzentration von syn-syn-Obidoxim und syn-anti-Obidoxim sowie die Zunahme des Mononitrils anfertigen. Abbildung D.4-13 zeigt das Ergebnis für syn-anti- und syn-syn-Obidoxim sowie für Obidoxim-Mononitril.

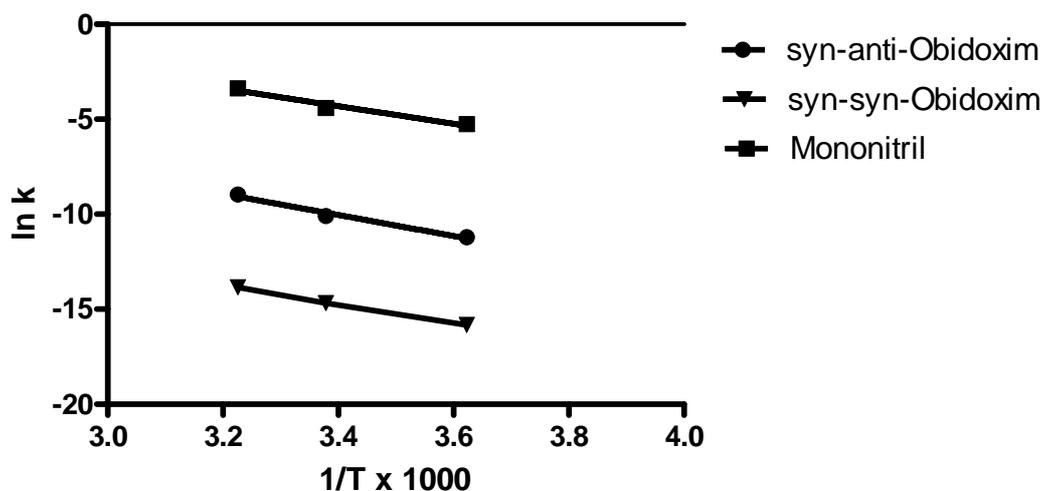


Abbildung D.4-13:

Arrhenius-Plot für die Edukte syn-anti-Obidoxim, syn-syn-Obidoxim sowie das Produkt Obidoxim-Mononitril, entstehend aus Reaktionen von VX und Obidoxim, beide in der Konzentration 1 mM in wässriger Lösung. Die analysierten Temperaturen waren 3°C, 23°C und 37°C.

Die Ergebnisse sind in Tabelle D.4-9 aufgelistet.

Tabelle D.4-9:

Steigungen und resultierende Aktivierungsenergien des Arrhenius-Plots für syn-anti-, syn-syn-Obidoxim und Obidoxim-Mononitril bei der Reaktion von VX mit Obidoxim bei den Temperaturen 3, 23 und 37°C.

	k	E _A (KJ/mol)
syn-anti-Obidoxim	-5,548 ± 0,7549	46,13 ± 6,28
syn-syn-Obidoxim	-4,968 ± 0,1956	41,30 ± 1,63
Obidoxim-Mononitril	-4,639 ± 0,8914	38,57 ± 7,4

Die Aktivierungsenergien für die Abnahme von syn-anti- und syn-syn-Obidoxim sowie die Zunahme von Obidoxim-Mononitril liegen zwischen 38 und 46 KJ/mol. Aktivierungsenergien dieser Größenordnung sind im Vergleich zu anderen Reaktionen eher niedrig und deuten auf eine geringe Temperaturabhängigkeit der Reaktion hin.[127] Die Temperaturabhängigkeit der Reaktion von syn-anti-Obidoxim ist größer als die des syn-syn-Obidoxim, allerdings lässt die hohe Standardabweichung keine definitive Aussage zu. Da reine Obidoximlösungen unter den gegebenen Bedingungen sehr stabil sind und im Analysenzeitraum keinen nennenswerten Abbau durch Spontanhydrolyse zu Mononitril oder Monopyridon zeigten, wird die Abnahme der Obidoxim-Konzentration in Anwesenheit von VX durch POx-Bildung bedingt sein. Die

Aktivierungsenergie für die Abnahme des Obidoxims kann also als Maß für die der POx-Bildung genommen werden.

Die ermittelten Aktivierungsenergien können herangezogen werden, um die Größenordnung abzuschätzen und mit Literaturwerten zu vergleichen. Kiderlen et al. haben für den Zerfall von Diethylphosphoryl-Obidoxim (DEP-Obidoxim) eine Aktivierungsenergie von 85 KJ/mol und Stenzel et al. für Dimethyl-, Diethyl- und Diisopropylphosphoryl-Obidoxim (DMP-, DEP- und DIP-Obidoxim) von 83 KJ/mol bestimmt.[12;131] Nimmt man die Aktivierungsenergie der Obidoxim-Mononitril-Bildung als Maß für die des POx-Zerfalls, stellt man fest, dass für EMP-Obidoxim der Wert nur ca. die Hälfte des in der Literatur für DEP-Obidoxim beschriebenen beträgt. Diese Obidoxim-POx ist also offensichtlich stabiler als das EMP-Obidoxim. Vergleich der Halbwertszeiten der durchgeführten Hydrolysekinetiken (s. D.6) bestätigen dies.

Auch für die Reaktion eines Ansatzes von CVX mit Obidoxim wurde ein Arrhenius-Plot bei den Temperaturen 3, 23 und 37°C aufgenommen. In Tabelle D.4-10 sind die sich daraus ergebenden Werte zusammengestellt.

Tabelle D.4-10:

Steigungen und resultierende Aktivierungsenergien des Arrhenius-Plots für syn-anti-, syn-syn-Obidoxim und Obidoxim-Mononitril bei der Reaktion von CVX mit Obidoxim bei den Temperaturen 3, 23 und 37°C.

	k	E _A (KJ/mol)
syn-anti-Obidoxim	-4,736 ± 0,1747	39,37 ± 1,45
syn-syn-Obidoxim	-5,984 ± 0,3645	49,75 ± 3,03
Obidoxim-Mononitril	-3,821 ± 0,3	31,77 ± 2,49

Die Werte der Aktivierungsenergien der verschiedenen im Reaktionsansatz ablaufenden Reaktionen lagen im selben Größenbereich wie die des Reaktionsansatzes von VX und Obidoxim. Für die Abnahme des syn-anti-Obidoxims bei der Reaktion mit VX ergaben sich Werte von 46,13 KJ/mol und bei der Reaktion mit CVX 41,6 KJ/mol. Somit benötigt die Reaktion von syn-anti-Obidoxim mit CVX eine geringere Aktivierungsenergie als die mit VX. n-BMP-Obidoxim-Bildung scheint also thermodynamisch begünstigt zu sein.

D.4.5 Molare Extinktionskoeffizienten der phosphonylierten Oxime

Zunächst wurde der molare Extinktionskoeffizient des Obidoxims bei der Wellenlänge maximaler Absorption des POx im UV-Vis-Photometer ermittelt. Als Lösungsmittel wurden dazu Ammoniumformiatlösungen mit einer Konzentration von 100 mM und unterschiedlichen Methanolanteilen verwendet, um die Verhältnisse während eines HPLC-Laufes zu simulieren. Die maximalen Wellenlängen (λ_{\max}) des POx im Eluentensystem waren aus HPLC-Läufen mit Diodenarray-Detektion bekannt. Für EMP-, n-BMP- und i-BMP-Obidoxim waren dies 275 nm. Es wurden die Veränderungen der Absorption mit zunehmendem Methanolgehalt untersucht. Tabelle D.4-10 gibt die Messwerte in verschiedenen zusammengesetzten Lösungen an:

Tabelle D.4-11:

Molare Extinktionskoeffizienten von Obidoxim, ermittelt bei pH 6,5 in Wasser und wässrigen 0,1 M Ammoniumformiatlösungen (AF) mit variierendem Methanolanteil. Fett sind die jeweils höchsten Werte einer Spalte markiert. Mittelwerte und Standardabweichungen von je drei Ansätzen mit je 5 Messungen.

	ϵ (Wasser) [M ⁻¹ cm ⁻¹]	ϵ (AF in Wasser) [M ⁻¹ cm ⁻¹]	ϵ (AF in 15% MeOH) [M ⁻¹ cm ⁻¹]	ϵ (AF in 50% MeOH) [M ⁻¹ cm ⁻¹]
$\lambda = 275$ nm	32231 ± 473	31211 ± 428	30845 ± 175	28957 ± 1174
$\lambda = 284$ nm	35491 ± 497	34365 ± 413	34438 ± 134	33392 ± 1376
$\lambda = 285$ nm	35485 ± 544	34329 ± 462	34493 ± 175	32894 ± 902
$\lambda = 286$ nm	35385 ± 491	34323 ± 411	34323 ± 148	34508 ± 1377

Der molare Extinktionskoeffizient verringerte sich mit zunehmendem Methanolgehalt der Lösung bei Betrachtung einer Wellenlänge. Grund hierfür ist die Verschiebung der Absorptionsmaxima in Abhängigkeit des Methanolgehaltes des verwendeten Mediums. So war das Obidoxim-Maximum in reinem Wasser und 0,1 M Ammoniumformiatlösung 284 nm, bei einem Methanol-Anteil von 15% 285 nm und bei 50% MeOH 286 nm.

Das Verhältnis der molaren Extinktionskoeffizienten von Obidoxim gemessen bei 286 und 275 nm beträgt ca. 1,1. Dies entspricht den Verhältnissen der Obidoxim-Peakflächen in der HPLC mit UV-Detektion bei den genannten Wellenlängen zueinander. Dies zeigt, dass die in

der Quarz-Küvette gemessenen Ergebnisse mit denen im UV-Detektor der HPLC harmonisieren.

Anschließend wurden die Konzentrationen der gesammelten POx-Fractionen über Methode E.2.5 nach Umsetzen mit KOH und Analyse der resultierenden EMPS-Fläche ermittelt. Danach wurde in einem HPLC-Lauf die der POx-Konzentration entsprechende Fläche bestimmt. Diese POx-Flächenwerte wurden dann anhand einer mit der gleichen Trennmethode ermittelten Obidoxim-Kalibriergerade mit den Flächenwerten des Obidoxims bei derselben Wellenlänge ins Verhältnis gesetzt. Über einen Dreisatz konnte dann der molare Extinktionskoeffizient der POx aus dem des Obidoxims abgeleitet werden.

Da VX-Obidoxim-POx bei Erreichen einer Konzentration von 30% Eluent B eluierte, also die HPLC-Peakflächen per UV-Detektion bei einem Methanol-Gehalt von 15% erfasst wurden, wurden die ebenfalls in diesem Medium ermittelten Werte des Obidoxims für λ 275 nm zur Berechnung verwendet. Für CVX- und VR-POx hingegen wurde die Referenz bei 50% MeOH gemessen, da sich zum Zeitpunkt der Peakelution der Gradient bei > 90% Eluent B befand.

Es ergaben sich die in Tabelle D.4-11 zusammengestellten Werte:

Tabelle D.4-12:

Extinktionskoeffizienten für EMP-, n-BMP- und i-BMP-Obidoxim, ermittelt bei einer Wellenlänge von 275 nm in wässriger Ammoniumformiatlösung (100 mM, pH 6,5) mit dem jeweiligen Anteil an Methanol, der dem Gradientengemisch der Eluenten zum Zeitpunkt der Elution der POx entspricht.

POx	$\epsilon_{275\text{nm}}$
EMP-Obidoxim	27514 (AF 0,1 M, 15% MeOH)
n-BMP-Obidoxim	26872 (AF 0,1 M, 50% MeOH)
i-BMP-Obidoxim	29710 (AF 0,1 M, 50% MeOH)

Der Extinktionskoeffizient des EMP-Obidoxims betrug ca. 89%, der des n-BMP-Obidoxims 93% und der des i-BMP-Obidoxims 103 % dessen des Obidoxims.

Kiderlen et al. fanden für Diethylphosphoryl-Obidoxim bei 273 nm einen Extinktionskoeffizienten von $31,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei pH 4-5 in 10 mM Ammoniumacetat mit 20% MeOH. Die Größenordnung stimmt also überein. Für Obidoxim wird bei 285 nm bei o.g. Bedingungen ein Extinktionswert von $34,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ angegeben, was sich gut mit den

eigenen ermittelten Werten deckt ($34,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in Ammoniumformiat 0,1 M in MeOH 15%, pH 6,5).[12]

D.5 Hemmaktivität

Wie bereits in der Einleitung erläutert beruht die Giftwirkung der V-Stoffe im menschlichen Körper überwiegend auf der Hemmung des Enzyms Acetylcholinesterase durch Phosphonylierung einer Serin-Hydroxylgruppe im aktiven Zentrum des Enzyms. Ein Maß für die Hemmaktivität ist die molare Hemmkonstante. Diese lässt sich ermitteln, indem Acetylcholinesterase mit verschiedenen Konzentrationen des Organophosphates inkubiert wird und die verbleibende Enzymaktivität mittels Ellman-Reaktion kontinuierlich gemessen wird, bis die Enzymaktivität in ein Plateau übergeht. Aus den so erhaltenen Daten kann dann die molare Hemmkonstante nach der Formel von Forsberg und Puu (s. B.1.6) ermittelt werden. Die verwendeten Konzentrationen des Hemmstoffes müssen dabei so gewählt werden, dass die höchste Konzentration keine sofortige Hemmung des Enzyms und die niedrigste Konzentration innerhalb eines vertretbaren Zeitraumes noch eine ausreichende Hemmung bewirken. Die entstandenen Graphen wurden per nicht-linearer Regression ausgewertet und die bimolekulare Hemmkonstante k_i aus den so gewonnenen Daten über die Gleichung von Forsberg und Puu bestimmt.[24;66]

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bestimmung der Hemmkonstanten unter Verwendung von humaner, erythrocytengebundener AChE vorgenommen und so erstmals Hemmkonstanten der V-Stoff-POx an humanem Material ermittelt. Da die Literatur ein sehr starkes Hemmpotential des Obidoxim-V-Stoff-POx erwarten ließ, wurden die Messungen bei 10°C statt sonst üblicher physiologischer 37°C durchgeführt. So ließ sich die Reaktion verlangsamen und die fortschreitende Hemmung besser messen. Außerdem konnte auf diese Weise die Hydrolyse des POx eingeschränkt werden. Um dennoch einen mit Literaturangaben vergleichbaren Wert für die Hemmung von V-Stoff-POx bei 37°C zu erhalten, wurde exemplarisch für EMP-Obidoxim eine Hemmkinetik-Messung bei dieser Temperatur durchgeführt. Der Wert betrug $1,3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. [132] Die Hemmkonstanten der APO-POx wurden bei 37°C ermittelt, da sich diese als sehr stabil erwiesen.

