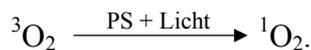


4 ERGEBNISSE

4.1 Spezifität des Meßsystems und Schwankungsbreite von Tag zu Tag

Singulett-Sauerstoff wird durch Anregung des gelösten $^3\text{O}_2$ durch Lichtenergie generiert:



Der Singulett-Sauerstoff bildet mit TEMP sofort das Oxidationsprodukt *TEMPO*:



Dieses sehr langlebige Radikal führt zu einem eindeutigen Spektrenbild, dessen Amplitude proportional der erzeugten *TEMPO*-Konzentration, und damit des gebildeten Singulett-Sauerstoffs ist (Abbildung 36).

Zum Ausschluß von Temperatureffekten wurden alle Messungen erst nach einer Vorwärmzeit des Systems von einer Stunde durchgeführt. Bei allen Untersuchungen wurde außerdem die Laserleistung konstant bei 1W gehalten, damit die Zufuhr von Wärme durch die Bestrahlung nicht variierte.

Auch der Einfluß von der Orientierung und Lage der Küvette innerhalb des Resonators auf die Güte der Einkopplung zwischen Reaktionslösung und Mikrowellen wurde berücksichtigt.

Während die Einflüsse der Laserleistung, der Wellenlänge und des Sauerstoffpartialdrucks in früheren Studien geprüft werden konnten⁹⁹, wurde innerhalb dieser Untersuchung der Einfluß der *TEMP*-Konzentration und der Photosensibilisatorkonzentration auf die Generierung des *TEMPO*-Signals analysiert.

Die Meßküvette wurde fest in das ESR-Spektrometer eingebaut. Die Führung der Laserfaser durch einen Schlauch ermöglichte sowohl den problemlosen Austausch der Lösungen als auch die Spülung des Systems, ohne daß die Lage und Orientierung der Flachzelle innerhalb des Resonators verändert werden mußte.

Die mit dieser Anordnung erreichte Gesamtstabilität wurde täglich anhand von Messungen mit einer 100 μM -*TEMPO*-Lösung kontrolliert. Diese Messungen wurden immer vor Beginn der Versuchsreihen durchgeführt. Zur Anschauung ist die Streuung von zehn solchen Meßwerten an zehn Meßtagen in Abb. 37 und Tabelle 4 dargestellt.

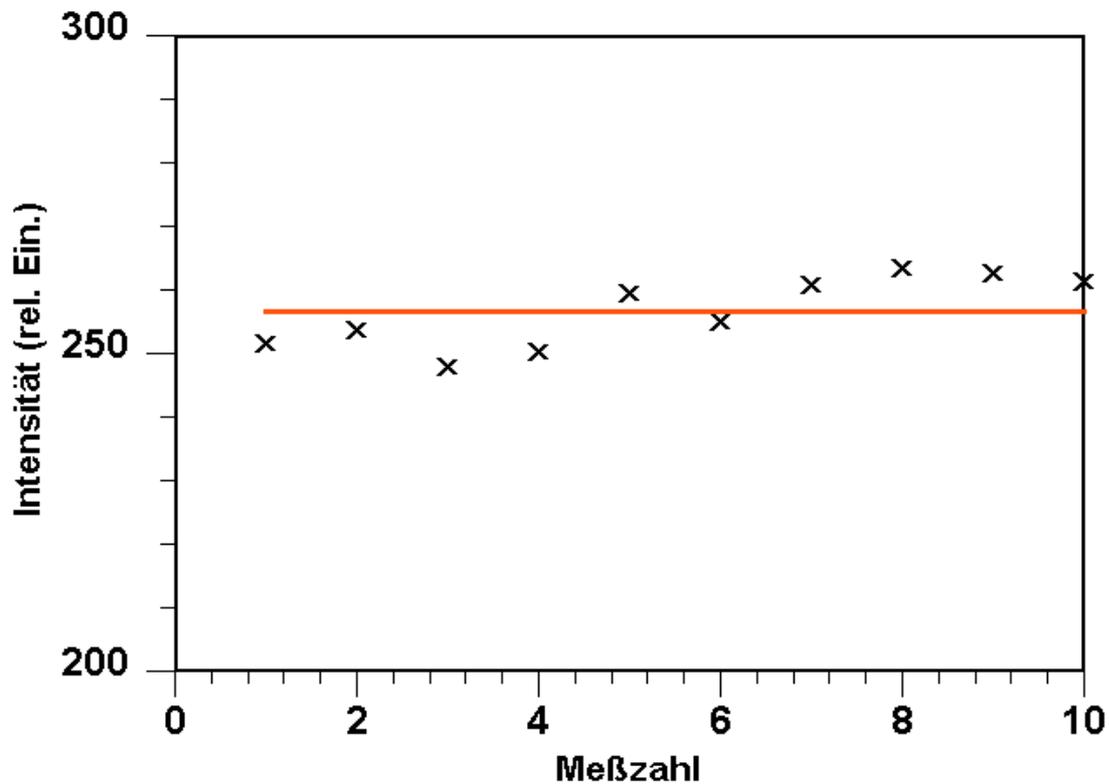


Abb. 37 Streuung mit fixierter Halterung der Flachzellküvette im Spektrometer

Messung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Intensität	251,9	253,7	248,0	250,2	259,6	255,1	260,7	263,5	262,7	261,4

Tabelle 4 Versuchsreihe zur Ermittlung der Konstanz der Meßwerte

Die Standardabweichung dieser Reihe betrug bei insgesamt 10 Messungen an 10 verschiedenen Tagen $\pm 5,6$ (entsprechend $\pm 2,2$ % des Mittelwertes). Die geringe Schwankungsbreite ist ein wesentliche Voraussetzung für die Gültigkeit der Ergebnisse der nachfolgenden Untersuchungen zum Vergleich der Aktivität der unterschiedlichen Photosensibilisatoren.

4.2 Einfluß der TEMP-Konzentration auf die Bildung des $^1\text{O}_2$ -TEMP-Produktes TEMPO

Ziel dieser Untersuchung war es, eine hohe Sensitivität des Systems bezüglich der $^1\text{O}_2$ -Generierung zu erzielen. Diese Sensitivität wird unter anderem von der TEMP-Konzentration beeinflusst.

Deshalb wurden Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen von TEMP bei einer konstanten Photosensibilisatorkonzentration bestrahlt. Die Bestrahlung verlief in einem vollständig verspiegelten und verschlossenen 20 ml-Glasbehälter, also in einem geschlossenen System außerhalb des Spektrometers. Nach Erreichen einer Lichtenergiedosis von 100 J wurden die Lösungen in die leere Meßküvette gefüllt. Im Verlauf dieser Versuche wurde deutlich, daß eine zu geringe Konzentration von TEMP mit erheblichen Schwankungen der Ergebnisse verbunden war. Dagegen führte eine zu große zu einer schnellen Signalsättigung, und demnach zu einer geringen Trennschärfe bezüglich der Unterschiede einzelner Photosensibilisatorkonzentrationen.

