

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Untersuchungen zur photochemischen Stabilität von Phenothiazinen und deren photochemische Reaktivität gegenüber Biomolekülen

3.1.1 Einführung

Die Arzneistoffgruppe der Phenothiazine umfasst eine Vielzahl von chemischen Substanzen. Strukturell unterscheiden sich die Phenothiazin-Derivate durch den Substituenten in der 2-Stellung. Hier können elektronenziehende Gruppen wie -Cl, -CF₃, oder elektronenschiebende Reste wie -OCH₃, -SCH₃ substituiert werden. Außerdem kann der Abstand der Seitenkette zwischen dem Ringstickstoff und basischen Seitenkettenstickstoff zwischen zwei oder drei C-Atomen variiert werden. Das chemische Verhalten der Phenothiazine wird durch die elektrophilen Substituenten wesentlich beeinflusst.

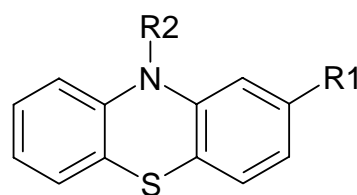


Abb. 11:

Promazin:	R ₁ : H	R ₂ : -(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂
Promethazin:	R ₁ : H	R ₂ : -CH ₂ -CH(CH ₃)-N(CH ₃) ₂
Chlorpromazin:	R ₁ : Cl	R ₂ : -(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂

Das Absorptionsmaximum des unsubstituierten Phenothiazins liegt bei 254 nm. Durch die Variation der Substituenten verschieben sich die Absorptionsmaxima hypso oder bathochrom. Alle in der Therapie eingesetzten Phenothiazine sind durch die Einwirkung von Licht sehr instabil. In Gegenwart von Licht und Oxidationsmitteln wie Ce (IV) oder Stickstoffoxiden bilden sich Radikale aus, die dann weiter zum Sulfoxid oxidiert werden können (Bosch et al., 1995; Masti et al., 2002). Wird Chlorpromazin mit Sonnenlicht bestrahlt, so findet man als Hauptprodukte Promazin, 2-Hydroxypromazin und Chlorpromazinsulfoxid (Grant and Greene, 1972).

Die photochemische Umsetzung und die Art der entstehenden Photoprodukte ist stark von dem Lösungsmittel abhängig (Davies et al., 1976, Garcia et al., 1995).

Phenothiazine wirken photosensibilisierend und können als Nebenwirkung eine phototoxische oder photoallergische Dermatitis auslösen (Epstein, 1968).

Für die photochemischen Untersuchungen wurden in dieser Arbeit die drei Phenothiazinderivate Promazin, Chlorpromazin und Promethazin ausgewählt.

3.1.2 Einführung zu Chlorpromazin

Chlorpromazin ist in der 2-Stellung mit Chlor substituiert (Abbildung 11). Die Seitenkette in der 10-Position besteht aus drei C-Atomen. Unter Licht- und Sauerstoffeinwirkung wird ein Elektron eliminiert, dabei entsteht das mesomeriestabilisierte tiefrote Radikal, welches mit ESR Untersuchungen nachgewiesen werden konnte (Motten et al., 1985). Das Radikal disproportioniert zu der reduzierten Chlorpromazin Form und zu dem Phenazathionium-Ion (Abbildung 12), wobei im sauren Milieu die Disproportionierung unterdrückt wird. Das tiefrote Radikal wird im sauren pH Bereich stabilisiert (Cheng et al., 1978). Im wässrigen Milieu entsteht im weiteren Reaktionsverlauf das farblose Sulfoxid, die dabei freiwerdenden Protonen lassen den pH-Wert beträchtlich absinken. Die Seitenkette an der 10-Position hat dabei einen entscheidenden Einfluss auf die Reaktivität. Besteht die Seitenkette aus drei C-Atomen, so entsteht bevorzugt das Sulfoxid. In stark saurer Lösung ist diese Reaktion umkehrbar, es bilden sich wieder Radikale, die nun irreversibel in Chlorpromazin und das Hydroxyphenothiazin übergehen. Die gebildeten Sulfoxide reagieren zu ringhydroxylierten Verbindungen oder werden zum Sulfon oxidiert.

