

49. Dr. J. W. Le Heux:

Über die Haltbarkeit von Cholinlösungen in Ampullen.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Reichsuniversität Utrecht.)

Eingegangen am 17. Oktober 1924.

Bekanntlich stehen Cholinlösungen in dem Rufe, sehr zersetzlich zu sein und dabei unter Umständen giftiger zu werden.

Diese Eigenschaft spielte seinerzeit bei der Diskussion der Blutdruckwirkung des Cholins eine große Rolle und hat die Brauchbarkeit intravenöser Cholineinspritzungen bei Menschen stark beeinträchtigt.

Untersuchungen, welche in den letzten Jahren im hiesigen Institute ausgeführt wurden, zeigten, daß bei verschiedenen Formen experimenteller Magendarm lähmung sich mit intravenösen Cholin-Einspritzungen¹⁾ sehr gute therapeutische Erfolge erzielen lassen. Es kommt daher auch die ärztliche Anwendung bei Menschen in Frage. Erfordernis ist hierfür die Haltbarkeit von Lösungen in sterilisierten Ampullen.

A. Darstellung des Cholins.

Athylen-Chlorhydrin von Kahlbaum wird einen Tag lang mit geblühter Pottasche von Salzsäure befreit und getrocknet. Die Flüssigkeit wird darauf vorsichtig abgegossen und in einem Fraktionierkölbchen nach Ladenburg langsam fraktioniert. Die Hauptfraktion, welche von 127—128° übergeht, wird für die Darstellung benutzt. Für jede neue Darstellung wird dieses Reinigungsverfahren wiederholt.

Als Trimethylaminpräparat wird benutzt die 33%ige Lösung in absolutem Alkohol von Kahlbaum, welche durch Zusatz von absolutem Alkohol auf einen Gehalt von etwa 25% gebracht wird.

Die mit Eis-Kochsalzmischung abgekühlte Trimethylaminlösung wird mit dem ebenfalls gekühlten Chlorhydrin gemischt, in einem Verhältnis, daß auf ein Gewichtsteil Trimethylamin zwei Gewichtsteile Chlorhydrin kommen, und dieses kalte Gemisch in Glasröhren eingefüllt, welche darauf zugeschmolzen und 24 Std. lang im kochenden Wasserbade erhitzt werden. Nach dem Abkühlen setzen sich dann gewöhnlich schöne Kristalle von Cholin-HCl ab.

Der Inhalt der Röhren, welche beim Öffnen keinen hohen Druck haben, wird in ein Rundbodenkölbchen gegossen, und der Alkohol auf dem Wasserbade von etwa 45° unter vermindertem Druck abgedampft. Der größtenteils kristallinische Rückstand wird mehrmals mit absolutem Äther gewaschen, wobei der Äther jedesmal nach dem Absetzen abgegossen wird. Die letzten Reste Äther werden im Vakuum entfernt.

Darauf wird die Kristallmasse mit einer reichlichen Menge trockenen Chloroforms am Rückflußkühler gekocht, wobei das eventl. ge-

¹⁾ M. v. Kühlewein, Pflügers Archiv **191**, 99 (1921). — K. Arai, Pflügers Archiv **193**, 359 (1922).

bildete salzsaure Trimethylamin in Lösung geht, das salzsaure Cholin jedoch nicht.

Die noch warme Masse wird darauf auf einem Saugtrichter filtriert und abgesogen, mit etwas warmem Chloroform gewaschen und darauf in einen Vakuumexsiccator über Schwefelsäure gebracht, welcher darauf wiederholt zur Entfernung des Chloroforms leerpumpiert wird. Die schön weißen Kristalle werden darauf in wenig warmem absoluten Alkohol gelöst und filtriert, worauf sich beim Abkühlen das Cholin-HCl in feinen Kristallnadeln abscheidet. Die Kristalle werden noch einmal mit absolutem Alkohol umkristallisiert und danach im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure bewahrt.