Tabelle D.5-1 zeigt die Ergebnisse dieser Bestimmungen:

Tabelle D.5-1 :

Hemmkonstanten des EMP-, i-BMP- und n-BMP-Obidoxims, ermittelt bei 10°C, (a) und EMP-2-, EMP-3- und EMP-4-APO, ermittelt bei 37°C, (b) gegenüber humaner AChE (Erythrocyten-Ghosts), Mittelwerte von je 2-3 Messungen.

a)

POx	Gemessener Konzentrationsbereich	Hemmkonstante gegenüber humaner Erythrocyten-AChE, 10°C [M ⁻¹ min ⁻¹]
EMP-Obidoxim	1 – 5 nM	8,5 * 10 ⁸
i-BMP-Obidoxim	1,5 – 5 nM	9 * 10 ⁸
n-BMP-Obidoxim	2 – 5 nM	7,1 * 10 ⁸

b)

POx	Gemessener Konzentrationsbereich	Hemmkonstante gegenüber humaner Erythrocyten-AChE, 37°C [M ⁻¹ min ⁻¹]
EMP-2-APO	100 – 500 nM	3,7 x 10 ⁶
EMP-3-APO	1 - 2 µM	Keine Hemmkonstante ermittelbar
EMP-4-APO	190 - 600 nM	1,8 x 10 ⁶

Unter gleichen Bedingungen wurden Hemmkonstanten der V-Stoffe bei 10°C bestimmt. Die Werte für 37°C entstammen der Literatur (s. Tabelle D.5-2).[24]

Tabelle D.5-2:

Hemmkonstanten der V-Stoffe VX, VR und CVX gegenüber humaner AChE (Erythrocyten-Ghosts) bei 10°C und bei 37°C

V-Stoff	Hemmkonstante 10°C [M ⁻¹ min ⁻¹]	Hemmkonstante 37°C [M ⁻¹ min ⁻¹]
VX	1,32 x 10 ⁷	9,91 x 10 ⁷
VR	7,3 x 10 ⁷	4,6 x 10 ⁸
CVX	8,23 x 10 ⁷	3,06 x 10 ⁸

Die VX-, CVX- und VR-Obidoxim-POx zeigten hier eine deutlich höhere Hemmaktivität als die als Edukte zugrunde liegenden V-Stoffe. Für VX zeigt sich eine 64fach, für VR eine 12fach und für CVX eine 9fach höhere Hemmkonstante gegenüber humaner AChE als die der zugrunde liegenden Organophosphate.

Aus der Literatur sind keine Daten zur Hemmkinetik von V-Stoff-POx an humaner AChE bekannt. Luo et al. stellten als einzige Ethylmethylphosphonyl-Obidoxim, das POx, das auch aus VX und Obidoxim entsteht, dar, allerdings aus 7-(Methylethoxyphosphinyloxy)-1-methylquinoliniumiodid (MEPQ) und Obidoxim. Das POx zeigte an Maus-AChE eine 22fach höhere Hemmkonstante als MEPQ.[10]

3-APO-VX-POx zeigte eine deutlich nachweisbare Hemmaktivität gegenüber humaner AChE. Sie war aber nur für unverdünnte Lösungen nachzuweisen, so dass es nicht möglich war, verschiedene Konzentrationen zu vermessen und eine Hemmkonstante zu ermitteln. Die Hemmwirkung des EMP-3-APO war also geringer als die des EMP-2- und EMP-4-APO. Grund hierfür könnte der durch die meta-Stellung der Seitenkette im Vergleich zur ortho- und para-Stellung reduzierte Elektronenzug des Pyridiniumrings sein. In der Folge ist die Elektronendichte an der Oxim-O-P-Bindung höher als bei o- und p-Stellung und somit eventuell ein nucleophiler Angriff der Serin-OH-Gruppe der AChE am Phosphor erschwert. Die mesomeren Grenzstrukturen verdeutlichen dies.

Interessant ist, dass generell die ebenfalls aus VX entstandenen APO-POx viel geringere Hemmaktivität als VX selbst zeigen. Dies ist ein Beweis dafür, dass die Eigenschaften der Abgangsgruppe, und als solche fungiert ja der Oximrest bei der Hemmung von AChE durch POx, einen entscheidenden Einfluss auf die Reaktivität hat. Offensichtlich sind die stabilen APO-POx weniger gut in der Lage, unter Abspaltung des Oxims den Phosphonylrest auf das Serin im aktiven Zentrum der AChE zu übertragen, als es das instabilere VX-Obidoxim-POx kann. POx-Bildung führt also nicht in jedem Fall zu einer gesteigerten Hemmaktivität gegenüber AChE.

Der Austausch der eigentlichen Abgangsgruppe eines Organophosphates durch Obidoxim führt hingegen offensichtlich stets zu einer gesteigerten Hemmaktivität. Auffällig ist hierbei, dass der Faktor der Steigerung umso größer zu sein scheint, je ungiftiger das ursprüngliche Organophosphat war. Dies legt der Vergleich der ermittelten Daten für V-Stoff-Obidoxim-POx mit Literaturwerten für POx aus Paraoxon und Obidoxim nahe.[12] Hier wird von einer gegenüber Paraoxon ca. 350fach gesteigerten Hemmkonstante berichtet. Paraoxon ist mit

einer molaren Hemmkonstante von ca. $2,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (37°C , Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4) ca. 55fach untoxischer als VX unter gleichen Bedingungen ($1,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$).[65]

Auch die selbst ermittelten Werte weisen darauf hin. So ist die Hemmkonstante von VR bei 23°C z.B. 5,5fach höher als die des VX, POx-Bildung mit Obidoxim führt jedoch nur zu einer Steigerung um Faktor 12 statt wie bei VX um Faktor 64, was einen ca. 5fachen Unterschied in den Steigerungsraten bedeutet. POx-Bildung bewirkt in diesem Fall ein Angleichen der Toxizität.

Man kann schlussfolgern, dass Obidoxim einen entscheidenden Einfluss auf die Giftigkeit des POx nimmt.

Der Grund könnte in den Fähigkeiten des Oximrestes als Abgangsgruppe in Rahmen einer nucleophilen Reaktion liegen. Da die Kinetik der POx-Hemmung, also der Rückreaktion, schneller ist als die der POx-Bildung, scheint Obidoxim eine bessere Abgangsgruppe als Eintrittsgruppe im Sinne einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion am Phosphoratom der phosphorylierten AChE zu sein (Reaktivierungskonstante bei 37°C für die Reaktivierung VX-gehemmter AChE mit Obidoxim $k_{r2} 3,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$).[24]

Es wurde schon in frühen Publikationen postuliert, dass für die komplette Entgiftung ein rascher Zerfall des POx zum Nitril entscheidend ist.[107] Es fällt aber auf, dass POx aus Obidoxim, das sehr schnell Zerfall unter Nitril-Bildung zeigt, also relativ instabil ist, eine deutlich höhere Hemmaktivität aufweist als APO-POx, das kein Nitril bilden kann, also viel stabiler ist. Ein stabiles POx ist folglich weniger giftig als ein instabiles POx, letzteres allerdings aufgrund der Möglichkeit einer Nitrilbildung zu einer schnelleren Entgiftung befähigt.

D.6 Hydrolysekinetik

D.6.1 Messsystem

Um abschätzen zu können, ob die Lebensdauer der generierten toxischen POx im menschlichen Körper lang genug ist, um tatsächlich in vivo physiologische Effekte ausüben zu können, war es von Interesse, deren Stabilität zu analysieren.

Als Medium für die Zerfallsmessungen wurde Phosphatpuffer mit pH 7,4 bei 37°C gewählt, ein gängiges Medium, um physiologische Verhältnisse, z.B. im Plasma, zu simulieren.[24;64]

In den aus der HPLC-Aufreinigung erhaltenen POx-Fractionen waren neben POx Ammoniumformationen und ein gewisser Anteil MeOH enthalten. Um das POx in gleicher Konzentration in Phosphatpuffer zu überführen, wäre ein Trocknen und Resolvatisieren nötig gewesen.

Zahlreiche Versuche zum Trocknen der POx enthaltenden Fraktionen mittels Lyophilisation und Vakuumzentrifugation lieferten unreproduzierbare Ergebnisse und gingen meist mit deren mehr oder weniger starken Zersetzung einher. Grund hierfür könnte neben einer gewissen thermischen Belastung das Aufkonzentrieren der im HPLC-Eluenten enthaltenen Ammoniumformationen sein, wodurch evtl. der Zerfall des POx beschleunigt werden könnte. Ein Entfernen der in der POx-Fraktion enthaltenen Salze schien also sinnvoll. Prinzipiell bietet hier die Technik der Solid Phase Extraction (SPE) eine Lösung. Die das gewünschte Molekül und die störenden Substanzen enthaltende Lösung wird durch Anlegen von Vakuum über eine mit einem Sorbentmaterial gefüllte Kartusche geleitet. Dabei kann durch Adsorption entweder der gewünschten Substanz oder der Verunreinigung an der zuvor konditionierten und equilibrierten stationären Phase eine Reinigung und ggf. Aufkonzentrierung stattfinden. Die Elution erfolgt dann durch ein Elutionsmittel, das geeignet ist, die von der jeweiligen stationären Phase auf den Analyten ausgeübten Kräfte zu reduzieren und diesen abzulösen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen die unterschiedlichsten Phasen zum Einsatz. Die meisten sind aus der HPLC-Analytik bekannt.

Die klassischen Reversed-Phase-Materialien zeigten eine ungenügende Retention des positiv geladenen POx. Reversed-Phase-Materialien ohne Endcapped-Behandlung, die also noch deutliche polare Wechselwirkungen zulassen und polare Phasen hielten POx hingegen z.T. so stark zurück, dass eine vollständige Elution nicht mehr möglich war. Modernere Materialien wie Polymere (ENV+, Fa. Separtis), die zur Extraktion polarer Analyten aus polaren Medien

entwickelt wurden, und ein schwacher Kationenaustauscher, der deutliche, sekundäre, unpolare Wechselwirkungen zulässt (CBA, Fa. Separtis), ermöglichten hingegen eine vollständige Retention des POx. Allerdings erforderte die Elution hohe Konzentrationen an Salzen und Methanol. Die Wiederfindungsrate lag bei Verwenden von Kochsalz-Lösungen der Konzentration 0,25 M in 75 % Methanol bei über 100 %. Das Ziel, die Salzkonzentration der Lösung durch Verwenden einer SPE-Methode zu reduzieren, konnte so jedoch nicht erreicht werden.

Ein weiterer Ansatz war die Extraktion der Formiat-Ionen aus der POx-Lösung durch eine Anionenaustauscher-SPE-Phase. Auch diese Ergebnisse waren nicht zufrieden stellend, da je nach verwendetem Anionenaustauscher-Material entweder erneut Salzionen oder aber OH⁻-Ionen an die Lösung abgegeben wurden, die dann zu einer Erhöhung des pH-Wertes und einer beschleunigten Abbaureaktion des POx führten. Außerdem kam es durch die zum Nachspülen der Säulchen nötigen Mengen Wasser zu einer deutlichen, aber schwer reproduzierbaren Verdünnung.

Nachdem ein Abtrennen des POx aus dem HPLC-Fließmittel nicht möglich war, war eine Methode, die eine ausreichende und reproduzierbare Verdünnung der POx-Fractionen direkt in dem gewünschten Hydrolyse-Medium zulässt, gefordert. Eine starke Verdünnung der aus der HPLC-Trennung erhaltenen POX-Fractionen führte aber aufgrund der relativ geringen vorliegenden POx-Konzentrationen an die Nachweisgrenzen des UV-Detektors der HPLC (ca. 0,5 μ M für Obidoxim). Außerdem waren relativ lange Läufe bei den zu erwartenden kurzen Halbwertszeiten des POx unzweckmäßig.