In Abbildung 38 sind die Ergebnisse dargestellt, die mit Photosan 3[®] bei einer Konzentration von 3 µg/ml erzielt wurden. Die Kurve zeigt einen konzentrationsabhängigen Anstieg der TEMPO-Bildung im Konzentrationsbereich zwischen 20 bis 100 mM TEMP. Ab 100 mM TEMP ist keine weitere Neubildung von TEMPO durch Erhöhung der TEMP-Konzentration zu erreichen. Zwischen 40 bis 80 mM TEMP stellt sich eine lineare Zunahme der TEMPO-Bildung in Abhängigkeit von der TEMP-Konzentration dar. Aufgrund dieser Daten erwies es sich als zweckmäßig, Reaktionslösungen mit 10 µl/ml des flüssigen TEMPs für alle weiteren Untersuchungen vorzubereiten. Dies entspricht also einer im anvisierten Bereich liegenden Konzentration von 59 mM.

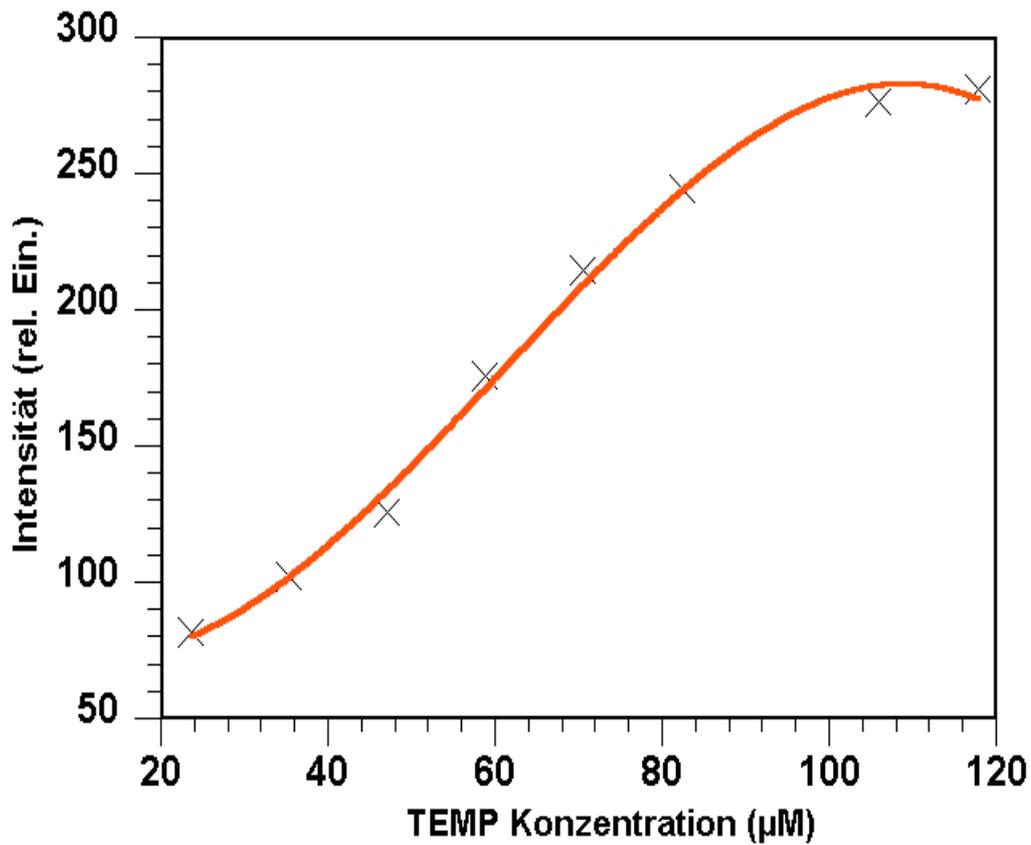


Abb. 38 Bildung von TEMPO in Abhängigkeit von der Konzentration von TEMP

Photosan 3[®] (3µg/ml), KTP Leistung 1W, eingestrahlte Energie = 100 J

[TEMP] µl/ml (mM)	4 (24)	6 (35)	8 (47)	10 (59)	12 (71)	14 (83)	18 (106)	20 (118)
Intensität	81,8	102,2	125,6	175,7	214,6	243,8	276,2	280,8

Tabelle 5 Versuchsreihe zur optimalen Konzentration von TEMP

4.3 Einfluß der Photosensibilisator-Konzentration auf die Bildung des $^1\text{O}_2$ -TEMP-Produktes TEMPO

Eine weitere Variable, die bei der Generierung von Singulett-Sauerstoff eine Rolle spielt, ist die Konzentration des Photosensibilisators. Daher wurde die Generierung von TEMPO in Abhängigkeit von der Photosensibilisatorkonzentration im Bereich von 1 bis 3 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Photosan 3[®] und Photofrin II[®] bei konstanter TEMP-Konzentration (59 mM) durchgeführt.

Die Kurven der Abbildungen 39 - 42 zeigen, daß die TEMPO-Bildung mit zunehmender eingestrahelter Gesamtenergie ansteigt. Maximale Intensitäten für Photosan 3[®] (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. Photofrin II[®] (2 - 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden schon bei einer Gesamtenergie von 200 - 300 J erreicht. Bei einer Photosensibilisatorkonzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zeigte sich ein nahezu linearer Anstieg bis zu einer Gesamtenergie von 500 J (Abb. 39 und 41). Vergleicht man die Intensitätszunahmen bei verschiedenen Gesamtenergien, zeigt sich nur für 100 J ein linearer Anstieg der Intensität in Abhängigkeit von der Photosensibilisatorkonzentration (Abb. 40 und 42).

Innerhalb dieses Meßsystems wiesen die Ergebnisse aus diesem Teil der Untersuchungen auf die Zweckmäßigkeit der Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für die zwei Porphyrinderivate hin. Dementsprechend wurden die folgenden detaillierteren Untersuchungen einheitlich bei dieser Konzentration durchgeführt.

Zu bemerken ist, daß das Nullsignal auf eine herstellungsbedingte Verunreinigung des TEMP mit TEMPO hinweist, die wegen der hohen Empfindlichkeit des Spektrometers detektiert wird. Für alle nachfolgenden Berechnungen wurden die Ergebnisse um diesen Nullwert korrigiert.