Aus den vereinigten alkoholischen Mutterlaugen läßt sich durch Zusatz von etwas trockenem Äther noch eine beträchtliche Menge Cholin-HCl abscheiden, welches ebenfalls durch Umkristallisieren in absolutem Alkohol gereinigt wird.

Die Kristalle sind bekanntlich sehr hygroskopisch.

Durch Titration einer wässrigen Lösung von Cholin-HCl mit $n/20$ AgNO₃ und Kaliumchromat als Indikator ließen sich in zwei Fällen für den Chlorgehalt Werte von 25.26% und 25.23% bestimmen (ber. 25.40%).

Mit Nessler's Reagens entsteht in einer wässrigen Lösung von Cholin-HCl ein hellgelber Niederschlag.

Werden einige Kristalle mit starker Natronlauge übergossen, so darf kein Geruch nach Trimethylamin entstehen.

B. Haltbarkeit der Cholinlösungen.

Am 15. Dezember 1920 wurden 2.504 g synthetisches Cholin-HCl in 50 ccm frisch in Glasgefäßen destillierten Wassers gelöst (1 ccm = 50 mg = 5%). Diese Lösung wurde im hiesigen Pharmazeutischen Institut durch Herrn Sliis in Ampullen von 1.3 ccm Inhalt gefüllt. Diese Ampullen, welche teils aus braunem Jenaglas (Violax-Glas), teils aus gewöhnlichem, Alkali abgebendem farblosen Glas bestanden, waren vorher mit Säure ausgekocht und danach mit Wasser ausgespült.

Ein Teil der Cholinlösung war mit $n/10$ HCl auf einen Säuregehalt von $n/1000$ HCl gebracht; der Rest der Lösung wurde ohne Zusatz in die Ampullen gefüllt, welche zugeschmolzen und darauf 2 Std. lang im kochenden Wasserbade erhitzt wurden.

Der am 16. Dezember 1920 empfangene Vorrat bestand aus:

- A. 4 Ampullen Jenaglas, $n/1000$ HCl.
- B. 4 Ampullen gewöhnliches Glas, $n/1000$ HCl.
- C. 17 Ampullen Jenaglas, Wasser.
- D. 6 Ampullen gewöhnliches Glas, Wasser.

Zwei Tage später, am 18. Dezember 1920, wurde der Inhalt einer Ampulle, Jenaglas, $n/1000$ HCl(A), in seiner Wirkung auf den überlebenden Kaninchendünndarm in Tyrodelösung verglichen mit einer frischen Lösung des ursprünglichen Cholinpräparates in $n/1000$ HCl.

Die Grenzdosis war bei beiden Lösungen 0.1 mg.

0.2 mg aus der Ampulle wirkten einmal etwas stärker, einmal etwas schwächer als 0.2 mg Cholin in frischer Lösung, 0.5 g beider Lösungen wirkten an einer anderen Darmschlinge gleich stark.

Die Cholinlösung war also durch das Sterilisieren nicht verändert.

Die Ampullen wurden darauf ein halbes Jahr bei Zimmertemperatur im Dunkeln bewahrt.

1. Prüfung nach einem halben Jahre.

Am 28. Juni 1921 wurde von jeder der vier Serien (A—D) eine Ampulle geöffnet und außerdem eine frische 5%ige Lösung (E) von demselben Präparate Cholin-HCl bereitet, mit der seinerzeit die Ampullen gefüllt waren, das während der sechs Monate im Vakuum-exsiccator über Schwefelsäure bewahrt und vollständig trocken und unzersetzt geblieben war. Von den Lösungen A—E wurden für die Darmversuche zwanzigfache Verdünnungen hergestellt.

Zur Identifizierung des wirksamen Bestandteils der Lösungen, in Form des am Darne sehr viel stärker wirksamen Acetylcholins, wurden 0.3 ccm von A—E (5%) in einem Reagensglas mit einigen Körnchen Quarzsand abgedampft, mit ungefähr 1 ccm Acetylchlorid eingeschmolzen und 1 Std. im Wasserbade auf 100° erhitzt.