Als Methode der Wahl zur Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeit des POx kristallisierte sich eine enzymatische Bestimmung der Veränderung der POx-Hemmaktivität auf humane Erythrocyten-AChE mit der Zeit heraus. Dazu wurden Verdünnungen des fraktionierten POx in Phosphatpuffer hergestellt und bei 37°C inkubiert. Zu gegebenen Zeitpunkten wurden Proben gezogen, einer AChE-Lösung zugegeben und nach 2 min Einwirkzeit die verbliebene Enzymaktivität durch Verwendung der Ellman-Reaktion photometrisch gemessen (s. Methode E.2-7).

Vergleichsmessungen der Aktivität des ungehemmten Enzyms wurden vor und nach den Bestimmungen der mit POx versetzten Enzymlösungen durchgeführt, um eine mögliche natürliche Abnahme der Enzymaktivität innerhalb des Messzeitraumes zu erkennen. Da keine

signifikante Reduktion der Enzymaktivität auftrat, wurden die Vergleichswerte gemittelt ($n = 3$) und als 100%-Wert der Enzymaktivität verwendet. Die im jeweiligen POx-Versuch nach Hemmung resultierenden Restaktivitäten wurden dann auf diesen Wert bezogen.

Durch die Formel $100 - x$ mit x als gemessener Restaktivität des Enzyms ergab sich die Hemmaktivität der verwendeten POx-Lösung in % Hemmung. Diese war in den verwendeten Konzentrationsbereichen den POx-Konzentrationen proportional. In Vorversuchen mit Verdünnungen wurden Konzentrationen des POx festgelegt, die im Messsystem Restaktivitäten von ca. 15 – 80 % ergaben, da diese Werte gut auswertbar waren. Die POx-Fraktionen wurden so in Phosphatpuffer verdünnt, dass die POx-Konzentrationen im Bereich von 0,2 - 0,4 μM POx lagen.

D.6.2 Kinetik der POx-Hydrolyse

Mit zunehmender Inkubationsdauer sank, wie zu erwarten, die Hemmaktivität ab.

Es ergaben sich folgende Hydrolysekinetiken:

Der nichtenzymatische Abbau der POx-Moleküle lässt sich über eine Reaktion 1. Ordnung beschreiben (s. Kapitel D.4.4). Die Geschwindigkeiten von Reaktionen 1. Ordnung werden von der Konzentration nur eines Stoffes beeinflusst. Für die Annahme, dass der Zerfall des POx ausschließlich über β -cis-Eliminierung zur jeweiligen Phosphonsäure und zum Nitril verläuft und der Weg der basenkatalysierten Hydrolyse untergeordnete Bedeutung besitzt, gilt im vorliegenden Fall:

$$r = \frac{d[\text{POx}]}{dt} = -k \cdot [\text{POx}]$$

$$\frac{d[\text{POx}]}{[\text{POx}]} = d \ln[\text{POx}] = -k \cdot dt$$

durch Integration in den Grenzen t_0 und t ergibt sich:

$$\ln[\text{POx}]_t = \ln[\text{POx}]_0 - k \cdot t.$$

Graphische Darstellung von $\ln [\text{POx}]_t / [\text{POx}]_0$ als Funktion von t ergab eine Gerade mit der Steigung $-k$. Aus der Geschwindigkeitskonstanten k errechnet sich die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) nach

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0,693}{k}$$

Sie ist bei Reaktionen 1. Ordnung konzentrationsunabhängig.

Tabelle D.6-1 zeigt die ermittelten Werte für EMP-, n-BMP- und i-BMP-Obidoxim.

Tabelle D.6-1:

Hydrolysekonstanten und Halbwertszeiten der Hydrolyse reinen EMP-, n-BMP- und i-BMP-Obidoxims in Phosphatpuffer (0,1 mM; pH 7,4). Mittelwert aus 3 Versuchen. Der prozentuale Variationskoeffizient betrug 6,5 (EMP-), 5,5 (n-BMP-) und 5,0 (i-BMP-Obidoxim).

POx	k [min ⁻¹]	t _{1/2} [min]
EMP-Obidoxim	0,0911	7,6
n-BMP-Obidoxim	0,0914	7,6
i-BMP-Obidoxim	0,0807	8,6

Eine Halbwertszeit von 7,6 bzw. 8,6 min in Phosphatpuffer mit pH 7,4 bei 37°C lässt eine ausreichend lange Stabilität im menschlichen Organismus erwarten, um eine Hemmung der AChE bewirken zu können. POx scheint also eine im Geschehen der Reaktivierung mit phosphororganischen Verbindungen gehemmter AChE relevante Größe zu sein, die durchaus einen Einfluss auf die Netto-Reaktivierungsleistung der Oxime haben kann. Luo et al. ermittelten für EMP-Obidoxim bei 25°C Hydrolysekonstanten von 0,0097 min⁻¹ (Phosphatpuffer 20 mM; pH 7,2) und 0,0267 min⁻¹ (Phosphatpuffer 50 mM; pH 8).[10] Diese liegen deutlich unter denen in dieser Arbeit ermittelten Werten. Allerdings wurden zum einen geringere Pufferkonzentrationen verwendet, zum anderen der Zerfall bei einer niedrigeren Temperatur gemessen. Die Literatur zeigt anhand eines Arrhenius-Plots eine deutliche Temperaturabhängigkeit des Zerfalls von Dimethylphosphoryl-, Diethylphosphoryl- und Diisopropylphosphoryl-Obidoxim, so dass wahrscheinlich hierdurch der Unterschied begründet wird.[12;131]

Die hier gezeigten Halbwertszeiten des EMP-Obidoxims, i-BMP-Obidoxims und des n-BMP-Obidoxims liegen eng beieinander. Die strukturellen Unterschiede der isomeren V-Stoffe bewirken also keine deutlichen Geschwindigkeitsunterschiede der Hydrolysereaktionen.

Für Diethylphosphoryl-Obidoxim (DEP-Obidoxim) zeigten Kiderlen et al. unter ähnlichen Bedingungen (Ringer-Phosphatlösung pH 7,1; 37°C) eine Halbwertszeit des Zerfalls von 13,5 min.[115] DEP-Obidoxim ist somit ca. doppelt so stabil wie V-Stoff-Oxim-POx. Die Struktur

des Phosphylrestes der Verbindungen hat also durchaus einen Einfluss auf die Stabilität des PO_x.

Die Effekte der Phosphylgruppe auf die Stabilität von PAM-PO_x haben auch Ashani et al. gezeigt. Für PO_x aus z.B. 4-PAM und Phosphonyl-Verbindungen variierten die gemessenen Halbwertszeiten je nach Struktur von 62 (EMP-4-PAM) bis 112 h (Pinacolylmethylphosphonyl-4-PAM; PMP-4-PAM) bei nicht weiter benannten Reaktionsmedien und Temperaturen. EMP-4-PAM weist den gleichen Phosphorylrest und ebenfalls Para-Stellung der Seitenkette am Pyridinium-Ring wie EMP-Obidoxim auf. Dennoch ist dessen Halbwertszeit deutlich geringer als die der 4-PAM-Derivate. Offensichtlich spielt die Struktur des zugrunde liegenden Oxims also auch hier eine wichtige Rolle.

E Experimenteller Teil

E.1 Materialien und Geräte

E.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Lösungsmittel und Chemikalien für die präparativen Versuche waren von der Qualität p.a., Lösungsmittel für die chromatographischen Verfahren in HPLC oder LC-MS-Qualität.

Im Einzelnen waren die Quellen der wichtigsten Substanzen wie folgt:

Von der Firma **Merck** (Darmstadt, Deutschland) wurden bezogen:

Kaliumiodid, Isopropanol Suprasolv, Aceton, deuteriertes Chloroform, deuteriertes DMSO und Deuteriumoxid

Von der Firma **Sigma-Aldrich** (Taufkirchen, Deutschland) wurden bezogen:

Acetylthiocholin iodid (ASCh), 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoesäure (DTNB), Methanol spectrophotometric grade 99+%, Ammoniumformiat puriss. p.a. (Fluka), 3-Cyanpyridin 98%, Methyljodid, 2-PAM Chlorid, 3-Formylpyridin, 4-Formylpyridin, Iodmethan

Von der Firma **Duphar** (Amsterdam, Niederlande) wurde bezogen:

Obidoxim dichlorid

Von der Firma **Acros** wurde bezogen

Hydroxylaminhydrochlorid 97%

Von der Firma **ABCR** wurden bezogen

2-Acetylpyridin, 3-Acetylpyridin, 4-Acetylpyridin

VX, VR, CVX wurden vom Bundesministerium der Verteidigung zur Verfügung gestellt.

E.1.2 Geräte und Labormaterialien

Analytische und präparative HPLC

Die HPLC-Untersuchungen wurden auf zwei verschiedenen Systemen durchgeführt:

1.

Für sämtliche präparative Trennungen und standardmäßig für die analytischen Trennungen wurde das integrierte System ÄKTA explorer 10 (Fa. GE-Amersham) bestehend aus den Einzelkomponenten Pumpe P-900, UV-Detektor UV-900, Autosampler A-900, Fraktionensammler Frac-950, gesteuert über Software Analyst 4.12, verwendet.

2.

Um online UV-Spektren aufzunehmen wurde mit einem System der Fa. Dionex bestehend aus Pumpe P580, Autosampler Gina 50, Säulenofen STH 585, Degasser Degasys DG 2410, Diodenarray-Detektor Gynkotek UVD 320S, gesteuert über Computer Dell Optiflex GX1 mit Software Chromeleon 6.01 gearbeitet.

In beiden Fällen kamen Atlantis dC18 T3 Trennsäulen der Fa. Waters mit den Maßen 4,6 mm x 150 mm, 5 µm zum Einsatz.

Analytische LC-MS

Für massenspektrometrische Analysen kamen zwei verschiedene Systeme zum Einsatz. Probenionisation erfolgte in jedem Fall über ESI:

1.

Massenspektrometer 4000 Q-Trap LC/MS/MS/MS-System (Applied Biosystems), entweder in Kombination mit LC-System PE-Series 200 Micro Pump, Series 200 Vacuum degasser, Series 200 Mixer, Series 200 Autosampler, Series 200 Peltier Column oven (alle Perkin Elmer) und Säule Atlantis dC18 T3 2,1 mm x 150 mm, 5 µm oder mit Harvard Apparatus 11 plus als FIA-Analyse (Harvard Apparatus) ohne Säule. Steuerung und Auswertung erfolgte über Software Analyst.

2.

Massenspektrometer API 150 EX (PE Sciex), entweder in Kombination mit LC-System LC PE-Series 200 Micro Pump, Series 200 Vacuum degasser, Series 200 Autosampler, Series 200 Peltier Column oven (alle Perkin Elmer) und Säule Atlantis dC18 T3 2,1 mm x 150 mm, 5 µm oder Havard Apparatus 11 plus (Harvard Apparatus) ohne Säule. Steuerung und Auswertung erfolgte über Software Analyst.

Spektral Photometer

UV-Spectrophotometer Cary 3 Bio mit Temperaturkontrolle und Stickstoffbegasung (wenn nötig). Steuerungs- und Auswertesoftware Cary Win UV Version 3.00 (alles Varian).

NMR-Spektroskopie

Bruker Avance (400 MHz) Microbay ultrashielded (Bruker).

Schmelzpunktbestimmung

Schmelzpunktbestimmer Apotec (Wepa)

E.1.3 Pufferlösungen, Reagenzien, Enzympräparate

Eluenten

Die Eluenten für die Flüssigkeitschromatographie wurden nach dem Lösen des Ammoniumformiates mit Hilfe eines Vakuum-Filtersystems (Sartorius) über Membranen der Porengröße 0,45 µm filtriert und entgast.

AChE-Enzymbereitung

Als Quelle für humane AChE wurden sogenannte Erythrocyten-Geister verwendet. Diese sind die Membranhüllen entkernter Erythrocyten und werden wie folgt hergestellt:

Gewaschene Erythrocyten werden mit einem hypoosmolaren Puffer versetzt und dadurch und zusätzlich durch Ultrazentrifugation zum Platzen gebracht, das Hämoglobin tritt aus. Durch Dekantieren des Puffers erhält man eine Ghost-Suspension, die mit osmolarem Puffer aufgefüllt wird. Anschließend wird die Enzymaktivität der AChE durch weiteres Verdünnen auf den gewünschten Wert eingestellt.

Phosphatpuffer 0,1 ; pH 7,4

Der verwendete Phosphatpuffer besteht aus einer wässrigen Lösung von $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (100 mM) die mit ca. einem Drittel des eigenen Volumens einer wässrigen Lösung von KH_2PO_4 (100 mM) auf pH 7,4 eingestellt wird.

MOPS-Puffer 0,1 M; pH 7,4

20,9 g MOPS (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure) werden in 100 ml Reinstwasser unter Rühren gelöst, und anschließend wird die Lösung mit NaOH auf den pH-Wert eingestellt.

E.2 Methoden

E.2.1 Synthesen

E.2.1.1 N-Methyl-acetylpyridiniumiodide

Es wurden die stellungsisomeren 2-, 3- und 4- N-Methyl-Acetylpyridiniumoximiodide jeweils nach der gleichen Vorschrift in 2 Stufen synthetisiert. Die erste Stufe dient der Einführung der Oximgruppe durch Carbonylreaktion des Acetylpyridins mit Hydroxylamin. Der zweite Schritt besteht aus einer Methylierung des Pyridin-Stickstoffs.