Photosan 3[®] und TEMP

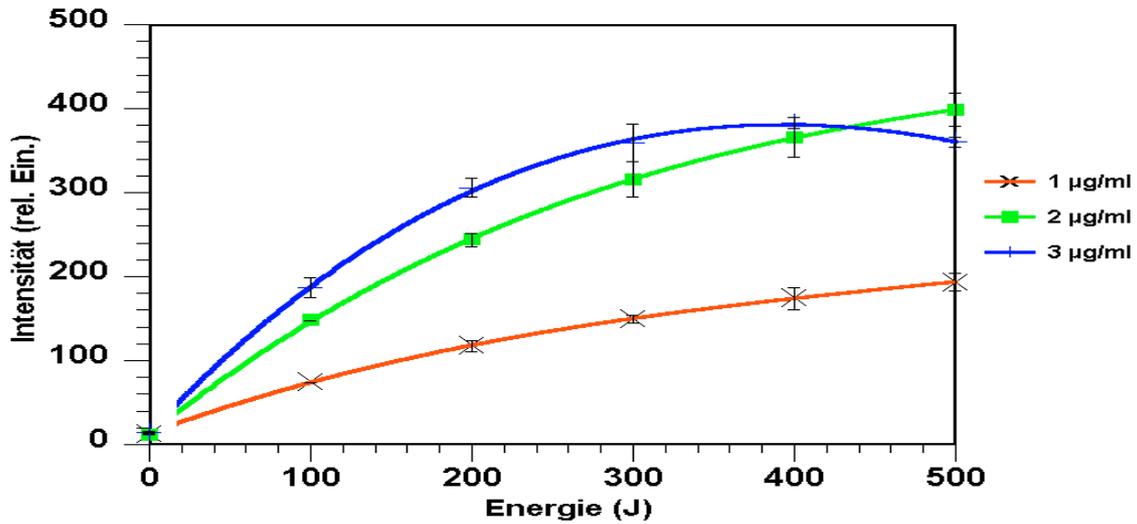


Abb. 39 TEMPO-Signal als Funktion der Energie

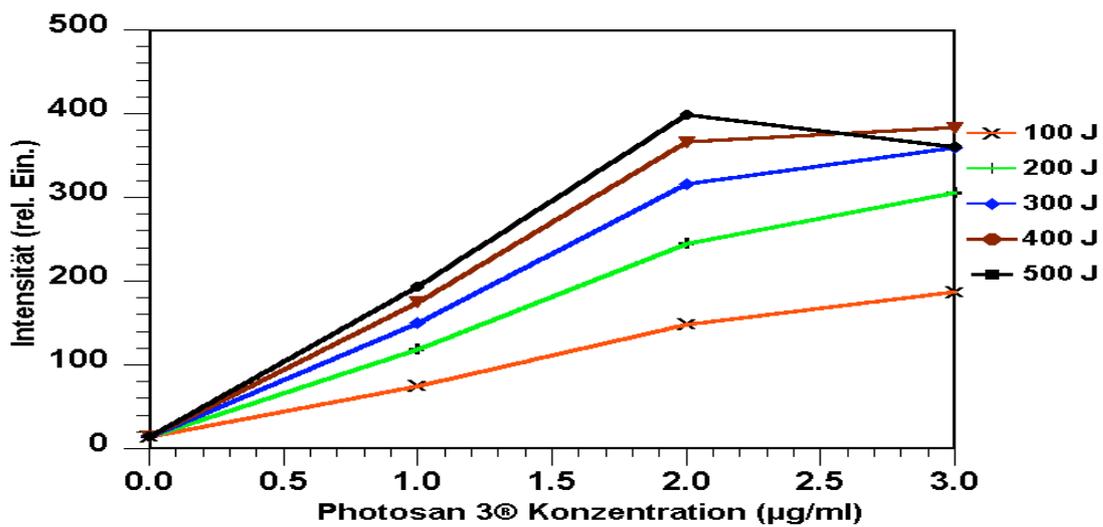
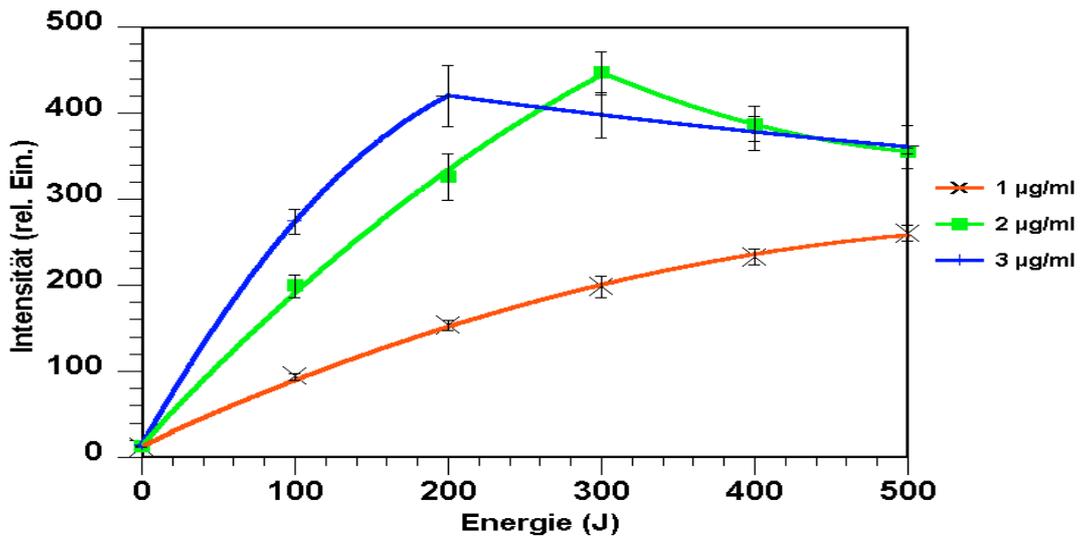


Abb. 40 TEMPO-Signal als Funktion der Konzentration

Zahl der Versuchsreihen = 4

Energie (J)	0	100	200	300	400	500
Intensität (1 mg/ml)	16	74	117	147	173	193
σ (1 mg/ml)	3.6	3.6	7.2	5.1	13.3	7.3
Intensität (2 mg/ml)	19	146	245	313	365	397
σ (2 mg/ml)	2.5	2.5	7.7	20.6	23.3	19.2
Intensität (3 mg/ml)	18	187	300	362	380	360
σ (3 mg/ml)	11.7	11.7	11.4	22.3	5.9	17.7

Tabelle 6 Einfluß der Photosensibilisatorkonzentration auf die Signalbildung (Photosan3[®])