Die Röhrrchen wurden nach dem Abkühlen geöffnet, der Inhalt in ein Porzellanschälchen gegossen, die Röhrrchen mit wenig Acetylchlorid nachgespült, und die Lösung abgedampft. Der Rückstand wurde in 15 ccm Wasser gelöst, so daß diese Lösung in 1 ccm 1 mg des ursprünglichen Cholins enthielt. Aus diesen Stammlösungen wurden dann die nötigen Verdünnungen hergestellt.

Die Wirksamkeit wurde am gleichen Tage am isolierten Kaninchendünndarme bestimmt. Am folgenden Tage wurde nochmals je eine Ampulle jeder Serie geöffnet und derselbe Versuch wiederholt.

Das Ergebnis war: Bei der Untersuchung der nicht, acetylierten Cholinlösungen an sieben verschiedenen Darmschlingen von zwei verschiedenen Kaninchen wirkten die Lösungen A, B und C gerade so stark wie die frisch bereitete Lösung E, wobei an den verschiedenen Darmschlingen die Reihenfolge der Prüfungen von A, B, C, D wechselte und außerdem am Schluß jeder Versuchsreihe die unveränderte Erregbarkeit des Präparates gegen E festgestellt wurde.

Von den zwei Ampullen der Serie D (gewöhnliches Glas ohne Säure) wirkte der Inhalt der einen an drei Schlingen ebenso stark, an einer Schlinge schwächer als E; der Inhalt der anderen Ampulle an den beiden geprüften Darmschlingen sehr deutlich schwächer als E.

Durch das Acetylieren war eine Wirkungssteigerung um ungefähr das 500fache eingetreten. Auch hierbei stellte sich heraus, daß A, B und C ebenso stark wirkten wie E, während D an drei Darmschlingen gerade so stark, an zwei Darmschlingen deutlich schwächer, und an einer Darmschlinge sehr viel schwächer wirkte als E. Auch in dieser Versuchsreihe wurde am Ende jedesmal mit der acetylierten Kontrollösung E die unveränderte Erregbarkeit des Präparates festgestellt.

Der physiologische Versuch ergibt also nach einem halben Jahre bei A, B und C unveränderte Wirksamkeit, während in gewöhnlichem Glas

ohne Säurezusatz in der einen Ampulle die Wirksamkeit etwas und in der anderen deutlich zurückgegangen war.

In keiner der Ampullen war ein Geruch nach Trimethylamin vorhanden.

Die Reaktion gegen Lackmus war in allen Lösungen neutral.

Mit Nessler's Reagens trat in allen fünf Lösungen der gleiche gelbe Niederschlag ohne Braunfärbung auf; es war also keine nachweisbare Menge von Aminen vorhanden.

Bei der Prüfung mit Methylrot und Neutralrot wurde, zum Vergleich mit A und B, die Kontrolllösung auf einen Gehalt von $n/1000$ HCl gebracht. Die Lösungen A—D waren im Vergleich mit E bei Methylrot alle etwas nach der alkalischen Seite verschoben, A am wenigsten.

Bei Verwendung von Neutralrot war diese Verschiebung weniger deutlich zu sehen, alle Lösungen waren rosa. Die Farbe von A stimmte aber am meisten mit der frischen Kontrolle überein.

Bemerkt muß werden, daß bei diesen Vergleichsprüfungen diejenige Ampulle D verwendet wurde, deren Wirksamkeit am Kaninchendünndarme am wenigsten vermindert war.

Es ergibt sich bei der chemischen Prüfung, daß alle vier Lösungen kaum verändert sind, und daß die Reaktion von A sich am wenigsten verändert hat.

2. Prüfung nach einem Jahre.

Am 11. Dezember 1921 wurde je eine Ampulle der Serien A—D geöffnet. In keiner derselben war ein Geruch nach Trimethylamin wahrzunehmen.

Es wurde darauf, genau wie im Juni 1921, ein Teil acetyliert; der andere Teil direkt nach der oben angegebenen Methode auf seine Wirksamkeit am Kaninchendünndarme untersucht.