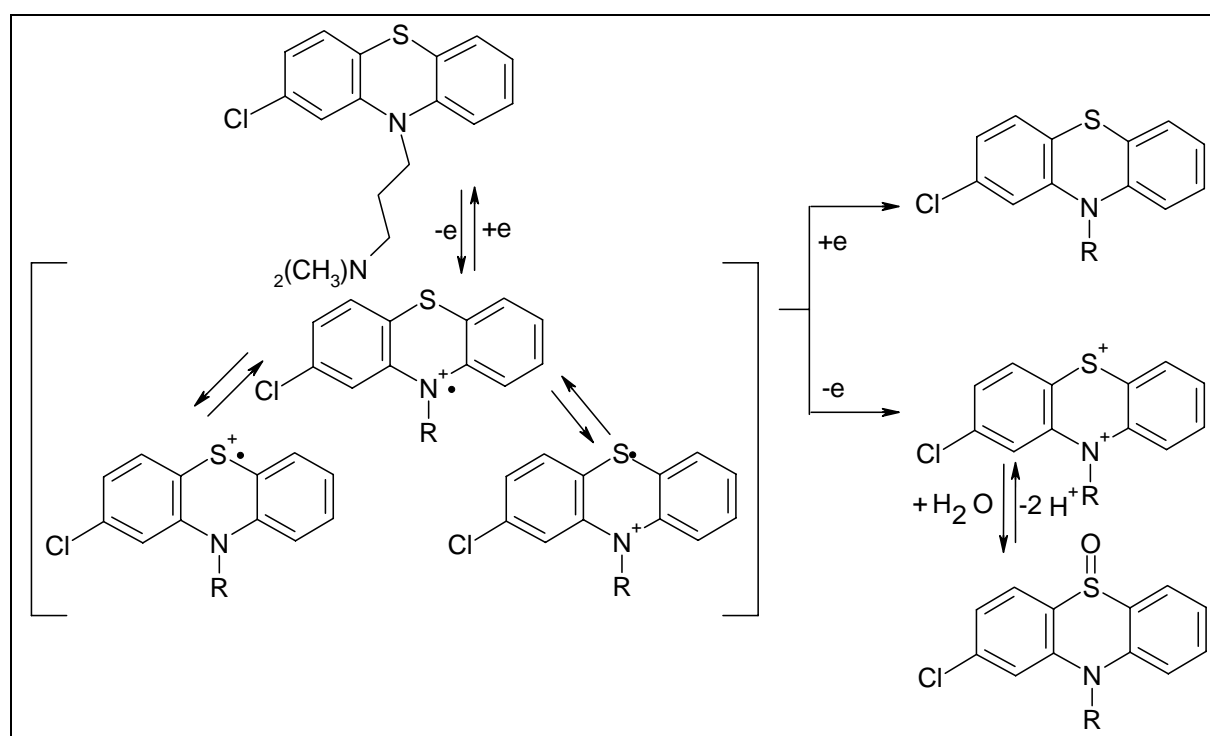


Abb. 12: Photochemischer Abbau von Chlorpromazin (Egger et al., 1999)

3.1.3 Untersuchung der photochemischen Wechselwirkung von Chlorpromazin mit 5-Guanosinmonophosphat

Als Modellsubstanz für die DNA wurde die DNA-Base 5-GMP ausgewählt. In der Vergangenheit wurde von Wechselwirkungen zwischen Chlorpromazin und GMP in Anwesenheit von Licht berichtet. Die Addukte von Chlorpromazin und GMP entstehen durch die Chlor-Abspaltung von Chlorpromazin und die anschließende Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem C-2 des Phenothiazinrings und dem C-8 des Purinringes von GMP (Ciulla et al., 1986; Fujita et al., 1981). Bei den Photozerfallsuntersuchungen von Chlorpromazin in Anwesenheit von DNA und Sauerstoff wurde die Dechlorierung von Chlorpromazin beobachtet (Kahn et al., 1970; Grant and Greene, 1972; Rosenthal et al., 1978). In anderen Studien konnten Guanin-Phenothiazin Produkte nachgewiesen werden (Piette, 1987). Darüber hinaus wurde von Interaktionen von Chlorpromazin mit der DNA vielfach berichtet (Kochevar et al., 1998; Fujita et al., 1981). Dabei läuft die Schädigung der DNA in Gegenwart von Chlorpromazin im anaeroben schneller ab als im aeroben (Schothorst et al., 1983). Die Schädigung der DNA scheint konzentrationsabhängig zu sein, erst bei einem stöchiometrischen Verhältnis 1:1 von Chlorpromazin und DNA sind vermehrt Schäden an der DNA nachweisbar. Wird Chlorpromazin in Gegenwart von einer hohen Konzentration doppelsträngiger DNA bestrahlt, so beobachtet man eine geringere Photolyse von Chlorpromazin. Das Chlorpromazin wird dabei anscheinend durch Interkalation mit der DNA vor Photolyse geschützt (Kochevar et al., 1984). Andererseits konnte nachgewiesen werden, dass vorbestrahltes Chlorpromazin kovalente Addukte mit der DNA bildet (Chung and Kochevar, 1979). In Versuchen mit vorbestrahltem Chlorpromazin und mit *E. coli* Bakterien konnten keine phototoxischen Reaktionen nachgewiesen werden (Rosenthal et al., 1978). Die Photoprodukte des Chlorpromazins führen außerdem zu Hämolyse (Kochevar et al., 1983). Auch die Hämolyse von roten Blutzellen ist mit vorbestrahltem Chlorpromazin noch möglich (Kochevar and Lamola, 1979). Die widersprüchlichen Daten im Bezug auf die Phototoxizität von vorbestrahltem Chlorpromazin ergeben sich aus den unterschiedlichen Gemischen von Photoprodukten, die unter verschiedenen Bedingungen hergestellt wurden.