Photofrin II® und TEMP

Abb. 41 TEMPO-Signal als Funktion der Konzentration

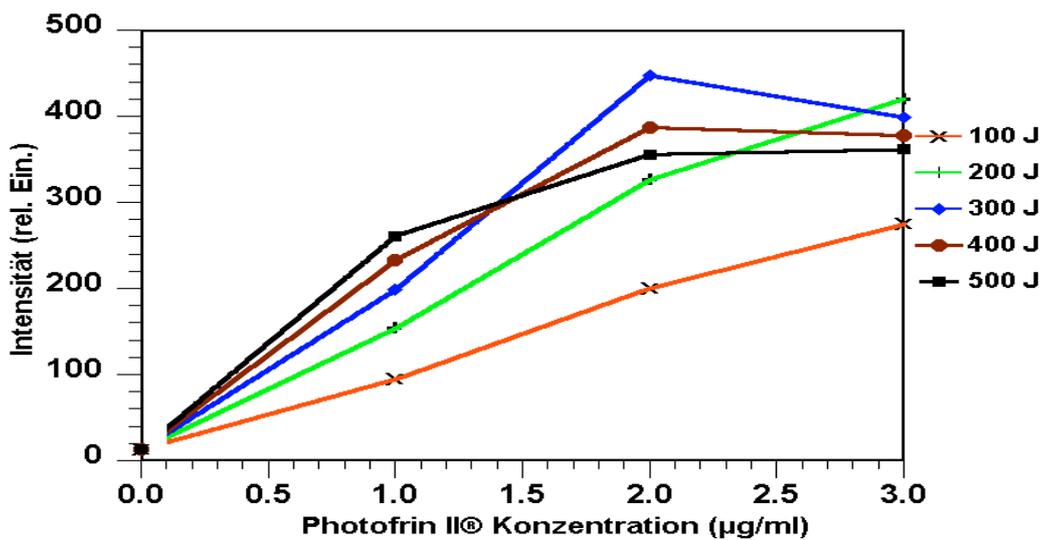


Abb. 42 TEMPO-Signal als Funktion der Konzentration

Zahl der Versuchsreihen = 4

Intensität (1 mg/ml)	18	88	151	197	233	254
Energie (J)	0	100	200	300	400	500
σ (1 mg/ml)	0.3	3.9	5.7	12.5	9.1	9
Intensität (2 mg/ml)	17	197	323	407	380	351
σ (2 mg/ml)	0.2	12.6	26.4	20.8	24.2	7.1
Intensität (3 mg/ml)	18	271	413	393	373	357
σ (3 mg/ml)	0.3	13.9	35.3	25.9	19.2	23.9

Tabelle 7 Einfluß der Photosensibilisatorkonzentration auf die Signalbildung (Photofrin II®)

4.4 Linearisierung der Generierungsraten von Singulett-Sauerstoff

4.4.1 Hintergrund

Es wurde angenommen, daß die Singulett-Sauerstoffgenerierung bei gegebener Photosensibilisatorkonzentration proportional der absorbierten Lichtenergie ist. Unter dieser Voraussetzung kann bis auf einen für alle Messungen konstanten Proportionalitätsfaktor die Generierungsaktivität anhand der Anfangssteigungen der Kurven festgestellt werden. Bei einer konstanten Laserleistung ist die abgelaufene Zeit proportional der eingestrahlten Energie. Somit ist die Beschreibung des Reaktionsablaufs durch reaktionskinetische Modelle der physikalischen Chemie möglich. Einem Modell, das eine Kinetik erster Ordnung bezüglich sowohl der Photosensibilisatorkonzentration als auch der Sauerstoffkonzentration voraussetzt, läge folgende hypothetische Gleichung für die Generierungsrate von TEMPO zu Grunde:

$$\frac{d[\text{TEMPO}]}{dt} = k_1 \cdot [\text{TEMP}] \cdot [\text{PS}] \cdot [{}^3\text{O}_2] = k_2 [\text{PS}] \cdot [{}^3\text{O}_2]$$

[TEMP] := Konzentration von TEMP

[TEMPO] := Konzentration von TEMPO

[PS] := Photosensibilisatorkonzentration

[${}^3\text{O}_2$] := Sauerstoffkonzentration

k_1, k_2 := Konstanten ($k_2 = k_1 \cdot [\text{TEMP}]$ als Konstante angenommen, da TEMP im Überschuß)

Die Proportionalitätskonstante wäre u.a. abhängig von dem verwendeten Photosensibilisator, der Quantenausbeute der Substanz und auch den apparativen Bedingungen. Die Konzentration von TEMP wird hier mit in die Konstante k_2 einbezogen. Die Konstanzhaltung der TEMP-Konzentration ist grundlegend für die quantitativen Vergleiche. Die experimentell gewonnenen Kurven zeigen, daß das Maximum um so schneller erreicht wird, je höher die Photosensibilisatorkonzentration ist.

Die Auswertung der experimentellen Meßwerte läßt sich durch eine Anpassung einer Polynomgleichung an die Anfangssteigungen durchführen. Da die Bedingung einer gleich hohen Sauerstoffkonzentration wegen des im Verlauf der Reaktion unterschiedlichen Verbrauchs nur ganz zu Beginn der Bestrahlung erfüllt werden kann, ist die maßgebliche Zahl für die Singulett-Sauerstoffgenerierungsrate der Koeffizient für den linearen Anteil des Polynoms. Dieser ist mit der Anfangssteigung der Kurve identisch.

4.4.2 Auswertung

Die Anpassung wurde mit einer Gleichung zweiter Ordnung durchgeführt:

$$y = a_0 + a_1E + a_2E^2$$

wobei

y := Signalstärke (proportional der Singulett-Sauerstoffausbeute)

a_0 := Nullsignal (technisch herstellungsbedingte Verunreinigung des TEMP durch TEMPO)

a_1 := Koeffizient des linearen Glieds (= Anfangssteigung) (J^{-1})

a_2 := Koeffizient des Glieds zweiter Ordnung (J^{-2})

E := Energie (J)

Die aus den experimentellen Werten zurückgerechneten Ergebnisse sind unten tabellarisch zusammengestellt. Es wurde festgestellt, daß die a_1 -Werte für jeden Photosensibilisator proportional der jeweiligen Konzentration sind. Es wurde der Parameter α , gleich $a_1/[\text{Photosensibilisatorkonzentration in } \mu\text{g/ml}]$, eingeführt.

Photosan 3[®]	1 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	3 $\mu\text{g/ml}$
A_1 (J^{-1})	0,70	1,55	1,99
A_2 (J^{-2})	-0,00086	-0,00196	-0,00269
α ($\text{ml}\mu\text{g}^{-1}\text{J}^{-1}$)	0,70	0,775	0,66

Photofrin II[®]	1 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	3 $\mu\text{g/ml}$
A_1 (J^{-1})	0,95	2,17	3,18
A_2 (J^{-2})	-0,0012	-0,00304	-0,00573
α ($\text{ml}\mu\text{g}^{-1}\text{J}^{-1}$)	0,95	1,085	1,06

Die Durchschnittswerte für α waren

$$\langle \alpha \rangle_{\text{Photosan3}^{\text{®}}} = 0,71 \text{ bzw. } \langle \alpha \rangle_{\text{Photofrin II}^{\text{®}}} = 1,03.$$

4.5 Spezifität der Generierung von Singulett-Sauerstoff

Durch Klassen von Photosensibilisatoren wie Farbstoffen und Phthalocyaninen werden neben Singulett-Sauerstoff auch Radikale der Typ I-Reaktion wie z.B. Hydroxyl-Radikale gebildet¹⁰⁰.