Als Vergleichslösung diente wieder eine frisch bereitete Lösung (E) von reinem Cholin-HCl.

Die Prüfung wurde an vier Dünndarmschlingen desselben Kaninchens ausgeführt.

Bei der Prüfung der nicht acetylierten Lösungen wurden Mengen zugesetzt, welche 0.2—0.4 mg des ursprünglichen Cholin-HCl entsprachen. Hierbei wirkte A (Jenaglas, $n/1000$ HCl) stets ebenso stark wie das ursprüngliche Cholin; B (gewöhnliches Glas, $n/1000$ HCl) zweimal gleich, einmal schwächer; C (Jenaglas, Wasser) zweimal gleich; D (gewöhnliches Glas, Wasser) einmal schwach, einmal sehr schwach, einmal stärker.

Durch Acetylieren war eine Wirkungssteigerung um mehr als 2000mal eingetreten.

Zur Prüfung wurden Dosen von $1/10000$ bis $2/10000$ verwendet.

A wirkte dreimal ebenso stark wie Cholin-HCl; B zweimal schwächer; C einmal gleich, einmal schwächer; D einmal gleich, zweimal deutlich schwächer.

Hieraus ergibt sich, daß nach einem Jahre nur die Lösung A in allen Fällen ebenso stark wirkte wie frische Cholinlösung. Danach kommt C, während B in drei unter fünf Fällen sich als abgeschwächt erwies, und D die schwächste Wirkung zeigte.

Das Verhalten der Lösungen gegen Indikatoren war folgendes:

A gab sowohl mit Neutralrot wie mit Methylrot genau die gleiche Farbe wie eine frische Lösung von Cholin-HCl in $n/1000$ HCl.

C gab mit Neutralrot nahezu dieselbe Farbe, mit Methylrot eine etwas mehr gelbliche Färbung als frische Cholinlösung.

B erwies sich mit Neutralrot etwas, mit Methylrot deutlich alkalischer als die salzsaure Vergleichslösung von Cholin-HCl; während

D sowohl mit Neutralrot wie mit Methylrot sich als deutlich alkalischer erwies.

Die oben gefundene Reihenfolge der physiologischen Wirksamkeiten entspricht also genau dem Verhalten gegen die Indikatoren, so daß die Ursache für die deutliche Abnahme der Wirkungstärke bei D und die geringere bei B und C dem Einfluß des Glases zugeschrieben werden muß.

Einige Tropfen Nessler's Reagens gaben mit einem Tropfen der Lösungen A, C und E einen hellgelben Niederschlag, während bei Verwendung von B und D der Niederschlag etwas dunkler, jedoch sicher nicht braun gefärbt war.

Wurde etwas von den Lösungen A—D mit starker Lauge erwärmt, so trat in keinem Falle der Geruch nach Trimethylamin auf.

Alle diese Beobachtungen zeigen, daß die $n/1000$ HCl-Lösung von Cholin-HCl in Ampullen von braunem Jenaglas (Violaxglas) sich vollständig unverändert erhalten hat; daß die wässrige Lösung in Jenaglas wenig, die saure Lösung in gewöhnlichem Glas etwas, und die wässrige Lösung in gewöhnlichem Glas deutlich verändert wurde.

Es mußte nun noch im Versuch an intakten Tiere festgestellt werden, ob die Lösung A nach einem Jahre unveränderte Cholinwirksamkeit besitzt und keine neuen toxischen Eigenschaften dazu bekommen hat.

Nach den Versuchen von Arai²⁾ ruft intravenöse Einspritzung in etwa 90 Sekunden (in die Vena saphena) von 30 mg Cholin-HCl pro Kilogramm reversiblen Atemstillstand hervor.

Nach den untenstehenden Versuchen tritt dieses bei Einspritzung in die Vena jugularis bereits nach 25 mg pro Kilogramm ein.