Das Photoprodukt Chlorpromazinsulfoxid besitzt ebenfalls eine phototoxische Aktivität. Bei in vivo Versuchen mit Mäusenschwänzen wurde eine geringe Phototoxizität gefunden als bei Chlorpromazin (Ljunggren and Moller, 1977). Außerdem konnte die kovalente Bindung von Chlorpromazinsulfoxid an Biomoleküle unter UV-A Belichtung in in vivo Untersuchungen nachgewiesen werden (Schoonderwoerd et al., 1988).

3.1.4 Chromatographische Bedingungen bei den Untersuchungen von Phenothiazinen

Bei der Bestrahlung der Phenothiazine wurde bei allen Untersuchungen im wässrigen Lösungsmittel gearbeitet. Die photochemische Bestrahlung der Phenothiazine erfolgte entweder in rein wässriger oder in wässriger phosphatgepufferter (5 mmol/l^{-1}) Lösung. Außerdem wurde bei bestimmten Bestrahlungen der pH-Wert mit verschiedenen Phosphatpufferlösungen variiert.

Aufgrund von Interaktion zwischen den Phenothiazinen und der Tefzel-Reaktionskapillare wurden die Phenothiazine nur verzögert aus der Reaktionskapillare eluiert. Deshalb konnte erst nach 14,5 min die Säulenschaltung von der Load in die Injekt Position umgeschaltet werden.

Nach der Bestrahlung der Phenothiazine in An- und Abwesenheit von Biomolekülen wurden die Stoffe und die entstandenen Photoprodukte auf der Säule 1 über 14,5 min angereichert. Noch während dieser Zeit wurde das GMP über die Säule 1 eluiert und detektiert. Die chromatographische Auftrennung der Photoprodukte erfolgte mit einem Acetonitril/Puffergradienten über die Säule 2 (s. Tab. 1). Das Puffersystem bestand dabei aus Kaliumhydrogensulfat ($0,043 \text{ mmol/l}^{-1}$) und Propansulfonat (1 mmol/l^{-1}).

Die Etablierung einer elektrochemischen Detektion ist aufgrund der verursachten mechanischen Störung der Säulenschaltung gescheitert.

	Zeit (min)	0	14.5	19.0	22.5	33.0	36.0
Pumpe 1	Puffer%	100	100	100	100	100	100
Pumpe 2	Puffer%	100	100	85	70	43	43
	Acetonitril%	0	0	15	30	57	57

Tab. 1: Gradientenprofil und Schaltplan der beiden Pumpen für die Untersuchungen von Phenothiazinen

3.1.5 Ergebnisse zu den Photostabilitätsuntersuchungen von Chlorpromazin mit variablen Lichtquellen

Bei den vergleichenden Photostabilitätsuntersuchungen von Chlorpromazinhydrochlorid mit unterschiedlichen Strahlungsquellen wurde die Bestrahlung in ungepufferter Lösung durchgeführt. Die Untersuchungen von Chlorpromazinhydrochlorid wurden mit zwei unterschiedlichen Lichtquellen durchgeführt. Zum einen wurde eine gewöhnliche Tageslichtlampe mit Vollspektrum und zum anderen ein UV-A Quecksilberniederdruckstrahler eingesetzt. Bei Belichtung der Chlorpromazinslösung mit der