Um die Spezifität der Singulett-Sauerstoffmessung mit TEMP zu überprüfen, wurden daher bekannte Singulett-Sauerstoffquencher wie Histidin und β -Karotin eingesetzt^{40,101-104}. Da in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte, daß sich keine Radikale der Typ I-Reaktion nach Anregung von Porphyrinderivaten mittels ESR nachweisen lassen, wurde für diese Untersuchungen der Farbstoff Methyleneblau verwendet⁹⁹.

Hierzu wurde eine Reaktionslösung mit einer Konzentration von 0,1 mM Methyleneblau und mit β -Karotin bzw. mit unterschiedlichen Konzentrationen Histidin gemischt. DMPO wurde zum Nachweis der Typ I-Radikale und TEMP zum Nachweis von Singulett-Sauerstoff eingesetzt.

Abbildung 43 zeigt, daß mit steigender Konzentration von Histidin im Intervall von 0 - 0,5 mM das TEMP-Signal vollständig unterdrückt werden konnte. Im Gegensatz dazu ließ sich die Bildung von DMPO-OH-Addukten bei gleichen Konzentrationen nicht unterdrücken (Abbildung 44).

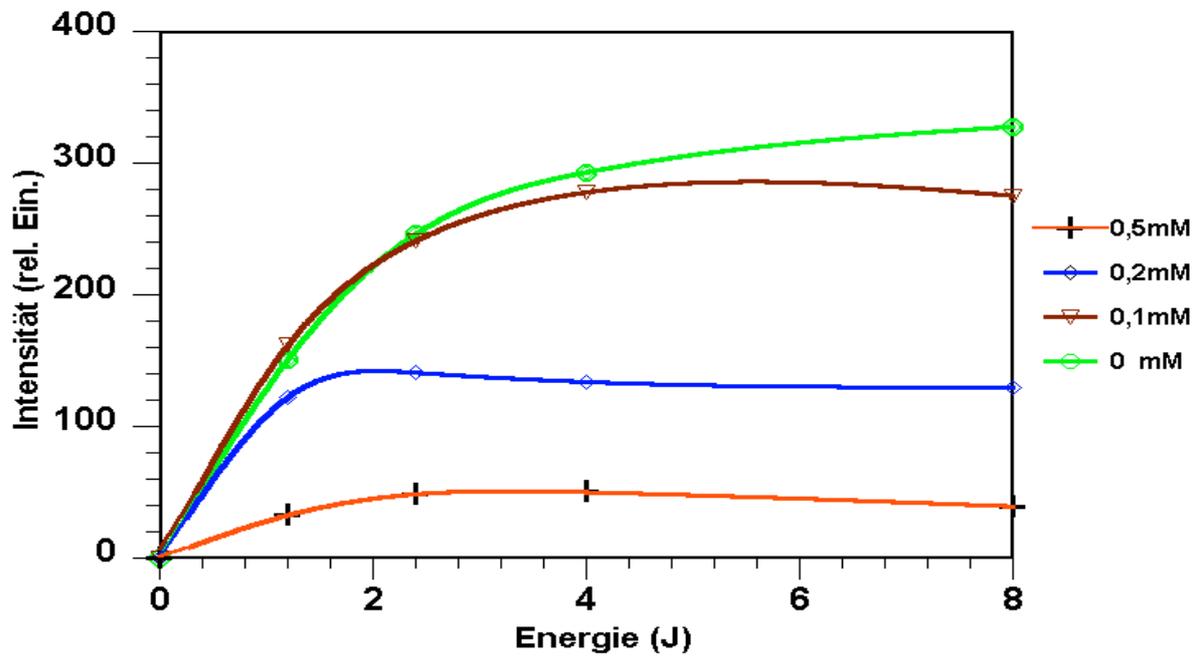


Abb. 43 Einfluß von Histidin auf das TEMP-Singulett-Sauerstoffsignal
Methylenblau 0,1 mM

Zahl der Versuchsreihen = 4

Energie (J)	0	1	2	4	8
Intensität (0 mM)	17	155.5	244	286.5	320.5
σ (0 mM)	0.9	4.3	22.6	25.2	17.4
Intensität (0,1 mM)	18	149	235.5	273.5	271
σ (0,1 mM)	0.9	4.5	13.1	19.8	18.3
Intensität (0,2 mM)	17	120	139	130	126
σ (0,2 mM)	1.2	3.8	11.3	13.6	9.5
Intensität (0,5 mM)	18	30.5	47	50	36.5
σ (0,5 mM)	0.7	3.1	4.6	4.8	8.2

Tabelle 8 Einfluß der Histidinkonzentration auf die TEMPO-Signalbildung

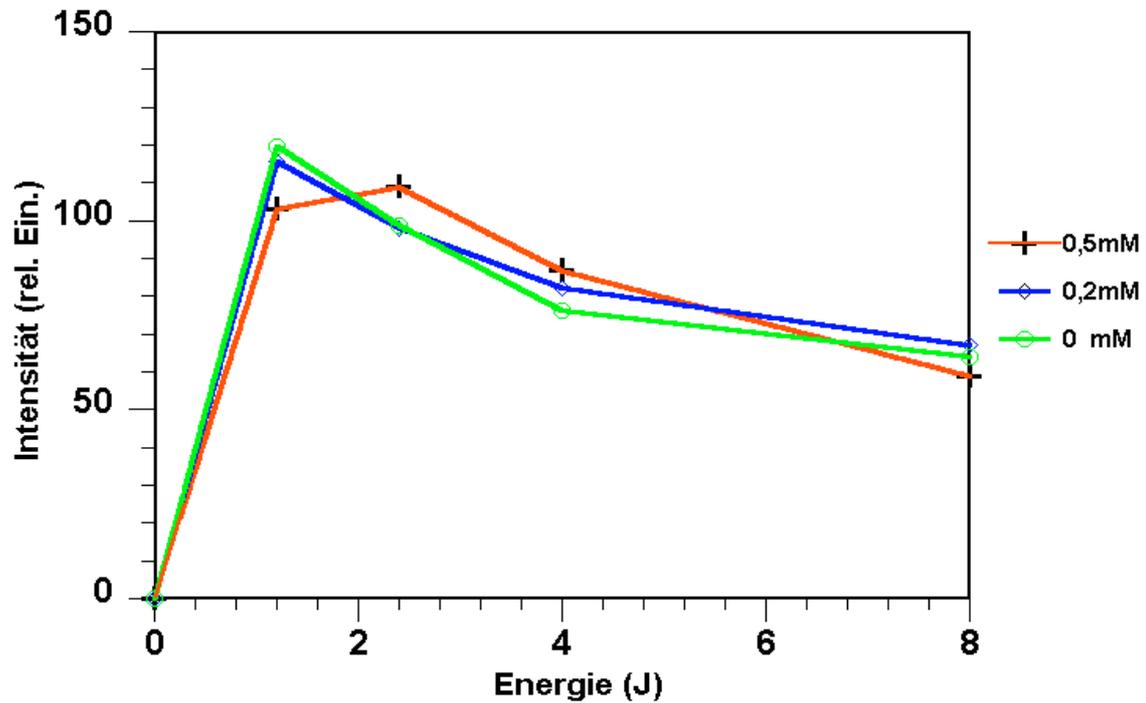


Abb. 44 Einfluß von Histidin auf die DMPO-OH Signalbildung
Methylenblau 0,1 mM

Zahl der Versuchsreihen = 4

Energie (J)	0	1	2	4	8
Intensität (0 mM)	0	116	96	74	62
σ (0 mM)	0	9.2	11.8	8.1	5.2
Intensität (0,2 mM)	0	112	94	80	66
σ (0,2 mM)	0	12.3	8.7	8.5	7.5
Intensität (0,5 mM)	0	98	106	85	58
σ (0,5 mM)	0	8.5	12.1	9.6	7.4