E.2.1.1.1 N-Methyl-2-acetylpyridiniumoximiodid

Einführung der Oximgruppe [86]

120 mmol Hydroxylamin HCl (8,33 g) werden in 17 ml aqua dest. unter Rühren gelöst und

die Lösung anschließend filtriert. Diese Hydroxylaminlösung wird zu 23,3 ml frisch hergestellter Natronlauge (20 %ig) gegeben, die in einem 100 ml Einhalskolben vorgelegt ist. Durch Zufügen von 100 mmol 2-Acetylpyridin (11,18 ml) in einer Portion wird die Reaktion gestartet und unter Rühren bei 2-3°C (Eiskühlung) für ca. 3 h fortgeführt.

Nach dieser Zeit wird vom gebildeten Präzipitat unter Vacuum abfiltriert, der Filterkuchen anschließend mit kaltem Wasser gewaschen.

Das so erhaltene 2-Acetylpyridinoxim wird zum Umkristallisieren in 85°C heißem Wasser gelöst. Durch Abkühlen der Lösung auf ca. 40°C kommt es zum Ausfallen von 7,7 g weißer, langer nadelförmiger Kristalle, die anschließend mit Hochvakuum getrocknet werden (56 % d. Th.).

Fp.: 121-122°C (Lit : 114°C)[133]

¹H-NMR (deut. Aceton): δ [ppm]: 2,42 (s, 3H); 7,33 (t, 1H); 7,75 (t, 1H);
7,91 (d, 1H); 8,59 (d, 1H)

N-Methylierung des erhaltenen 2-Acetylpyridinoxims [134]

20 ml Acetonitril werden in einem 100 ml-Dreihalskolben vorgelegt, 10 mmol 2-Acetylpyridinoxim (1,36 g) darin suspendiert, unter Rückflusskühlung und Rühren auf 45°C erwärmt und anschließend 15 mmol (0,987 ml) Methyljodid zugegeben. Die Reaktionskontrolle erfolgt über HPLC-UV-Analyse nach Methode 1. Nach 7 Tagen wird nach Abkühlen der Lösung vom ausgefallenen Feststoff unter Vakuum abfiltriert und dieser nach Waschen mit Diethylether im Hochvakuum getrocknet. Man erhält 0,8 g einer feinkristallinen weiß-gelblichen Substanz (29% d. Th.).

Fp.: 182-183°C (Lit.: 185-196°C) [84]

¹H-NMR (D₂O): δ [ppm]: 2,26 (s, 3H); 4,23 (s, 3H); 7,97 (m, 2H); 8,50 (t, 1H); 8,76 (d, 1H)

Ret. (HPLC-Methode 1): 4,1 min (Isomer 1); 5,2 min (Isomer 2)

λ_{max}(AF 0,1 M) = 217 + 266 nm (Isomer 1); 222 + 271 nm (Isomer 2)

E.2.1.1.2 N-Methyl-3-acetylpyridiniumoximiodid

Einführung der Oximgruppe

120 mmol Hydroxylamin HCl (8,33 g) werden in 17 ml aqua dest. unter Rühren gelöst und die Lösung anschließend filtriert. Diese Hydroxylaminlösung wird zu 23,3 ml frisch hergestellter Natronlauge (20 %ig) gegeben, die in einem 100 ml Einhalskolben vorgelegt ist. Durch Zufügen von 100 mmol 3-Acetylpyridin (10,94 ml) in einer Portion wird die Reaktion gestartet und unter Rühren bei 2-3°C (Eiskühlung) für ca. 2 h fortgeführt.

Nach dieser Zeit wird vom gebildeten Präzipitat unter Vakuum abfiltriert, der Filterkuchen anschließend mit kaltem Wasser gewaschen.

Das so erhaltene 3-Acetylpyridinoxim wird zum Umkristallisieren in 85°C heißem Wasser gelöst. Durch Abkühlen der Lösung auf ca. 40°C kommt es zum Ausfallen von 4,4 g eines weißen, pulvrigen Feststoffes, der anschließend mit Hochvakuum getrocknet wird (32% d. Th.).

Fp.: 118-119°C

¹H-NMR (deut. Aceton): δ [ppm]: 2,32 (s, 3H); 7,38 (d, 1H); 8,03 (t, 1H); 8,56 (d, 1H); 8,89 (s, 1H)

N-Methylierung des erhaltenen 3-Acetylpyridinoxims

20 ml Acetonitril werden in einem 100 ml-Dreihalskolben vorgelegt, 10 mmol 3-Acetylpyridinoxim (1,36 g) darin suspendiert, unter Rückflusskühlung und Rühren auf 45°C erwärmt und anschließend 15 mmol (0,987 ml) Methyljodid zugegeben. Die Reaktionskontrolle erfolgt über HPLC-UV-Analyse nach Methode 1. Nach 5 h wird nach Abkühlen der Lösung vom ausgefallenen Feststoff unter Vakuum abfiltriert und dieser nach Waschen mit Diethylether im Hochvakuum getrocknet. Man erhält 2,5 g einer feinkristallinen weiß-gelblichen Substanz (90% d. Th.).

Fp.: 217-218°C (Lit.: 213-214°C)[84]

¹H-NMR (D₂O): δ [ppm]: 2,23 (s, 3H); 4,32 (s, 3H); 7,96 (t, 1H); 8,63 (d, 1H);
8,68 (d, 1H); 8,97 (s, 1H)

Ret. (HPLC-Methode 1): 4,4 min (Isomer 1); 6,7 min (Isomer 2)

λ_{max}(AF 0,1 M) = 231 + 265 nm (Isomer 1); 230 + 257 nm (Isomer 2)

E.2.1.1.3 N-Methyl-4-acetylpyridinoximiodid

Einführung der Oximgruppe

120 mmol Hydroxylamin HCl (8,33 g) werden in 17 ml aqua dest. unter Rühren gelöst und die Lösung anschließend filtriert. Diese Hydroxylaminlösung wird zu 23,3 ml frisch hergestellter Natronlauge (20 %ig) gegeben, die in einem 100 ml Einhalskolben vorgelegt ist. Durch Zufügen von 100 mmol 4-Acetylpyridin (10,97 ml) in einer Portion wird die Reaktion gestartet und unter Rühren bei 2-3°C (Eiskühlung) für ca. 2 h fortgeführt.

Nach dieser Zeit wird vom gebildeten Präzipitat unter Vacuum abfiltriert, der Filterkuchen anschließend mit kaltem Wasser gewaschen.

Das so erhaltene 4-Acetylpyridinoxim wird zum Umkristallisieren in 85°C heißem Wasser gelöst. Durch Abkühlen der Lösung auf ca. 40°C kommt es zum Ausfallen von 5,6 g weißer, kurzer nadelförmiger Kristalle, die anschließend mit Hochvakuum getrocknet werden (41% d. Th.).

Fp.: 153-154°C (Lit.: 146°C)[86]

$^1\text{H-NMR}$ (deut. Aceton): δ [ppm]: 2,25 (s, 3H); 7,63 (d, 2H, $^3\text{J} = 6,1$ Hz); 8,59 (d, 2H, $^3\text{J} = 6,1$ Hz);

N-Methylierung des erhaltenen 4-Acetylpyridinoxims

20 ml Acetonitril werden in einem 100 ml-Dreihalskolben vorgelegt, 10 mmol 4-Acetylpyridinoxim (1,36 g) darin suspendiert, unter Rückflusskühlung und Rühren auf 45°C erwärmt und anschließend 15 mmol (0,987 ml) Methyljodid zugegeben. Die Reaktionskontrolle erfolgt über HPLC-UV-Analyse nach Methode 1. Nach 5 h wird nach Abkühlen der Lösung vom ausgefallenen Feststoff unter Vakuum abfiltriert und dieser nach Waschen mit Diethylether im Hochvakuum getrocknet. Man erhält 2,1 g einer feinkristallinen zitronengelben Substanz (74% d. Th.).

Fp.: 190-191°C (Lit.:191-193°C)[84]

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): δ [ppm]: 2,23 (s, 3H); 4,47 (s, 3H); 8,14 (d, 2H, $^3\text{J} = 6,0$ Hz);
8,65 (d, 2H, $^3\text{J} = 6,0$ Hz)

Ret. (HPLC-Methode 1): 4,6 min (Isomer 1); 8,3 min (Isomer 2)

λ_{max} (AF 0,1 M) = 217 + 267 nm (Isomer 1); 218 + 278 nm (Isomer 2)

E.2.1.2 N-Methyl-formylpyridiniumoximiodide

E.2.1.2.1 N-Methyl-2-formylpyridiniumoximiodid

Käuflich erworbenes 2-PAM Chlorid (Fa. Sigma-Aldrich) wurde mit KJ zu 2-PAM Iodid umgesalzt:

10 mmol 2 PAM Chlorid (1,736 g) wird in 2 ml Wasser gelöst. Nach Zugabe von 2 ml einer 10 mM Kaliumiodid-Lösung bei RT fällt 2-PAMJ sofort als gelber Feststoff aus. Vom Feststoff wird abfiltriert und der Filterkuchen mit etwas Wasser und Isopropanol gespült. Nach Trocknen im Hochvakuum ergibt sich eine Ausbeute von 10,1 g (83 % d. Th).

Fp.: 223-224°C (Lit.:224-225°C)[84]

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): δ [ppm]: 4,3 (s, 3H); 7,89 (t, 1H); 8,29 (d, 1H, $^3\text{J} = 7,8$ Hz);
8,40 (t, 1H, $^3\text{J} = 7,85$ Hz); 8,6 (s, 1H); 8,66 (d, 1H)

Ret. (HPLC-Methode 1): 3,8 min (Isomer 1); 4,2 min (Isomer 2)

λ_{max} (AF 0,1 M) = 216 + 273 nm (Isomer 1); 222 + 294 nm (Isomer 2)

E.2.1.2.2 N-Methyl-3-formylpyridiniumoximiodid

N-Methyl-3-Formylpyridiniumoximiodid erhält man durch Methylierung von 3-Formylpyridinoxim:

20 ml Acetonitril werden in einem 100 ml-Dreihalskolben vorgelegt, 10 mmol 3-Formylpyridinoxim (1,22 g) darin suspendiert, unter Rückflusskühlung und Rühren auf 45°C erwärmt und anschließend 15 mmol Methyljodid (0,987 ml) zugegeben. Reaktionskontrolle erfolgt über HPLC-UV-Analyse nach Methode 1. Nach einer Reaktionszeit von 5 h wird nach Abkühlen der Lösung vom ausgefallenen Feststoff unter Vakuum abfiltriert und dieser nach Waschen mit Diethylether im Hochvakuum getrocknet. Die feinkristalline Substanz zeigt weißlich-hellgelbe Färbung (9,5 g; 78% d. Th.)

Fp.: 153-154°C (Lit : 154-155°C)[84]

¹H-NMR (D₂O): δ [ppm]: 4,32 (s, 3H); 7,97 (t, 1H, ³J = 6,66 Hz); 8,26 (s, 1H); 8,6 (d, 1H),
8,71 (d, 1H, ³J = 6,66 Hz); 8,94 (s, 1H)

Ret. (HPLC-Methode 1): 4,0 min (Isomer 1); 4,2 min (Isomer 2)

λ_{max}(AF 0,1 M) = 225 + 249 nm (Isomer 1); 226 + 253 nm (Isomer 2)

E.2.1.2.3 N-Methyl-4-formylpyridiniumoximiodid

N-Methyl-4-Formylpyridiniumoximiodid erhält man durch Methylierung von 4-Formylalloxim:

130 ml Acetonitril werden in einem 250ml-Dreihalskolben vorgelegt, 100 mmol 4-Formylpyridinoxim (12,2 g) darin suspendiert, unter Rückflusskühlung und Rühren auf 60°C erwärmt und anschließend durch Zugabe von 150 mmol Methyljodid (9,87 ml) die Methylierung in Gang gesetzt. Bereits wenige Minuten nach Zugabe zeigt sich beginnende Ausfällung eines gelben Feststoffes, die mit der Zeit weiter zunimmt. Reaktionskontrolle erfolgt über HPLC-UV-Analyse nach Methode 1. Nach einer Reaktionszeit von 7 h wird nach Abkühlen der Lösung vom ausgefallenen Feststoff unter Vakuum abfiltriert und dieser nach Waschen mit Acetonitril im Hochvakuum getrocknet. Die feinkristalline Substanz zeigt intensive gelbe Färbung (9,5 g; 78% d. Th.).