Tageslichtlampe kommt es zur langsamen photolytischen Zersetzung des Wirkstoffes (Abbildung 13). Nach 90 min Belichtung sind 17% des Chlorpromazins noch nicht zersetzt. Das chromatographische Spektrum der entstehenden Photoprodukte bei der Bestrahlung mit der Tageslichtlampe ist mit der Untersuchung der UV-A Lampe vergleichbar. Bei der Untersuchung mit dem UV-A Strahler (Abbildung 14), führt die Belichtung zur raschen Photozersetzung des Arzneistoffes und Bildung der Reaktionsprodukte. Nach 100 s Belichtung wurden 15% des Wirkstoffes noch nicht umgesetzt. Bei der Bestrahlung von Chlorpromazin entstehen eine Vielzahl von Reaktionsprodukten. Die beiden unbekanntenen Photoprodukte P1 und P2 sind zur graphischen Auswertung und Vergleichbarkeit der beiden Untersuchungsreihen herangezogen worden. Der prinzipielle kinetische Verlauf dieser Photoprodukte ist im Vergleich zwischen dem UV-A Strahler und der Tageslichtlampe nahezu gleich, nur der zeitliche Faktor unterscheidet sich erheblich. Die halblogarithmische Auswertung von dem photochemischen Abbau von Chlorpromazin mit der Tageslichtlampe und dem UV-A Strahler deutet auf eine Reaktionskinetik 1. Ordnung hin (s. Anhang Abb. 1 und 2). Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante beträgt bei der Belichtung mit der Tageslichtlampe $0,00033 \text{ s}^{-1}$ und bei der Untersuchung mit der UV-A Lampe $0,019 \text{ s}^{-1}$. Zur Kontrolle wurde die Studie ohne Bestrahlung wiederholt. Aus der Abbildung 13 ist zu erkennen, dass der Abbau von Chlorpromazinhydrochlorid unter Lichtschutz bei 90 min Standzeit im Photoreaktor sehr gering ist.

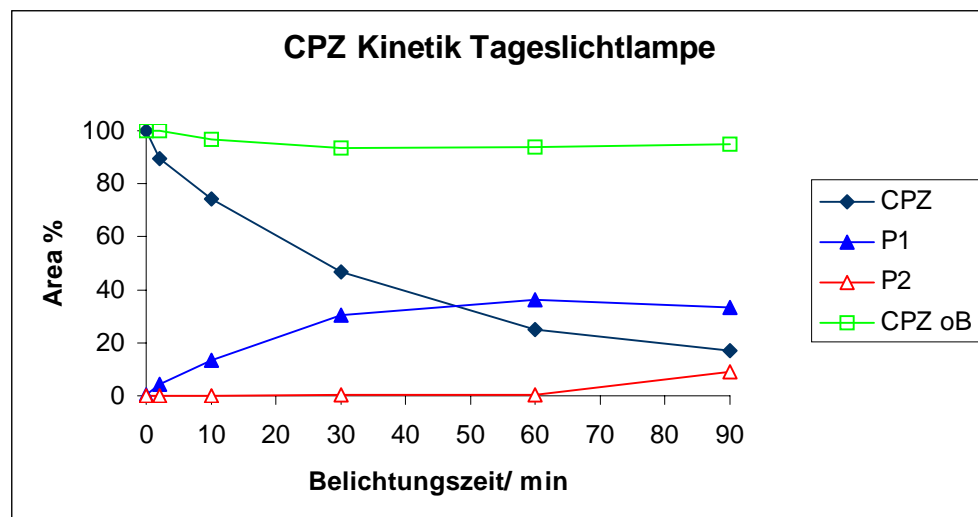


Abb. 13: Photozersetzung einer wässrigen Chlorpromazinhydrochloridlösung bei Belichtung mit der Tageslichtlampe