A. Katze, 2,8 kg, Äthernarkose, Einbinden einer Venenkanüle in die Jugularis.

^{4h36} (d. i. 10 Min. nach Schluß der Äthernarkose) Injektion von 25 mg pro Kilogramm frisch bereiteter Lösung von Cholin-HCl (5%) in 90 Sek. in die Jugularis. Danach Speichelsekretion, Pulsverlangsamung, krampfartige Atmung und Atemstillstand von $3\frac{1}{2}$ Min. Dauer, welcher durch künstliche Atmung behoben wird.

3 Min. später richtet sich das Tier auf und läuft nach weiteren 2 Min. fort.

B. Katze 1,55 kg, Äthernarkose, Einbinden einer Venenkanüle in die Jugularis.

^{3h53} (d. i. 10 Min. nach Schluß der Äthernarkose) Injektion von 25 mg pro Kilogramm 5% ige Cholin-HCl-Lösung aus Ampulle A in 90 Sek. in die Jugularis. Danach Speichelsekretion, Harnentleerung, Pulsverlangsamung, krampfartige Atmung und Atemstillstand von $3\frac{1}{2}$ Min. Dauer, welcher durch künstliche Atmung behoben wird.

²⁾ K. Arai, Pflügers Archiv 193, 359 (1922).

6 Min. später richtet das Tier sich auf und läuft nach einer weiteren Minute fort.

Diese beiden Protokolle zeigen, daß die Lösung A nach einjährigem Bewahren nach intravenöser Einspritzung bei der Katze qualitativ und quantitativ genau so wirkt, wie eine frisch bereitete Cholinlösung.

Auf Grund des chemischen Verhaltens, der Wertbestimmung am isolierten Dünndarme und der intravenösen Einspritzung läßt sich also sagen, daß Lösungen von Cholinchlorid mit einem Gehalt von $n/1000$ HCl sich in Ampullen von braunem Jenaglas (Violax-Glas) sterilisiert ein Jahr lang unverändert halten.

Nachschrift Oktober 1924.

Bei Untersuchung der Ampullen C (Jenaglas ohne Salzsäure) nach mehr als drei Jahren ergab sich, daß sich die Reaktion gegenüber Methylrot kaum, gegenüber Neutralrot nicht geändert hat. Wie in den aus reinem Cholin-HCl hergestellten Kontrollösungen trat auch hier mit Nessler's Reagens ein hellgelber Niederschlag auf; mit Lauge versetzt, war kein Geruch nach Trimethylamin wahrzunehmen.

Auch die Wirkung am Dünndarm war von gleicher Stärke, wie die einer aus reinem Cholin-HCl hergestellten Kontrollösung.

Nach mehr als drei Jahren hatte sich also die in den Ampullen aus Jena-Glas eingeschmolzene Cholinlösung kaum merkbar verändert.

Neuerdings haben wir von der Firma E. M e r c k nach den obigen Angaben hergestellte Lösungen von Cholin-HCl in Ampullen, sowie Cholin-HCl in Substanz erhalten, welche bei der Prüfung nach den in dieser Arbeit angegebenen Methoden unseren strengen Anforderungen entsprachen.

50. D. H. Wester (den Haag, Holland):

Untersuchung über die Brauchbarkeit einiger Metalle, des Emails und des Porzellans bei der Darstellung pharmazeutischer Präparate.

Eingegangen am 10. Oktober 1924.

Veranlassung zu folgender kleinen Untersuchung war die wiederholte Wahrnehmung, daß bei der Darstellung von Extractum Cascara in meiner Apotheke die rotkupfernen Pfannen sichtlich mehr angegriffen werden, als jene aus Messing. Übrigens habe ich schon seit Jahren die Erfahrung gemacht, daß unsere kupfernen Apparate, auch wenn sie verzinnt oder gar schwer vernickelt sind, durch gewisse Präparate angegriffen werden.

Zweck der Untersuchung war, die Einwirkung gewisser Stoffe auf Metalle (Legierungen) quantitativ festzustellen.

Es wurde folgende Arbeitsweise angewendet: Aus prima, 1 bis $1\frac{1}{2}$ mm dickem, Material habe ich Plättchen von 7×5 cm angefertigt. In diese Plättchen, deren Oberfläche also etwa 70 qcm