Fp.: 180-181°C (Lit.: 181-183°C)[84]

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): δ [ppm]: 4,27 (s, 3H); 8,08 (d, 2H, $^3\text{J} = 5,8$ Hz); 8,28 (s, 1H);
8,65 (d, 2H, $^3\text{J} = 5,8$ Hz)

Ret. (HPLC-Methode 1): 4,3 min (Isomer 1); 4,8 min (Isomer 2)

λ_{max} (AF 0,1 M) = 216 + 277 nm (Isomer 1); 218 + 279 nm (Isomer 2)

E.2.1.3 N-Methyl-3-cyanopyridiniumiodid

100 ml Acetonitril werden in einem 250ml-Dreihalskolben vorgelegt, 100 mmol 3-Cyanopyridin (10,4 g) darin suspendiert, unter Rückflusskühlung und Rühren auf 60°C erwärmt und anschließend 150 mmol Methyljodid (9,87 ml) zugesetzt. Es beginnt sofort die Ausfällung eines gelben Feststoffes. Reaktionskontrolle erfolgt über HPLC-UV-Analyse nach Methode 1. Nach einer Reaktionszeit von 5 h wird nach Abkühlen der Lösung vom ausgefallenen Feststoff unter Vakuum abfiltriert und dieser nach Waschen mit Acetonitril im Hochvakuum getrocknet. Die feinkristalline Substanz zeigt intensive gelbe Färbung (14,8 g; 60% d. Th.).

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): δ [ppm]: 4,40 (s, 3H); 8,17 (d, 1H); 8,85 (d, 1H); 9,02 (d, 1H), 9,36 (s, 1H)

Retentionszeit (HPLC-Methode 1): 2,3 min

λ_{max} (AF 0,1 M) = 220 + 269 nm

E.2.1.4 EMP-2-APO / EMP-3-APO / EMP-4-APO

Zu einer 10 mM wässrigen Lösung des Oxims wird soviel einer 10%igen VX-Stammlösung in Isopropanol zugegeben, dass beide Edukte in einer Konzentration von 5 mM vorliegen. Der Reaktionsansatz wird nach Mischen bei RT stehen gelassen, Nach bestimmten Zeiten (ab 12 h) ab Reaktionsbeginn wird das gebildete POx über eine HPLC-Trennung aus dem Reaktionsansatz isoliert und der Peak fraktioniert. Die so gewonnene reine POx-Fraktion wird sofort auf Eis gelagert. POx-Fractionen verschiedener Trennungen werden fusioniert und bei -80°C eingefroren.

Ret. (HPLC-Methode 1): 15,7 min (EMP-2-APO); 18,6 min (EMP-3-APO);

19,5 min (EMP-4-APO)

λ_{max} (AF 0,1M; MeOH 15%) = 220 + 269 nm (EMP-2-APO); 221 (+ 241 + 273) nm
(EMP-3-APO); 213 + 258 nm (EMP-4-APO)

E.2.1.5 EMP-2-PAM / EMP-3-PAM / EMP-4-PAM

Zu einer 10 mM wässrigen Lösung des Oxims wird soviel einer 10%igen VX-Stammlösung in Isopropanol zugegeben, dass beide Edukte in einer Konzentration von 5 mM vorliegen. Der Reaktionsansatz wird nach Mischen bei RT stehen gelassen, Nach bestimmten Zeiten (ab 12 h) wird das gebildete POx über eine HPLC-Trennung nach Methode 1 aus dem Reaktionsansatz isoliert und der Peak fraktioniert. Die so gewonnene reine POx-Fraktion wird sofort auf Eis gelagert. POx-Fractionen verschiedener Trennungen werden fusioniert und bei -80°C eingefroren.

Ret. (HPLC-Methode 1): 12,4 min (EMP-3-PAM); 13,8 min (EMP-4-PAM)

λ_{max} (AF 0,1M; MeOH 15%) = 218 + 243 + 281 nm (EMP-3-PAM);
211 + 255 nm (EMP-4-PAM)

E.2.1.6 Ethylmethylphosphonyl-Obidoxim (EMP-Obidoxim)

Zu einer wässrigen VX-Verdünnung wird aus einer Obidoxim-Stammlösung (200 mM in Wasser) ein solches Volumen zugesetzt, dass beide Edukte in einer Konzentration von 5 mM vorliegen. Bereits vor Zugabe des Oxims wird das Vial auf Eis gelagert, wo es auch während der Reaktion verbleibt, so dass die Reaktionstemperatur bei ca. 3°C liegt.

Ab 2 h nach Reaktionsbeginn erfolgt das Abtrennen des EMP-Obidoxims aus dem Reaktionsansatz durch HPLC-Trennung (HPLC-Methode 1) mit UV-Detektion und Sammeln der reinen POx-Fraktion. Diese wird sofort auf Eis gelagert. POx-Fractionen verschiedener Trennungen eines Reaktionsansatzes werden fusioniert und bei -80°C gelagert.

Ret. (HPLC-Methode 1): 14,1 min

λ_{max} (AF 0,1M; MeOH 15%) = 275 nm

E.2.1.7 n-Butylmethylphosphonyl-Obidoxim (n-BMP-Obidoxim) und i-Butylmethylphosphonyl-Obidoxim (i-BMP-Obidoxim)

Zu einer wässrigen VX-Lösung wird aus einer Obidoxim-Stammlösung (200 mM in Wasser) ein solches Volumen zugesetzt, dass beide Edukte in einer Konzentration von 5 mM vorliegen. Bereits vor Zugabe des Oxims wird das Vial auf Eis gelagert, wo es auch während der Reaktion verbleibt, so dass die Reaktionstemperatur bei ca. 3°C liegt.

Ab ca. 45 min nach Reaktionsbeginn erfolgt das Abtrennen des POx aus dem Reaktionsansatz durch HPLC-Trennung (HPLC-Methode 2) mit UV-Detektion und Sammeln der reinen POx-Fraktion. Diese wird sofort auf Eis gelagert. POx-Fractionen verschiedener Trennungen eines Reaktionsansatzes werden fusioniert und bei – 80°C gelagert.

Ret. (HPLC-Methode 2): 11,6 min (i-BMP-Obidoxim); 12,1 min (n-BMP-Obidoxim)

λ_{\max} (AF 0,1M; MeOH 50%) = 275 nm

E.2.2 HPLC-UV und LC-MS-Methoden

HPLC-Methode 1

Fluss:	1 ml/min;
Injektionsvolumen:	50 µl;
Säule:	Atlantis dC 18 T3 4,6 mm x 15 mm, 5 µm; Fa. Waters
Eluent:	A= Ammoniumformiat 100 mM in Aqua puriss. B= Ammoniumformiat 100 mM in Methanol 50%;
Gradient:	0 min : 2% Eluent B, 10 min: 20% Eluent B, 13 min 20% Eluent B, 18 min: 36,7% Eluent B, 20 min: 100% Eluent B; 23 min: 100% Eluent B, 24 min: 2% Eluent B, 28 min 2% Eluent B
Detektion:	UV (λ je nach Probe)
Fraktionierung :	automatische Peakfraktionierung (bei Bedarf)

HPLC-Methode 2

Fluss: 1 ml/min;
Injektionsvolumen: 50 µl;
Säule: Atlantis dC 18 T3 4,6 mm x 15 mm, 5 µm; Fa. Waters
Eluent: A= Ammoniumformiat 100 mM in Aqua puriss.,
B= Ammoniumformiat 100 mM in Methanol 50%;
Gradient: 0 min: 5% Eluent B,
13 min: 100% Eluent B,
15 min: 100% Eluent B,
16 min: 5% Eluent B,
20 min: 5% Eluent B
Detektor: UV
Fraktionierung : automatische Peakfraktionierung (bei Bedarf)

LC-MS-Methode 1

Fluss: 208 µl/min;
Injektionsvolumen: 10 µl;
Säule: Atlantis dC 18 T3 2,1 mm x 15 mm, 5 µm; Fa. Waters
Eluent: A= Ammoniumformiat 100 mM in Aqua puriss.,
B= Ammoniumformiat 100 mM in Methanol 50%;
Gradient: 0 min: 2% Eluent B,
10 min: 20% Eluent B,
13 min: 20% Eluent B,
18 min: 36,7% Eluent B,
20 min: 100% Eluent B;
23 min: 100% Eluent B,
24 min: 2% Eluent B,
28 min: 2 % Eluent B
Detektion: MS-Q1-Full-Scan m/z 50-500, 2 Sekunden, positiver Modus;
ggf. Product-Ion-Mode (MS-MS) verschiedener Massen mit
Collision Energy 10-53, positiver Modus

LC-MS-Methode 2

Fluss: 208 µl/min;
Injektionsvolumen: 10 µl;
Säule: Atlantis dC 18 T3 2,1 mm x 15 mm, 5 µm; Fa. Waters
Eluent: A= Ammoniumformiat 100 mM in Aqua puriss.,
B= Ammoniumformiat 100 mM in Methanol 50%;
Gradient: 0 min: 5% Eluent B,
13 min: 100% Eluent B,
15 min: 100% Eluent B,
16 min: 5% Eluent B,
20 min: 5% Eluent B
Detektion: MS-Q1-Full-Scan m/z 50-500, 2 Sekunden, positiver Modus
ggf. Product-Ion-Mode (MS-MS) verschiedener Massen mit
Collision Energy 10-53

LC-MS-Methode 3

Fluss: 175 µl/min;
Injektionsvolumen: 10 µl;
Säule: Hypercarb 2,1 x 10 mm, 5 µm, Fa. Thermo Electron
Eluent: A = Ameisensäure 2%
B = Acetonitril
Gradient: 0 min: 0% Eluent B
2 min: 20% Eluent B
7 min: 20% Eluent B
9 min: 80% Eluent B
15 min: 80% Eluent B
16 min: 0% Eluent B
20 min: 0% Eluent B
Detektion: Massenselektiver SIM-Mode : m/z 95, 123, 151, 300 msec ; negativer
Modus, Declustering Potential = -17,
Focussing Potential = - 120, Entrance Potential = -4, Nebulizer Gas =
9, Curtain Gas= 11, Ion Spray Voltage= -4200, Temperature= 0

E.2.3 Identitätsbestimmungen

Neben der Verschiebung der UV-Spektren der POx zu niedrigeren Wellenlängen gegenüber den zugrunde liegenden Oximen (Methoden s. E.2.8), der Hemmeigenschaft des POx auf AChE (Methoden s. E.2.6) und den Abbau zur Phosphonsäure (Methode s. E.2.5) kann die Identität durch massenspektrometrische Analyse des Masse-Ladungs-Verhältnisses m/z des jeweiligen Molekülpeaks und dessen Fragmentmuster bestimmt werden.

Zwei Möglichkeiten bieten sich hierbei:

FIA über Spritzeninfusion

Über den Harvard-Apparatus wird die Lösung der zu analysierenden Substanz direkt ohne Säule in das MS gebracht.

Full-Scan-Modus im Quadrupol 1 (Q1) von m/z 50-500 innerhalb von 2 Sekunden, positiver Modus, 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ Flussrate der Harvard-Infusionspumpe mit Mikroliterspritze, Declustering Potential: 10, CE: 10 bis 53, IS: 5500

Flüssigkeitschromatographie mit Säulentrennung und MS bzw. MS-MS-Detektion

Die zu untersuchende Lösung wird über das HPLC-System unter Verwendung einer Säule in das MS eingebracht. Für EMP-Obidoxim kommt hierbei LC-Methode 1, für n- und -i-BMP-Obidoxim LC-Methode 2 zum Einsatz.

E.2.4 Reinheitsbestimmung

E.2.4.1 Test auf UV-sichtbare Verunreinigungen:

Gesammelte POx-Fractionen werden erneut über HPLC unter Verwendung der jeweiligen chromatographischen Methode (s. E.2.2.), die auch zur Fraktionierung verwendet wurde, analysiert. Grund hierfür ist die relative Instabilität des POx, die Analyse dient dazu, eventuellen Zerfall zu erkennen.

E.2.4.2 Test auf nicht UV-sichtbare Verunreinigungen

POx-Fractionen aus der präparativen HPLC werden über Flow-Injection-Analysis (FIA) per LC-MS analysiert:

Full-Scan-Modus im Quadrupol 1 (Q1) von m/z 50-500 innerhalb von 2 Sekunden, positiver Modus, 20 µl/min Flussrate der Harvard-Infusionspumpe mit Mikroliterspritze, Declustering Potential: 10

E.2.5 Quantifizierung

100 µl POx werden mit 10 µl KOH 1M versetzt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wird mit 10 µl HCl 1 M neutralisiert und die Lösung per LC-MS analysiert. Ziel ist es, die durch die alkalische Hydrolyse entstandene, dem jeweiligen Organophosphat zugehörige Phosphonsäure quantitativ zu erfassen. Dies sind für VX Ethylmethylphosphonsäure (EMPS), für VR Isobutylmethylphosphonsäure (i-BMPS) und für CVX n-Butylmethylphosphonsäure (n-BMPS). Die mit KOH hydrolysierten POx-Proben werden per LC-MS (LC-MS-Methode 3) vermessen und die ermittelten Flächen an Phosphonsäure über die zuvor erstellten Kalibriergeraden in die entsprechenden Konzentrationen umgerechnet. Die Phosphonsäure-Standardlösungen werden in einer Mischung von 30% Eluent B in Eluent A hergestellt und anschließend wie die Proben selbst mit 10% KOH 1M und 10% HCl 1 M versetzt. Die ermittelten Werte können also direkt verglichen werden.

Zu beachten ist, dass eventuell durch spontane Hydrolyse oder Nitrilbildung des POx vor KOH-Zugabe entstandene Phosphonsäure-Flächen von den nach der KOH-Behandlung ermittelten Flächen abgezogen werden. Zu diesem Zweck wird reines POx unbehandelt ebenfalls mit der gegebenen LC-MS-Methode 3 per LC-MS analysiert. Zur Überprüfung der Linearität der Methode können verschiedene POx-Konzentrationen eingesetzt werden (s. D.4.3). Um einen eventuellen Abbau der EMPS, n-BMPS oder i-BMPS zur Methylphosphonsäure (MPS) zu erfassen, wird auch die Massenspur m/z 95 gemessen.