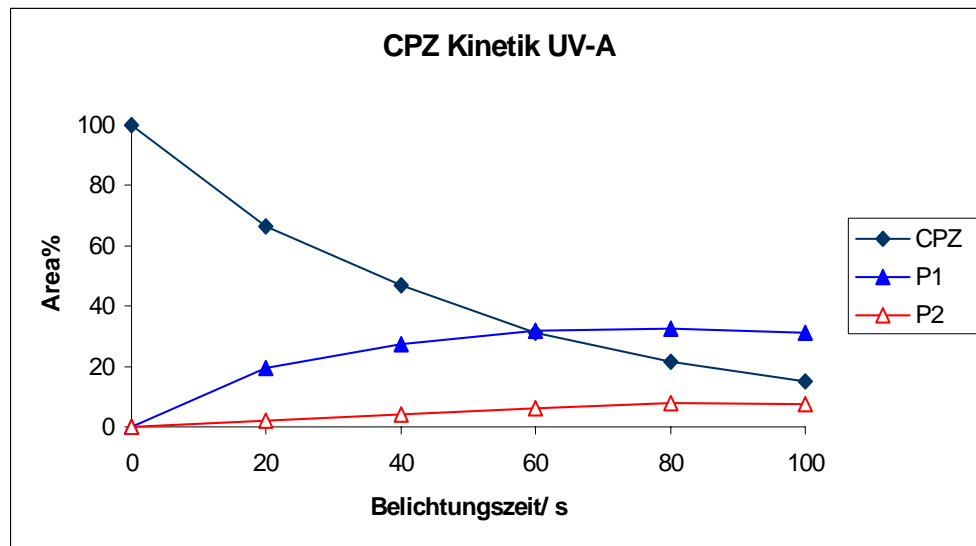


Abb. 14: Photozersetzung einer wässrigen Chlorpromazinlösung mit der UV-A Lampe

3.1.6 Ergebnisse zur Untersuchung der Photostabilität bei unterschiedlichen pH-Werten

Die Photolysegeschwindigkeit von Chlorpromazin wurde in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht. Dabei wurde der UV-A Strahler eingesetzt. Der Einfluss des pH-Wertes auf die photochemische Zersetzung wird aus Abbildung 15 deutlich.

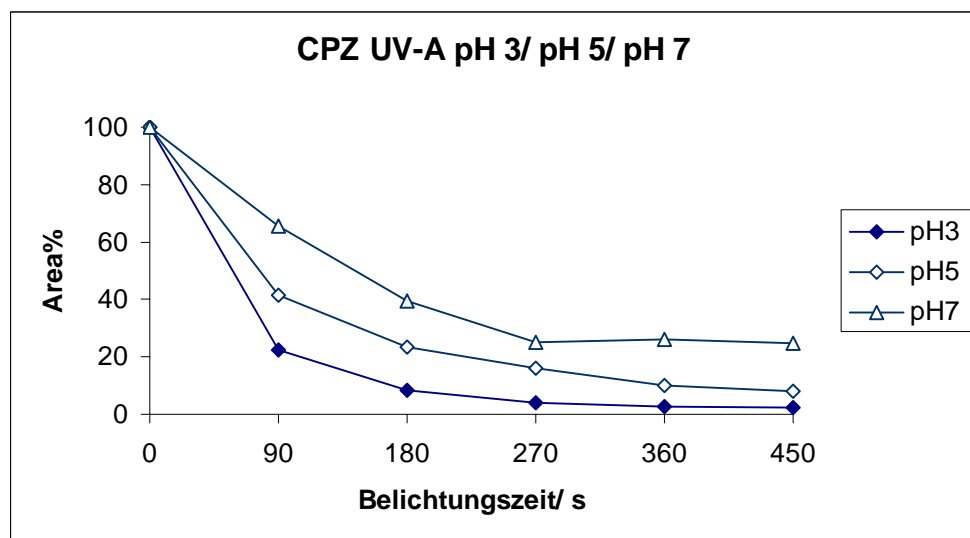


Abb. 15: Photozersetzung wässriger phosphatgepufferter Chlorpromazinhydrochloridlösungen bei verschiedenen pH-Werten mit der UV-A Lampe belichtet

Die Geschwindigkeit der Photoreaktion nimmt mit steigendem pH-Wert ab. Die halblogarithmische Auswertung deutet für die pH 5 Untersuchung auf eine Reaktionskinetik 1. Ordnung hin und ergibt eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von $0,0055 \text{ s}^{-1}$. Bei pH 7 und pH 3 ist die Reaktionskinetik in nur bestimmten Bereichen linear. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Kinetiken ergeben sich durch die Ausgleichsgerade. Die annähernde Geschwindigkeitskonstante bei pH 3 beträgt $0,0082 \text{ s}^{-1}$ und bei pH 7 $0,0032 \text{ s}^{-1}$ (s. Anhang Abb. 3).

3.1.7 Identifizierung des Promazins und Chlorpromazinsulfoxids

Durch die photochemische Dechlorierung des Chlorpromazins resultiert das Promazin. Der Promazin-Peak im Chromatogramm wurde durch eine Promazin-Vergleichslösung über die Retentionszeit identifiziert.

Das Chlorpromazinsulfoxid wurde durch Oxidation von Chlorpromazin mit Wasserstoffperoxid hergestellt. In der Literatur wurde von der Oxidation der Phenothiazine mittels Wasserstoffperoxid schon häufig berichtet (El-Gindy et al., 2002; Ogamo and Fukumoto, 2004).