Tabelle 9 Einfluß der Histidinkonzentration auf die DMPO-OH Signalbildung

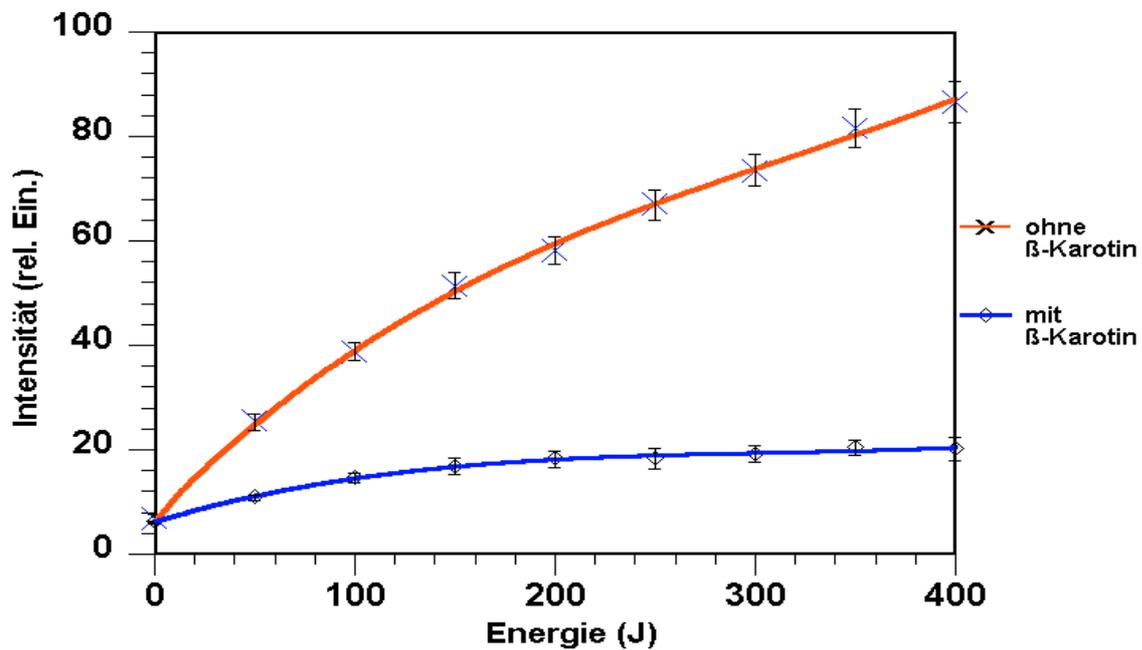


Abb. 45 Wirkung von β -Karotin auf das Singulett-Sauerstoffsignal

β -Karotin: 20 μ M, Photosan 3[®]: 0,5mg/ml, TEMP: 10 μ l/ml, Triton-X: 10 μ l/ml

Zahl der Versuchsreihen = 4

Energie (J)	0	50	100	150	200	250	300	350	400
Intensität (0 μ M)	6	24.6	38.6	50.7	58.3	66.3	73.4	81.4	86.4
σ (0 μ M)	1	1.9	3.1	4.3	6.1	5.9	7.9	10.2	7.6
Intensität (20 μ M)	7	11.1	14.3	16.6	17.9	18.7	19.3	20	20.2
σ (20 μ M)	0.9	1.5	1.7	2.6	2.2	3.5	3.7	2.9	3.5

Tabelle 10 Einfluß von β -Karotin auf die TEMPO-Bildung

Für die weiteren Untersuchungen wurde die Quarzküvette neu eingestellt. Hierdurch konnte ein vergleichsweise deutlich höheres Signal bei sonst gleichen Parametern (Energie, Photosensibilisatorkonzentration) erzeugt werden.

4.6 Vergleichende Untersuchung der Singulett-Sauerstoffgenerierung von Photosan 3[®] und anderen Porphyrinderivaten

Nach Validierung und Optimierung des Meßsystems und der Reaktionsbedingungen wurde die Singulett-Sauerstoffgenerierung unterschiedlicher Porphyrinderivate anhand der TEMPO-Bildung untersucht. Als Porphyrinderivate wurden das Polyhämatorporphyrinderivat Photosan 3[®], Porfimer-Natrium (Photofrin II[®]), Protoporphyrin IX und Mesoporphyrin eingesetzt.

Photosan 3[®]

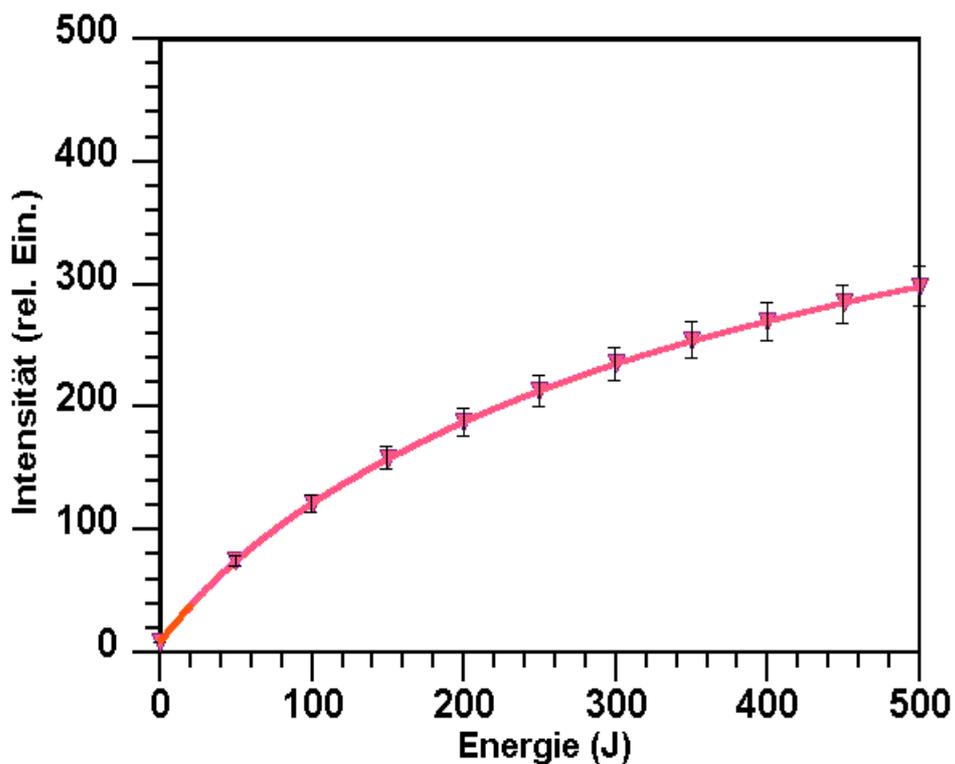


Abb. 46 Generierung von TEMPO nach Bestrahlung von Photosan 3[®]
Konzentration = 1 µg/ml