Die Quantifizierung der EMP-APO erfolgt analog, nur dass hier die Inkubationsdauer mit KOH aufgrund der im Vergleich zu den drei Obidoxim-V-Stoff-POx höheren Stabilität auf 4 h verlängert ist.

E.2.6 Kinetik der Direktreaktion von V-Stoff und Obidoxim

Ansätze der V-Stoffe und Oxime verschiedener Konzentrationen werden in wässrigen Lösungen je nach Fragestellung bei unterschiedlichen Temperaturen zur Reaktion gebracht und zu gegebenen Zeitpunkten Aliquote entnommen. Dies geschieht über die Verwendung von automatisierten Probeaufgabesystemen der HPLC-Geräte. Die so entnommenen Proben werden in das HPLC-System eingebracht und unter Verwendung der HPLC-Methoden 1 oder 2 aufgetrennt. Die Peaks des so aufgenommenen Chromatogrammes werden mithilfe der Gerätesoftware integriert und die so erhaltenen Flächenwerte zur weiteren kinetischen Auswertung verwendet. Diese geschieht nach den Maßgaben der Literatur zur Kinetik 1. und 2. Ordnung.

E.2.7 Hemmaktivität der POx gegenüber humaner AChE

Zugrunde liegendes Prinzip ist die modifizierte Ellman-Reaktion. Es wird die Aktivität der AChE mithilfe einer kontinuierlichen Methode gemessen, indem der Anstieg des aus der Spaltung von Acetylthiocholin entstehenden Anions durch Umsetzung mit dem Reagenz DTNB über eine Farbreaktion sichtbar gemacht wird.

Photometrische Bestimmung zur kinetischen Auswertung (kontinuierliche Methode)

Für EMP- i-BMP- und n-BMP-Obidoxim:

Photometer-Kunststoffküvetten werden mit 3000 µl Phosphatpuffer (pH 7,4; 0,1 M), 10 µl Erythrocyten-Geistern und 100 µl DTNB-Lösung (10 mM) gefüllt und auf Eis gelagert.

Der Küvettenblock des Photometers ist auf 10°C heruntergekühlt, da die Hemmaktivität der zu messenden POx gegenüber AChE sehr hoch ist und bei höheren Temperaturen die Reaktion zu schnell voranschreiten würde, um gut messbar zu sein. Um ein Beschlagen der äußeren Küvettenwandungen mit Kondenswasser zu verhindern, muss mit Stickstoff begast werden.

Durch Zugabe des Substrates ASCh (28,4 mM) wird die Reaktion gestartet und die Grundaktivität eine Minute lang gemessen. Danach werden 5 µl der POx-Fraktion zugegeben,

was zu einem Abflachen der Kurve führt. Die Messung wird so lange durchgeführt, bis die Kurve in ein Plateau übergeht, sich die Reaktionsgeschwindigkeit also nicht mehr ändert.

Die Auswahl der zu verwendenden POx-Konzentrationen muss so gewählt werden, dass die Zeit, bis die Reaktion in das Plateau übergeht, groß genug ist, um ausreichend Messwerte generieren zu können. Dies erfordert Vorversuche. Aus den erhaltenen Messwerten wird über die Formel von Forsberg und Puu (s. Allgemeiner Teil, B.1.6) die Hemmkonstante zweiter Ordnung bestimmt.

Für EMP-APO:

Die Durchführung der Methode erfolgt wie für Obidoxim-POx (s.o.), nur wird der Küvettenblock im Photometer auf 37°C geheizt, da die Hemmreaktion der APO-POx langsam vonstatten geht.

Direkte optische Bestimmung zur qualitativen Auswertung

100 µl Erythrocyten-Ghosts werden mit 10 µl der zu testenden Lösung, z.B. HPLC-Fraktion, versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 10 µl dieser Lösung in eine Küvette überführt, die 3000 µl Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4 und 100 µl DTNB enthält. Die Farbreaktion wird durch Zugabe von 50 µl ASCh gestartet und das Ergebnis der Reaktion nach einer Reaktionszeit von 10 min bei RT abgelesen. Hat sich eine sichtbare Gelbfärbung gebildet, ist die Erythrocyten AChE nicht gehemmt worden, d.h. die getestete Fraktion zeigt keine Hemmaktivität. Unterbleibt dagegen die Gelbfärbung bzw. fällt diese schwächer aus als bei einer Vergleichsreaktion mit ungehemmtem Enzym, kann von Hemmeigenschaften der Lösung ausgegangen werden.

E.2.8 Hydrolysekinetik der phosphonylierten Pyridiniumoxime

Die Hydrolysegeschwindigkeiten der POx werden über die Abnahme der POx-Hemmwirkung auf AChE mit der Zeit ermittelt. Der Test basiert auf der Ellman-Reaktion und misst die Reaktivität der AChE im UV-Vis-Photometer anhand einer Farbreaktion des vom aktiven Enzym per Spaltung aus ASCh generierten Cholins. Es wird eine Vormischung aus einem der Anzahl der geplanten Messungen entsprechenden Vielfachen von 3000 µl Phosphatpuffer pH 7,4 (0,1 M), 100 µl DTNB und 10 µl humanen Ghosts hergetellt. Davon werden je 3000 µl in

eine Kunststoffküvette übertragen und die Küvetten auf Eis gelagert, um die Stabilität des Enzyms zu gewährleisten.

Die per HPLC gesammelten POx-Fraktionen werden in Phosphatpuffer pH 7,4 (0,1 M) verdünnt und bei 37°C inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten werden 5 µl der POx-Verdünnung in eine der vorbereiteten Küvetten gegeben, die zuvor für 10 min in den auf 37°C temperierten Messblock des Photometers eingestellt wurden. Nach Mischen wird eine Inkubationszeit von 2 min abgewartet und danach 50 µl des Substrates ASCh zugegeben. Die Zunahme der Absorption wird eine Minute lang bei 412 nm gemessen. Auftragung der Absorption gegen die Zeit ergibt eine Gerade, deren Steigung als Maß für die Restaktivität des Enzyms gewertet werden kann. Die anfängliche Verdünnung der POx-Fraktionen im Phosphatpuffer sollte so gewählt werden, dass die Restaktivität des mit dieser Verdünnung inkubierten Enzyms zu Beginn nicht unter 5 % liegt, da bei geringeren Werten nicht sicher von einer linearen Beziehung ausgegangen werden kann. In den durchgeführten Versuchen betrug die POx-Konzentration 0,3 bis 0,4 µM. Um die Restaktivität zu bestimmen, muss die Grundaktivität der verwendeten Enzymlösung bestimmt werden. Dazu wird eine vorbereitete Küvette statt mit POx-Verdünnung mit 5 µl Phosphatpuffer versetzt und die Zunahme der Absorption gemessen. Setzt man die so ermittelte Grundaktivität als 100%, kann man die nach POx-Einwirkung gemessenen Werte in % Restaktivität ausdrücken.

Über $(100 - \text{Restaktivität } \%)$ kann diese in % Hemmung umgerechnet werden. Das Ausmaß der Hemmung geht wiederum einher mit der Konzentration des POx, sinkt also bei zunehmender Hydrolyse des POx.

E.2.9 Aufnahme von UV-Spektren

E.2.9.1 UV-Spektren über Photometer

30 µl einer Obidoxim-Lösung der Konzentration 1 mM werden zu 2970 µl verschiedener Flüssigkeiten (Wasser-Methanolgemische, z.T. mit Zusatz von 100 mM Ammoniumformiat) in eine Quarzglas-Küvette gegeben und ein Scan über den Wellenlängenbereich 800 bis 190 nm gefahren. Daraus ergeben sich die Wellenlängen der maximalen Absorption.

Bei diesen Wellenlängen werden dann Messungen der Absorption durchgeführt.

So kann der molare Absorptionskoeffizient ε bestimmt werden. Dieser ist gleich der Absorption einer 1 M Lösung eines Stoffes gemessen in einer Küvette der Schichtdicke 1 cm und stellt eine charakteristische Stoffkonstante dar. Es gilt folgender Zusammenhang:

$$\varepsilon(\lambda) = \frac{A}{b \cdot c}$$

wobei λ die Wellenlänge, A die Absorption, b die Schichtdicke in cm und c die molare Konzentration des Stoffes in mol/l darstellt.

E.2.9.2 UV-Spektren über HPLC-Diodenarraydetektor

Die UV-Spektren der im Verlauf der Direktreaktion zwischen Organophosphat und Oxim auftretenden Verbindungen ließen sich am besten durch Aufzeichnung des Chromatogramms mithilfe eines Diodenarray-Detektors erfassen.

Die verwendeten Einstellungen sind wie folgt:

UV-VIS Wellenlänge: 286 nm, Bandbreite 4 nm

Referenz-Wellenlänge: 400 nm, Referenz-Bandbreite 4 nm

F Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erstmals verschiedene phosphonylierte Oxime (POx) durch Direktreaktion aus Obidoxim (N,N-Dimethylenoxidbis-(pyridinium-4-aldoxim)dichlorid) und den konstitutionsisomeren V-Stoffen VX (O-Ethyl-S-[2-(diisopropylamino)ethyl]methylphosphonothiolat) VR (O-Isobutyl-S-[2-(diethylamino)ethyl]-methylphosphonothiolat) und CVX (O-n-butyl-S-[2-(diethylamino)ethyl]methylphosphonothiolat) dargestellt. Dabei wurden die Reaktionen bei verschiedenen Temperaturen und unterschiedlichen Konzentrationen der Ausgangsstoffe durchgeführt und die Abnahme der Edukte sowie die Zunahme der Produkte erfasst. Neue flüssigkeitschromatographische Methoden wurden hierfür entwickelt.

Obidoxim, von dem verschiedene isomere Formen existieren, konnte in wässriger Lösung mittels HPLC-Analyse in das syn-anti- und das syn-syn-Obidoxim getrennt und so festgestellt werden, dass das zu ca. 4% in einer wässrigen Lösung vorliegende syn-anti-Obidoxim um den Faktor 100 schneller mit den V-Stoffen reagiert als das stabilere syn-syn-Obidoxim. Die Reaktionskinetik der Direktreaktion wird also überwiegend von ersterem bestimmt.

Als Hauptabbauweg der phosphonylierten Oxime ist in der Literatur eine β -Eliminierung unter Bildung des Nitrils beschrieben. Der Vergleich der Reaktion von V-Stoffen und den stellungsisomeren 2-, 3- und 4-N-Methylacetylpyridiniumoximiodiden (2-, 3-, 4-APO), die als Ketoxime aufgrund ihrer β -ständigen Methylgruppe nicht zur β -Eliminierung befähigt sind, mit der der 2-, 3- und 4-N-Methylformylpyridiniumoximiodide (2-, 3-, 4-PAM), die als Aldoxime ein β -ständiges Wasserstoffatom aufweisen, belegte die Richtigkeit der Annahme einer solchen Zerfallsreaktion, denn die phosphonylierten Ketoxime zeigten keinen Abbau zum Nitril und generell eine sehr hohe Stabilität.

Die Hydrolysegeschwindigkeit der phosphonylierten Oxime aus Obidoxim und V-Stoffen in Phosphatpuffer unter physiologischen Bedingungen (0,1 M; pH-Wert 7,4; Temperatur 37°C) wurde gemessen. Es ergab sich für Ethylmethylphosphonyl- (EMP-) und n-Butylmethylphosphonyl-Obidoxim (n-BMP-Obidoxim) eine Halbwertszeit von 7,6 min und für i-Butylmethylphosphonyl-Obidoxim (i-BMP-Obidoxim) von 8,6 min, berechnet nach einer Kinetik 1. Ordnung.

Ferner wurden die Hemmeigenschaften der verschiedenen POx gegenüber humaner Acetylcholinesterase (AChE) erfasst und durch Hemmkonstanten 2. Ordnung bestimmt. Sie betragen für EMP-Obidoxim $8,5 * 10^8$, für i-BMP-Obidoxim $9 * 10^8$ und für n-BMP-Obidoxim $7,1 * 10^8 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Es zeigte sich hierbei, dass die POx-Bildung aus der Reaktion von VX, VR oder CVX mit Obidoxim zu sehr potenten Hemmstoffen führt, 9 bis 64fach stärker toxisch wirksam als das zugrunde liegende Organophosphat. Hingegen bewirkt die Reaktion der V-Stoffe mit APO eine Abnahme der Giftwirkung. So ergab sich für 2-EMP-APO eine Hemmkonstante von lediglich $3,72 * 10^6$ und für 4-EMP-APO von $1,8 * 10^6 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Damit hat die Struktur des Oximrestes des phosphonylierten Oxims einen entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß der Hemmaktivität, da dieser bei einer Inhibitionsreaktion mit AChE als Abgangsgruppe fungiert.