Das synthetisierte Chlorpromazinsulfoxid wurde massenspektrometrisch über den Mol-Peak (334^+) identifiziert (s. Seite 125). Das erhaltene Spektrum stimmte mit dem Vergleichsspektrum von Chlorpromazinsulfoxid aus der Spektrendatei (Pfleger et al., 1992) überein.

Die Vollständigkeit der Reaktion und die Reinheit wurden mit der HPLC überprüft. Die Verwendung von unterschiedlichen mobilen Phasen führte bei allen Prüfungen zu einem Peak, der das Chlorpromazinsulfoxid darstellt.

Aus den Chromatogrammen in Abbildung 16 ist ersichtlich, dass bei verschiedenen pH-Werten unterschiedliche Photoprodukte resultieren. Bei pH 7 ist im Chromatogramm B bei einer Retentionszeit von 29 min ein deutlicher Peak von Promazin zu erkennen, der bei pH 3 (Chromatogramm A) nur angedeutet ist. Das CPS dagegen scheint bevorzugt bei pH 3 zu entstehen.

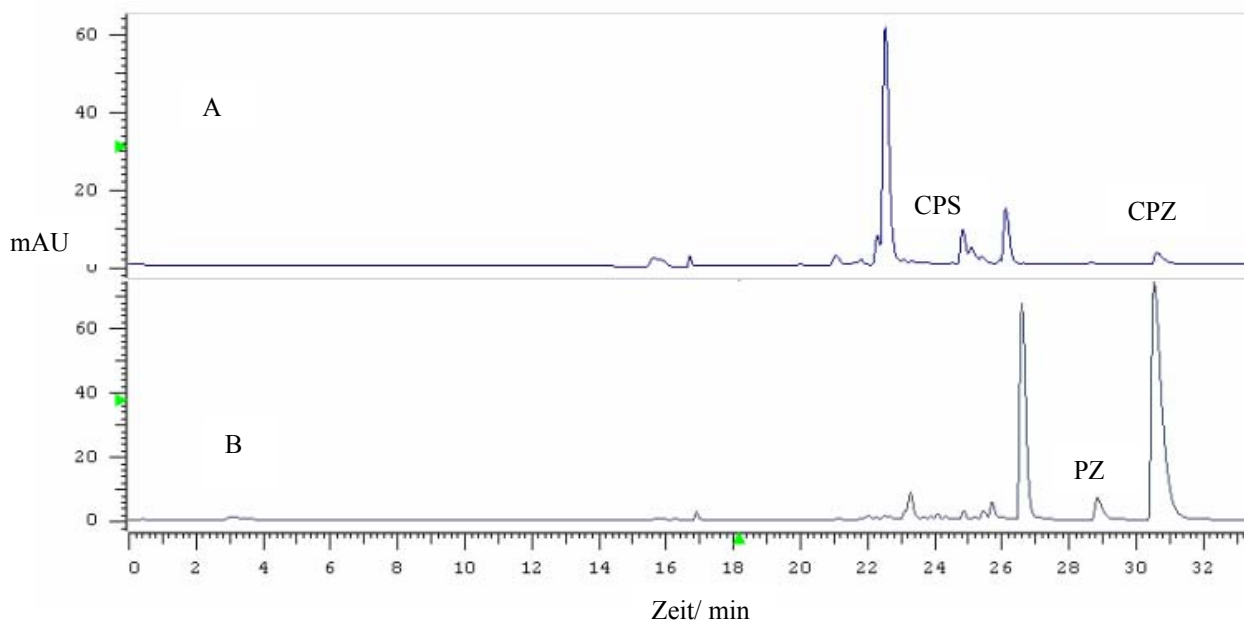


Abb. 16 A: Chromatogramm der Chlorpromazinhydrochlorid Lösung nach 360 s UV-A Bestrahlung bei pH 3

B: Chromatogramm der Chlorpromazinhydrochlorid Lösung nach 360 s UV-A Bestrahlung bei pH 7

3.1.8 Ergebnisse zur photochemischen Umsetzung von Chlorpromazin mit 5-Guanosinmonophosphat

Die Untersuchungslösung bestand aus einem äquimolaren Verhältnis von Chlorpromazin und GMP. Die Belichtung wurde bei zwei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Zunächst wurde Chlorpromazin bei pH 3 und pH 7 in phosphatgepufferten Lösungen ohne GMP bestrahlt. Die Bestrahlung mit der UV-A Lampe erfolgte bei fünf unterschiedlichen Belichtungszeiten. Die Probelösungen wurden 0, 90, 180, 270, 360 und 450 s lang belichtet. Nach jeder Bestrahlung wurden die Peakflächen von Chlorpromazin und den Photoprodukten Promazin und Chlorpromazinsulfoxid ausgewertet. Der prozentuale Wert ergibt sich aus dem Verhältnis der Peakfläche des Photoproduktes zur Peakfläche des unbestrahlten Chlorpromazins. Der prozentuale Wert der Peakflächen wurde in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Belichtungszeiten graphisch dargestellt.