Zahl der Versuchsreihen = 22

Anfangssteigung 1,68

Energie (J)	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
Intensität	75,3	121,7	158,5	188,5	213,4	235,2	254,5	270,3	285,0	289,1
σ	4,3	7,2	9,7	11,6	13,2	14,1	15,0	15,7	15,9	16,6

Tabelle 11 TEMPO-Signal als Funktion der Energie bei Photosan 3[®]

Photofrin II®

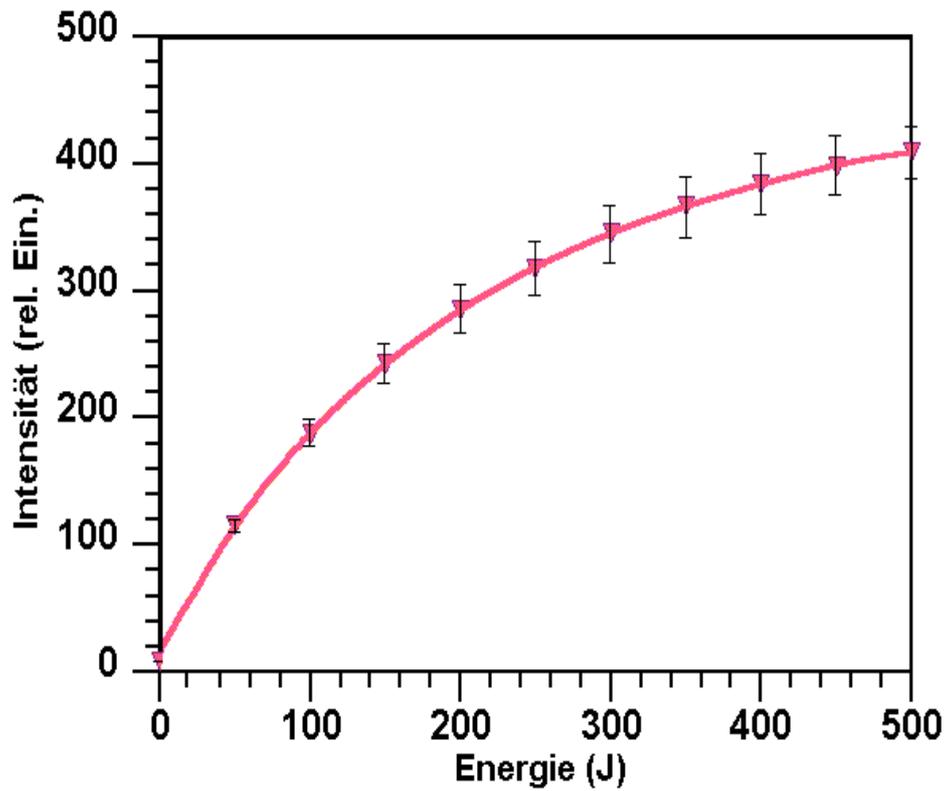


Abb. 47 Generierung von TEMPO nach Bestrahlung von Photofrin II®
Konzentration = 1µg/ml

Zahl der Versuchsreihen = 22

Anfangssteigung 2,64

Energie (J)	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
Intensität	115,6	188,2	243,4	285,5	318,5	345,6	366,7	384,7	398,8	409,0
σ	5,5	10,7	16,0	19,4	21,6	22,7	24,1	24,4	23,4	22,0

Tabelle 12 TEMPO-Signal als Funktion der Energie bei PhotofrinII®

Protoporphyrin IX

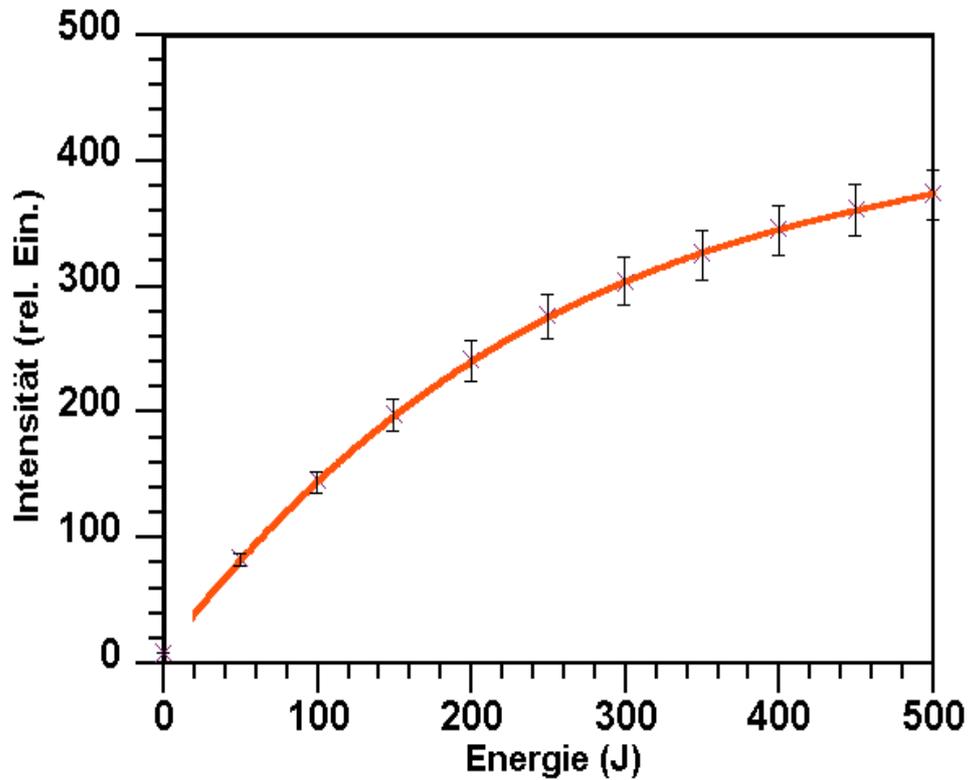


Abb. 48 Generierung von TEMPO nach Bestrahlung von Protoporphyrin IX
Konzentration = 1µg/ml