G Literatur

1. Aktories K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9 ed. München: Urban & Fischer; 2005.
2. Ekström F, Akfur C, Tunemalm AK, Lundberg S. Structural changes of phenylalanine 338 and histidine 447 revealed by the crystal structures of tabun-inhibited murine acetylcholinesterase. *Biochem* 2006; 45(1):74-81.
3. Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2(4):294-302.
4. Massoulie J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol* 1993; 41(1):31-91.
5. Auterhoff H, Knabe J, Höltje H-D. Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie. 14 ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 1999.
6. Aktories K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9 ed. München: Urban & Fischer; 2005.
7. Szinicz L, Baskin S. Chemische und biologische Kampfstoffe. In: Marquardt H, Schäfer S, editors. Lehrbuch der Toxikologie. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2004.
8. Klimmek R, Szinicz L, Weger N. Chemische Gifte und Kampfstoffe. 1 ed. Stuttgart: Hippokrates Verlag; 1983.
9. Eyer P, Kiderlen D, Meischner V, Szinicz L, Thiermann H, Worek F et al. The current status of oximes in the treatment of OP poisoning - comparing two regimes. *Clin Toxicol* 2003; 41(4):441-443.
10. Luo C, Saxena A, Smith M, Garcia G, Radic Z, Taylor P et al. Phosphoryl oxime inhibition of acetylcholinesterase during oxime reactivation is prevented by edrophonium. *Biochem* 1999; 38:9937-9947.
11. Ashani Y, Bhattacharjee AK, Leader H, Saxena A, Doctor BP. Inhibition of cholinesterases with cationic phosphonyl oximes highlights distinctive properties of the charged pyridine groups of quaternary oxime reactivators. *Biochem Pharmacol* 2003; 66:191-202.
12. Kiderlen D, Eyer P, Worek F. Formation and disposition of diethylphosphoryl-obidoxime, a potent anticholinesterase that is hydrolysed by human paraoxonase (PON1). *Biochem Pharmacol* 2005; 69:1853-1867.
13. Szinicz L. History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology* 2005; 214:167-181.

14. Eyer P, Thiermann H, Worek F, Szinicz L, Eyer F, Zilker T. The role of atropine and oximes in the treatment of organophosphorus insecticide poisoning. *Clin Toxicol* 2005; 43(5):447-448.
15. Eyer P. The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning. *Toxicol Rev* 2003; 22(3):165-190.
16. Eddleston M, Karalliedde L, Buckley N, Fernando R, Hutchinson G, Isbister G et al. Pesticide poisoning in the developing world--a minimum pesticides list. *Lancet* 2002; 360(9340):1163-1167.
17. Eddleston M, Buckley NA, Eyer P, Dawson AH. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet* 2007; .
18. Tu A. The First Mass Chemical Terrorism Using Sarin in Matsumoto, Japan. *Archives of Toxicology Kinetics and Xenobiotic Metabolism* 2001; 9, 3:65-93.
19. Tu A. Basic Information on Nerve Gas and the Use of Sarin by Aum Sinrikyo. *J Mass Spectrom Soc Jpn* 1996; 44(3).
20. Weber M. Zur Problematik der Entgiftung sowie der Nachweisverfahren von Methylthiophosphonsäure-o-alkyl-s-(2-N,N-dialkylaminoethyl)estern (sog. V-Stoffen). Dissertation, Christian-Albrechts Universität zu Kiel; 2000.
21. Tammelin LE. Organophosphorylcholines and cholinesterases. *Ark Kemi* 1958; 12:287-298.
22. Tammelin LE. Methyl-fluoro-phosphorylcholines. Two synthetic cholinergic drugs and their tertiary homologues. *Acta Chem Scand* 1957; 11:859-865.
23. Tammelin LE. Dialkoxy-phosphorylthiocholines, alkoxy-methyl-phosphorylthiocholines and analogous choline esters. Syntheses, pKa of tertiary homologues and cholinesterase inhibition. *Acta Chem Scand* 1957; 11:1340-1349.
24. Aurbek N, Thiermann H, Szinicz L, Eyer P, Worek F. Analysis of inhibition, reactivation and aging kinetics of highly toxic organophosphorus compounds with human and pig acetylcholinesterase. *Toxicology* 2006; 224(1-2):91-99.
25. Epstein J, Callahan JJ, Bauer VE. The Kinetics and Mechanisms of Hydrolysis of Phosphonothiolates in Dilute Aqueous Solution. *Phosphorus* 1974; 4:157-163.
26. Donarski WJ, Dumas DP, Heitmeyer DP, Lewis VE, Raushel FM. Structure-activity relationships in the hydrolysis of substrates by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Biochem* 1989; 28:4650-4655.
27. Dumas DP, Durst HD, Landis WG, Raushel FM, Wild JR. Inactivation of organophosphorus nerve agents by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Arch Biochem Biophys* 1990; 277:155-159.

28. Dumas DP, Caldwell SR, Wild JR, Raushel FM. Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *J Biol Chem* 1989; 264:19659-19665.
29. Prokop Z, Oplustil F, DeFrank J, Damborsky J. Enzymes fight chemical weapons. *Biotechnol J* 2006; 1(12):1370-1380.
30. Rastogi VK, DeFrank JJ, Cheng TC, Wild JR. Enzymatic hydrolysis of Russian-VX by organophosphorus hydrolase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241:294-296.
31. Omburo GA, Kuo JM, Mullins LS, Raushel FM. Characterization of the zinc binding site of bacterial phosphotriesterase. *J Biol Chem* 1992; 267:13278-13282.
32. Briseno-Roa L, Hill J, Notman S, Sellers D, Smith AP, Timperley CM et al. Analogues with fluorescent leaving groups for screening and selection of enzymes that efficiently hydrolyze organophosphorus nerve agents. *J Med Chem* 2006; 49(1):246-255.
33. Herkenhoff S, Szinicz L, Rastogi VK, Cheng TC, DeFrank JJ, Worek F. Effect of organophosphorus hydrolysing enzymes on obidoxime-induced reactivation of organophosphate-inhibited human acetylcholinesterase. *Arch Toxicol* 2004; 78(6):338-343.
34. Yang YC, Szafraniec LJ, Beaudry WT, Rohrbaugh DK. Oxidative Detoxification of Phosphonothiolates. *J Am Chem Soc* 1990; 112:6621-6627.
35. Benschop HP, de Jong LPA. Toxicokinetics of nerve agents. In: Somani SM, Romano JA, editors. *Chemical warfare agents: toxicity at low levels*. Boca Raton: CRC Press; 2001. p. 25-81.
36. Miki A, Katagi M, Tsuchihashi H, Yamashita M. Determination of alkylmethylphosphonic acids, the main metabolites of organophosphorus nerve agents, in biofluids by gas chromatography-mass spectrometry and liquid-liquid-solid-phase-transfer-catalyzed pentafluorobenzoylation. *J Anal Toxicol* 1999; 23(2):86-93.
37. Tsuchihashi H, Katagi M, Nishikawa M, Tatsuno M. Identification of metabolites of nerve agent VX in serum collected from a victim. *J Anal Toxicol* 1998; 22(5):383-388.
38. Papouskova B, Bednar P, Bartak P, Frycak P, Sevcik J, Stransky Z et al. Utilisation of separation methods in the analysis of chemical warfare agents. *J Sep Sci* 2006; 29(11):1531-1538.
39. D'Agostino PA, Hancock JR, Provost LR. Analysis of O-ethyl S-[2-(diisopropylamino)ethyl] methylphosphonothiolate (VX) and its degradation products by packed capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1999; 837:93-105.

40. D'Agostino PA, Chenier CL, Hancock JR. Electrospray mass spectrometry of chemical warfare agents, degradation products and related compounds. DREA TR2002-028, 1-91. 2002.
Ref Type: Report
41. D'Agostino PA, Hancock JR, Provost LR. Packed capillary LC-ESI-MS analysis of O-ethyl S-[2-(diisopropylamino)ethyl]methylphosphonothiolate (VX). DRES SR 706, 1-36. 1999.
42. D'Agostino PA, Hancock JR, Provost LR. Packed capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry analysis of organophosphorus chemical warfare agents. *J Chromatogr A* 1999; 840(2):289-294.
43. Ellis-Steinborner S, Ramachandran A, Blanksby SJ. The fragmentation pathways of protonated Amiton in the gas phase: towards the structural characterisation of organophosphorus chemical warfare agents by electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006; 20(12):1939-1948.
44. Hooijschuur EWJ, Kientz CE, Brinkman UAT. Analytical separation techniques for the determination of chemical warfare agents. *J Chromatogr A* 2002; 982:177-200.
45. Riches J, Morton I, Read RW, Black RM. The trace analysis of alkyl alkylphosphonic acids in urine using gas chromatography-ion trap negative ion tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2005; 816:251-258.
46. Mercier JP, Morin P, Dreux M, Tambute A. Liquid chromatography analysis of phosphonic acids on porous graphitic carbon stationary phase with evaporative light-scattering and mass spectrometry detection. *J Chromatogr A* 1999; 849(1):197-207.
47. Melanson JE, Boulet CA, Lucy CA. Indirect laser-induced fluorescence detection for capillary electrophoresis using a violet diode laser. *Anal Chem* 2001; 73(8):1809-1813.
48. Heleg-Shabtai V, Gratziany N, Liron Z. Separation and detection of VX and its methylphosphonic acid degradation products on a microchip using indirect laser-induced fluorescence. *Electrophoresis* 2006; 27(10):1996-2001.
49. Wang J, Pumera M, Collins GE, Mulchandani A. Measurements of chemical warfare agent degradation products using an electrophoresis microchip with contactless conductivity detector. *Anal Chem* 2002; 74(23):6121-6125.
50. Wang J, Pumera M, Chatrathi MP, Escarpa A, Musameh M, Collins G et al. Single-channel microchip for fast screening and detailed identification of nitroaromatic explosives or organophosphate nerve agents. *Anal Chem* 2002; 74(5):1187-1191.
51. Hadd AG, Raymond DE, Halliwell JW, Jacobson SC, Ramsey JM. Microchip device for performing enzyme assays. *Anal Chem* 1997; 69(17):3407-3412.
52. Nassar AE, Lucas SV, Myler CA, Jones WR, Campisano M, Hoffland LD. Quantitative analysis of chemical warfare agent degradation products in reaction masses using capillary electrophoresis. *Anal Chem* 1998; 70(17):3598-3604.

53. Koskela H, Grigoriu N, Vanninen P. Screening and identification of organophosphorus compounds related to the chemical weapons convention with 1D and 2D NMR spectroscopy. *Anal Chem* 2006; 78(11):3715-3722.
54. Gehauf B, Epstein J, Wilson GB, Witten B, Sass S, Bauer VE et al. Reaction for Colorimetric Estimation of Some Phosphorus Compounds. *Anal Chem* 1957; 29(2):278-281.
55. Sass S, Ludemann WD, Witten B, Fischer V, Sisti AJ, Miller JI. Colorimetric Determination of Certain Organophosphorus Compounds and Acylating Agents. *Anal Chem* 1957; 29(9):1346-1349.
56. Marsh DJ, Neale E. A Colorimetric Method for the Detection And Determination of Certain Acid Halide and Acid Anhydride Compounds. *Chemistry and Industry* 1956; 9:494-495.
57. Poziomek EJ, Crabtree EV, Kramer D. A Multicyclic Catalytic Scheme for the Vapor Detection of Organophosphorus Compounds. *Microchemical Journal* 1969; 14:150-154.
58. Saville B. A New Approach to the Determination of Microgram Quantities of Phosphorylating or Acylating Agents. *J* 1957; 82:269-274.
59. Aktories K, Förstermann U, Hofmann B, Starke K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 9 ed. München: Urban & Fischer; 2005.
60. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H, Schäfer-Korting M. *Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 8 ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2001.
61. Maxwell DM, Lenz DE. Structure-activity relationships and anticholinesterase activity. In: Ballantyne B, Marrs TC, editors. *Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates*. Oxford: Butterworth & Heinemann; 1992. p. 47-58.
62. Roth H, Eger K, Troschütz R. *Arzneistoffanalyse*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1997.
63. Ellman GL, Courtney KD, Anders V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7:88-95.
64. Worek F, Mast U, Kiderlen D, Diepold C, Eyer P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin Chim Acta* 1999; 288:73-90.
65. Worek F, Thiermann H, Szinicz L, Eyer P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem Pharmacol* 2004; 68(11):2237-2248.