Bei dem Vergleich der Chlorpromazin pH 3 und pH 7 Reaktionskinetik (Abbildung 18 und 20) wird deutlich, dass Chlorpromazin bei pH 3 rascher photolytisch abgebaut wird als bei pH 7.

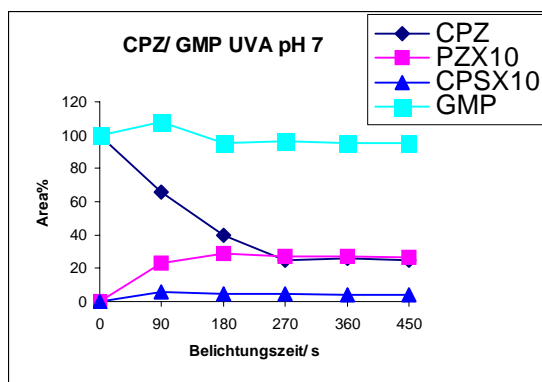


Abb. 17: CPZ/ GMP bei pH 7 mit UV-A belichtet

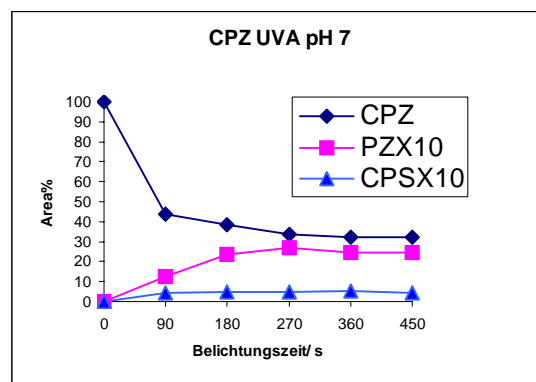


Abb. 18: CPZ bei pH 7 mit UV-A belichtet

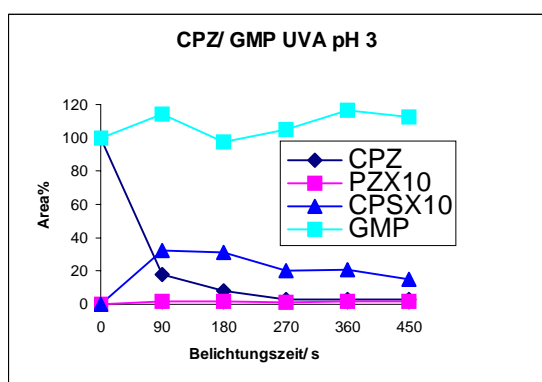


Abb. 19: CPZ/ GMP bei pH 3 mit UV-A belichtet

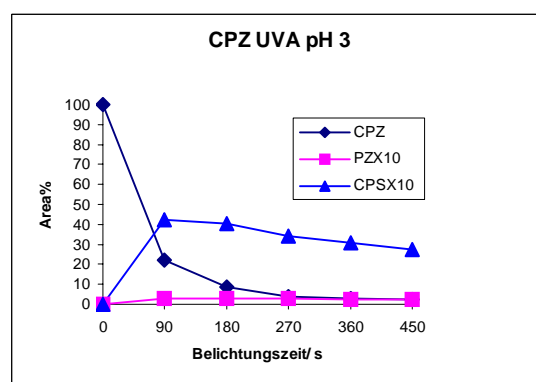


Abb. 20: CPZ bei pH 3 mit UV-A belichtet

Nach 450 s UV-A Bestrahlung bei pH 3 wurden nur 3% an CPZ noch nicht photochemisch zersetzt. Im Gegensatz dazu zeigt die Untersuchung bei pH 7 und 450 s UV-A Bestrahlung, dass 32% des CPZ noch nicht photochemisch umgesetzt wurden.