Zahl der Versuchsreihen = 4

Anfangssteigung 1,60

Energie (J)	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
Intensität	82,7	145,4	197,8	240,8	276,2	303,8	326,1	345,6	361,3	374,1
σ	5,0	9,1	13,3	16,4	18,2	20,0	20,1	20,5	21,0	20,2

Tabelle 13 TEMPO-Signal als Funktion der Energie bei Protoporphyrin IX

Mesoporphyrin

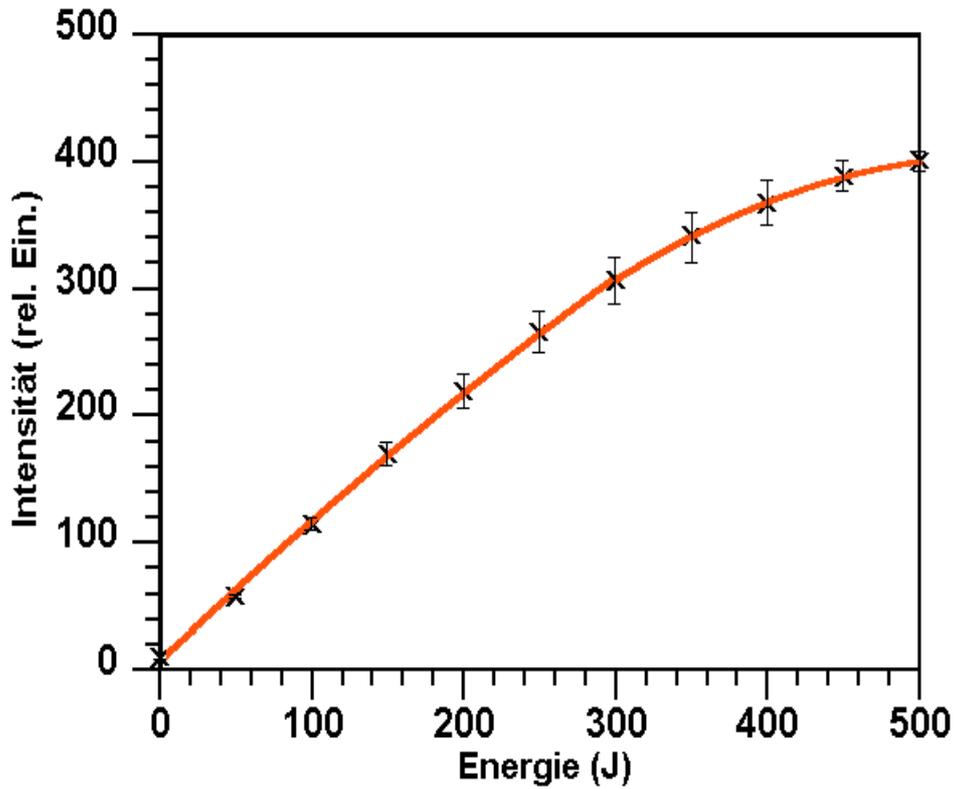


Abb. 49 Generierung von TEMPO nach Bestrahlung von Mesoporphyrin
Konzentration = 1 µg/ml

Zahl der Versuchsreihen = 4

Anfangssteigung 1,02

Energie (J)	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
Intensität	58,4	114,6	169,5	219,2	265,8	307,2	341,5	367,9	388,5	400,5
σ	1,8	5,1	9,5	15,0	16,7	19,0	20,0	17,9	12,6	8,2

Tabelle 14 TEMPO-Signal als Funktion der Energie bei Mesoporphyrin

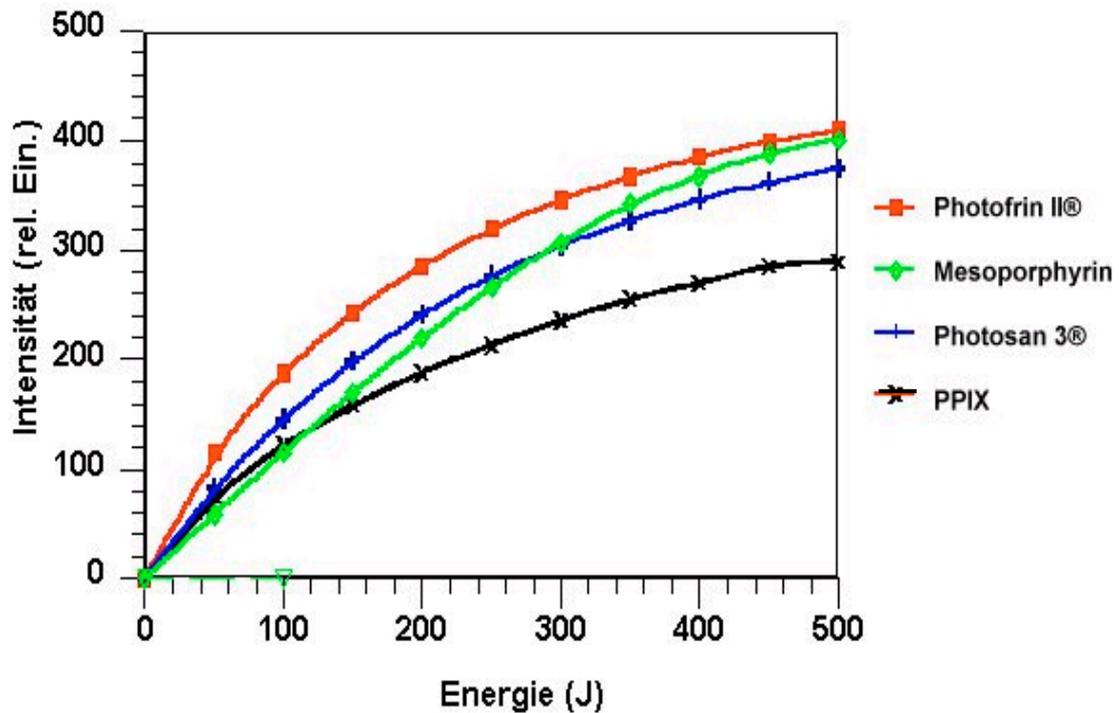


Abb. 50 Vergleich der Singulett-Sauerstoffgenerierung der verschiedenen Photosensibilisatoren

Vergleicht man die maximal erreichten Signalintensitäten bei der Konzentration von 1 µg/ml Photosensibilisator, so ergibt sich die folgende Reihenfolge:

- 1: Photofrin II[®] (409,0 ± 22,0)
- 2: Mesoporphyrin (400,5 ± 8,2)
- 3: Protoporphyrin IX (374,1 ± 20,2)
- 4: Photosan 3[®] (289,1 ± 16,6)

Der Vergleich der durchschnittlichen initialen Anstiege ergibt die Reihenfolge:

- 1: Photofrin II[®] (2,64)
- 2: Photosan 3[®] (1,68)
- 3: Protoporphyrin IX (1,60)
- 4: Mesoporphyrin (1,02)