66. Forsberg A, Puu G. Kinetics for the inhibition of acetylcholinesterase from the electric eel by some organophosphates and carbamates. *Eur J Biochem* 1984; 140:153-156.
67. Worek F, Reiter G, Eyer P, Szinicz L. Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates. *Arch Toxicol* 2002; 76(9):523-529.
68. Thiermann H, Szinicz L, Eyer P, Zilker T, Worek F. Correlation between red blood cell acetylcholinesterase activity and neuromuscular transmission in organophosphate poisoning. *Chem Biol Interact* 2005; 157, 158:345-347.
69. Sidell FR. Clinical effects of organophosphorus cholinesterase inhibitors. *J Appl Toxicol* 1994; 14(2):111-113.
70. Koelle GB. Pharmacology of organophosphates. *J Appl Toxicol* 1994; 14(2):105-109.
71. Millard CB, Kryger G, Ordentlich A, Greenblatt HM, Harel M, Raves ML et al. Crystal structures of aged phosphonylated acetylcholinesterase: nerve agent reaction products at the atomic level. *Biochem* 1999; 38(22):7032-7039.
72. Segall Y, Waysbort D, Barak D, Ariel N, Doctor BP, Grunwald J et al. Direct observation and elucidation of the structures of aged and nonaged phosphorylated cholinesterases by ³¹P NMR spectroscopy. *Biochem* 1993; 32(49):13441-13450.
73. Shafferman A, Ordentlich A, Barak D, Stein D, Ariel N, Velan B. Aging of phosphylated human acetylcholinesterase: Catalytic processes mediated by aromatic and polar residues of the active centre. *Biochem J* 1996; 318:833-840.
74. Shafferman A, Ordentlich A, Barak D, Stein D, Ariel N, Velan B. Aging of soman-acetylcholinesterase adducts: facts and models. *Biochem J* 1997; 324:996-998.
75. Sun MC, Chang Z, Shau M, Huang R, Chou T. The mechanism of ageing of phosphonylated acetylcholinesterase. *Eur J Biochem* 1979; 100:527-530.
76. Ashani Y, Cohen S. Nucleophilicity of some reactivators of phosphorylated acetylcholinesterase. *J Med Chem* 1971; 14:621-626.
77. Poziomek EJ, Hackley BE, Steinberg GM. Pyridinium aldoximes. *J Org Chem* 1958; 23:714-717.
78. Hobbiger F, Pitman M, Sadler PW. Reactivation of phosphorylated acetylcholinesterases by pyridinium aldoximes and related compounds. *Biochem J* 1960; 75:363-372.
79. Lüttringhaus A, Hagedorn I. Quartäre Hydroxyiminomethyl-pyridiniumsalze. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 1964; 14(1):1-5.
80. Engelhard N, Erdmann WD. Beziehungen zwischen chemischer Struktur und Cholinesterase reaktivierender Wirksamkeit bei einer Reihe neuer bis-quart.,rer Pyridin-4-aldoxime. *Drug Res* 1964; 14:870-875.

81. Van Havere W, Lenstra ATH, Geise H.J., Van den Berg GR, Benschop HJ. 1,1`-[Oxybis(methylene)]bis{4-[(hydroxyimino)methyl]pyridinium} Dichloride (Obidoxim Dichloride). *Acta Cryst* 1982; B38:1635-1637.
82. Luo C, Leader H, Radic Z, Maxwell DM, Taylor P, Doctor BP et al. Two possible orientations of the HI-6 molecule in the reactivation of organophosphate-inhibited acetylcholinesterase. *Biochem Pharmacol* 2003; 66:387-392.
83. Blum M. 2007. Unpublizierte Arbeit
84. Ginsburg S, Wilson I. Oximes of the pyridine series. *J Am Chem Soc* 1957; 79:481-485.
85. Eyer P, Hagedorn I, Klimmek R, Lippstreu P, Löffler M, Oldiges H et al. HLo 7 dimethanesulfonate, a potent bispyridinium-dioxime against anticholinesterases. *Arch Toxicol* 1992; 66(9):603-621.
86. LaMattina JL, Suleske RT. α -Amino acetals: 2,2-Diethoxy-2-(4-Pyridyl)ethylamine. *Organic Syntheses Ann Vol* 1986; 64:19-23.
87. Utey D. Determination of 2-Hydroxyiminomethyl-1-methyl-pyridinium methanesulphonate (pralidoxime mesylate, PS2) and its degradation products in solution by liquid chromatography. *J Chrom* 1983; 265:311-322.
88. Poziomek EJ, Kramer DN, Mosher WA, Michel HO. Configurational analysis of 4-formyl-1methylpyridinium iodide oximes and its relationship to a molecular complementarity theory on the reactivation of inhibited acetylcholinesterase. *J Am Chem Soc* 1961; 83:3916-3917.
89. Ellin RI, Wills JH. Oximes antagonistic to inhibitors of cholinesterase - Part I. *J Pharm Sci* 1964; 53:995-1007.
90. Carlström D. *Acta Chem Scand* 1966; 20:1240-1246.
91. Spöhrer U, Eyer P. Separation of geometrical syn and anti isomers of obidoxime by ion-pair high-performance liquid chromatography. *J Chrom A* 1995; 693:55-61.
92. Leitis L, Shimanskaya MV, Varlavans A. 1,1`-(oxydimethylene)bis[4-(hydroxyiminomethyl)pyridinium chloride]and their pharmacological activity. *Latvijas PSR Zinatnu Akademijas Vestis Kimijas Serija* 1969; 2:249-250.
93. Blümer B, Scheik D. *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*. Heidelberg: Springer Verlag; 1995.
94. Hagedorn I, Gündel WH. Betaine quatärer Salze von Pyridin-2- und -4-aldoxim. *Drug Res* 1976; 26:753-755.

95. Bernasconi R. Untersuchungen ueber die Stabilitaet von N,N-Dimethylenoxid-bis-(pyridinium-4-aldoxim)-dichlorid in waessriger Loesung. *Pharm Acta Helv* 1965; 40:564-574.
96. Ellin RI. Stability of Pyridine-2-aldoxime Methiodide. I. Mechanism of Breakdown in Aqueous Alkaline Solution. *J Am Chem Soc* 1958; 80_:6588-6590.
97. Pohjola J, Harpf M. Determination of atropine and obidoxime in automatic injection devices used as antidotes against nerve agent intoxication. *J Chromatogr* 1994; 686:350-354.
98. Grasshoff C, Thiermann H, Gillessen T, Zilker T, Szinicz L. Internal standard high-performance liquid chromatography method for the determination of obidoxime in urine of organophosphate-poisoned patients. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 753(2):203-208.
99. Houze P, Borron SW, Scherninski F, Bousquet B, Gourmel B, Baud F. Measurement of serum pralidoxime methylsulfate (Contrathion©) by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B* 2005; 814:149-154.
100. Kalasz H, Hasan MY, Sheen R, Kuca K, Petroianu G, Ludanyi K et al. HPLC analysis of K-48 concentration in plasma. *Anal Bioanal Chem* 2006; 385(6):1062-1067.
101. Tekes K, Hasan MY, Sheen R, Kuca K, Petroianu G, Ludanyi K et al. High-performance liquid chromatographic determination of the plasma concentration of K-27, a novel oxime-type cholinesterase reactivator. *J Chromatogr A* 2006; 1122(1-2):84-87.
102. Singh H, Moorad-Doctor D, Ratcliffe RH, Wachtel K, Castillo A, Garcia GE. A rapid cation-exchange HPLC method for detection and quantification of pyridinium oximes in plasma and tissue. *J Anal Toxicol* 2007; 31(2):69-74.
103. Houze P, Thabet H, Delfour A, Larrouy L, Le bT, Baud FJ. Quantification of pralidoxime methylsulfate (Contrathion) in human urine by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 826(1-2):63-68.
104. D'Agostino PA, Provost LR, Hancock JR, Boulet CA. Electrospray mass spectra of therapeutic oximes: HI-6, HS-6, obidoxime, 2-PAM, TMB-4 and HL"-7. *DRES SM* 1475, 1-32. 1995.
Ref Type: Report
105. D'Agostino PA, Provost LR, Hancock JR, Boulet CA. Electrospray mass spectrometric characterization of six therapeutic oximes: HI-6, HS-6, Obidoxime, 2-PAM, TMB-4 and HL"-7. *Rapid Commun Mass Spectr* 1996; 10_:805-810.
106. Kunkel GJ, Busch KL, Dunphy R, Burinsky DJ, Barak R, Bel P et al. Liquid secondary mass spectra and fast atom bombardment mass spectra of diquatery pyridinium oxime salts. *J Mass Spectr* 1995; 30_:282-289.

107. Hagedorn I, Gündel WH, Schoene K. Reaktivierung phosphorylierter Acetylcholin-Esterase mit Oximen: Beitrag zum Studium des Reaktionsablaufes. *Drug Res* 1969; 19:603-606.
108. Wang J, Gu J, Leszczynski J, Feliks M, Sokalski WA. Oxime-induced reactivation of sarin-inhibited AChE: a theoretical mechanisms study. *J Phys Chem B* 2007; 111(9):2404-2408.
109. Wilson I, Meislich EK. Reactivation of acetylcholinesterase inhibited by alkylphosphates. *J Am Chem Soc* 1953; 75_:4628-4629.
110. Wilson I, Ginsburg S, Meislich EK. The Reactivation of Acetylcholinesterase Inhibited by Tetraethyl Pyrophosphate and Diisopropyl Fluorophosphate. *J Am Chem Soc* 1955; 77_:4286-4291.
111. Hagedorn I, Stark I, Lorenz HP. Reaktivierung phosphorylierter Acetylcholinesterase - Abhängigkeit von der Aktivator-Acidität. *Angew Chem* 1972; 84:354-356.
112. Hackley BE, Steinberg GM, Lamb JC. Formation of potent inhibitors of AChE by reaction of pyridinaldoximes with isopropyl methylphosphonofluoridate (GB). *Arch Biochem Biophys* 1959; 80:211-214.
113. Experimental And Theoretical Studies of Phosphonylated Oximes Containing The Phosphorus Moieties of G- and V-type Nerve Agents. 2000.
114. Nenner M. Phosphonylierte Aldoxime Hemmwirkung auf Acetylcholinesterase und hydrolytischer Abbau. *Biochem Pharmacol* 1974; 23:1255-1262.
115. Kiderlen D. Über die Phosphoryloxime-Hydrolase des Plasmas, ein Enzym, das die Effizienz der Oximtherapie bei Organophosphat-Vergiftungen erheblich steigert [Ludwig-Maximilians-Universität München; 2004.
116. Leader H, Vincze A, Manisterski B, Rothschild N, Dosoretz C, Ashani Y. Characterization of O,O-diethylphosphoryl oximes as inhibitors of cholinesterases and substrates of phosphotriesterases. *Biochem Pharmacol* 1999; 58:503-515.
117. Lamb JC, Steinberg GM, Solomon S, Hackley BE. Reaction of 4-formyl-1-methylpyridinium iodide oxime with isopropyl methylphosphonofluoridate. *Biochem* 1965; 4:2475-2484.
118. Waser PG, Alioth-Streichenberg CM, Hopff WH, Portmann R, Hofmann W, Niederhauser A. Interaction of obidoxime with sarin in aqueous solution. *Arch Toxicol* 1992; 66:211-215.
119. Lamb JC, Steinberg GM, Hackley BE. Isopropyl methylphosphonylated bisquaternary oximes, powerful inhibitors of cholinesterase. *Biochim Biophys Acta* 1964; 89:174-176.

120. Schoene K. Phosphonyloxime aus Soman: Bildung und Reaktion mit Acetylcholinesterase in vitro. *Biochem Pharmacol* 1973; 22:2997-3003.
121. Portmann R, Niederhauser A, Hofmann W, Frey A. Synthesis of 4-
{[(isopropoxy)methylphosphoryloxy]imino}methyl}-1- methylpyridinium iodide and its characterisation. *Helv Chim Acta* 1991; 74:331-335.
122. Hackley BE, Owens OO. Preparation of O-(isopropylmethylphosphono)-4-formyl-1-methylpyridinium iodide oxime. *J Org Chem* 1959; 24:1120.
123. Becker G, Kawan A, Szinicz L. Direct reaction of oximes with sarin, soman, or tabun in vitro. *Arch Toxicol* 1997; 71(11):714-718.
124. John H, Schlegel W. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of the 11-hydroxythromboxane B2 anomers equilibrium. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; 698(1-2):9-15.
125. Sykes P. *Reaktionsmechanismen in der Organischen Chemie*. 9 ed. Weinheim: VCH; 1988.
126. Laidler KJ. *Reaktionskinetik I*. Mannheim: Bibliographisches Institut; 1986.
127. Mortimer C. *Chemie*. 5 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1986.
128. Steinberg G, Solomon S. Decomposition of a Phosphonylated Pyridinium Aldoxime in Aqueous Solution. *Biochem* 1966; 5(10):3142-3150.
129. de Jong LPA, Ceulen DI. Anticholinesterase activity and rate of decomposition of some phosphylated oximes. *Biochem Pharmacol* 1978; 27:857-863.
130. Harvey B, Scott RP, Sellers DJ, Watts P. In vitro studies on the reactivation by oximes of phosphylated acetylcholinesterase--I. On the reactions of P2S with various organophosphates and the properties of the resultant phosphylated oximes. *Biochem Pharmacol* 1986; 35(5):737-744.
131. Stenzel J, Worek F, Eyer P. Preparation and characterization of dialkylphosphoryl-obidoxime conjugates, potent anticholinesterase derivatives that are quickly hydrolyzed by human paraoxonase (PON1(192Q)). *Biochem Pharmacol* 2007; 74(9):1390-1400.
132. Becker C, Worek F, Szinicz L. Mono(Methyl-O-Ethylphosphonyl)Obidoxime as a potent inhibitor of human acetylcholinesterase. *Naunyn-Schmiedbergs Archives of Pharmakology* 2006; 372(Supplement 1):104.
133. Sharghi H, Sarvari M. Selective Syntheses of E and Z Isomers of Oximes. *Synlett* 2001; 1:99-101.
134. Zoltewicz A, Cross R. Substituent Effects on the Rates of Formation of Pyridinium Ylides. *J Chem Soc Perkin II* 1974;1363-1368.