In den vier Graphiken wurden die prozentualen Flächenwerte von Chlorpromazinsulfoxid und Promazin mit dem Faktor 10 multipliziert damit der Kurvenverlauf besser verfolgt werden kann. Es fällt auf, dass bei der pH 3 Kinetik der Anteil an Chlorpromazinsulfoxid höher ausfällt als der resultierende Promazinanteil. Bei pH 7 hingegen zeigt sich ein gegenteiliges Bild, hier fällt der Anteil an Promazin höher aus als der Anteil des Chlorpromazinsulfoxid.

Bei der Bestrahlung von Chlorpromazinhydrochlorid in Gegenwart von GMP wurden zwischen der pH 3 und pH 7 Untersuchung ebenfalls Unterschiede festgestellt. Der prozentuale Anteil des GMP-Peaks nimmt nach 450 s UV-A Bestrahlung in Anwesenheit von Chlorpromazin bei pH 7 auf 95% Prozent ab. Diese Abnahme an GMP könnte auf einen Verbrauch von GMP, für die Bildung möglicher Photoprodukte mit primären CPZ-Photoprodukten hindeuten. In der Literatur wurde postuliert, dass bei der photochemischen

Reaktion zwischen dem Chlorpromazin und GMP eine kovalente Bindung zwischen der dechlorierten C-2 Position des Phenothiazins und der C-8 Position des Purinringes entsteht. Wäre dieses der Fall, so müsste die Konzentration des entstehenden Promazins in Gegenwart von GMP abnehmen, da das dechlorierte Promazyldradikal mit dem GMP das beschriebene Reaktionsprodukt bilden würde. Vergleicht man nun die kinetische Kurve des Promazins der alleinigen Belichtung von Chlorpromazin (Abbildung 18) mit dem kinetischen Verlauf des Promazins in Gegenwart von GMP (Abbildung 17), so ist keine Abnahme des gebildeten Promazins in Anwesenheit von GMP festzustellen. Das GMP muss folglich mit einem anderen Photoprodukt des Chlorpromazins reagieren.

Um zu überprüfen ob überhaupt ein Abbau des Biomoleküls erfolgte, wurde der zeitliche Verlauf der Fläche/ Zeit Kurve genauer untersucht. Bei einem langsamen Abbau des Biomoleküls kann die Exponentialfunktion für kleine t-Werte durch eine Gerade beschrieben werden (McLaurinsche Reihe).

$$f \approx e^{-kt} \approx e^0 + \frac{de^{-kt}}{dt}(t=0) \cdot t \approx 1 - kt$$

Durch lineare Regression wurde eine Gerade durch die Messpunkte gelegt. Die ermittelte Steigung der Geraden wurde mittels t-Test untersucht ob sie von Null verschieden ist.

Die durch lineare Regression ermittelte Gerade der GMP-Kurve in Abbildung 17 ergibt, dass die Steigung der Regressionsgeraden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ gleich Null ist. Die Steigung der Regressionsgeraden des allein belichteten GMPs ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ gleich Null. Vergleicht man die Steigung der Regressionsgeraden der GMP-Kurve in Abbildung 19 mit der Steigung des allein belichteten GMPs, so unterscheiden sich die beiden Steigungen nicht signifikant. Beim statistischen Vergleich der Regressionsgeradensteigungen der pH 7 Untersuchung wurde das gleiche Ergebnis erhalten. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung lassen darauf schließen, dass GMP bei Bestrahlung in Anwesenheit von Chlorpromazin nicht signifikant abgebaut wurde, da die Steigung der Regressionsgeraden gleich Null ist.

In der Abbildung 21 sind zwei HPLC-Chromatogramme zu den photochemischen Untersuchungen von Chlorpromazin (mit GMP) bei pH 7 und 360 s UV-A Belichtung zu sehen. Abbildung A zeigt die alleinige Bestrahlung von Chlorpromazin und Abbildung B die

Bestrahlung eines äquimolaren Gemisches aus Chlorpromazin und GMP. Vergleicht man die Peakflächen des entstandenen Promazins, so ist deutlich zu erkennen, dass die Peakfläche in Gegenwart von GMP nicht abnimmt. Bei der Bestrahlung von Chlorpromazin sind in dem Chromatogramm im Bereich von 22-25 min eine Vielzahl von Photoprodukten zu erkennen. Diese Photoprodukte sind bei der Belichtung von Chlorpromazin in Gegenwart von GMP nicht mehr zu identifizieren, möglicherweise haben diese Photoprodukte mit dem GMP zu einem Produkt reagiert. Denn bei der Belichtung von Chlorpromazin in Gegenwart von GMP ist im Chromatogramm zwischen 24-25 min ein neuer Peak zu erkennen.

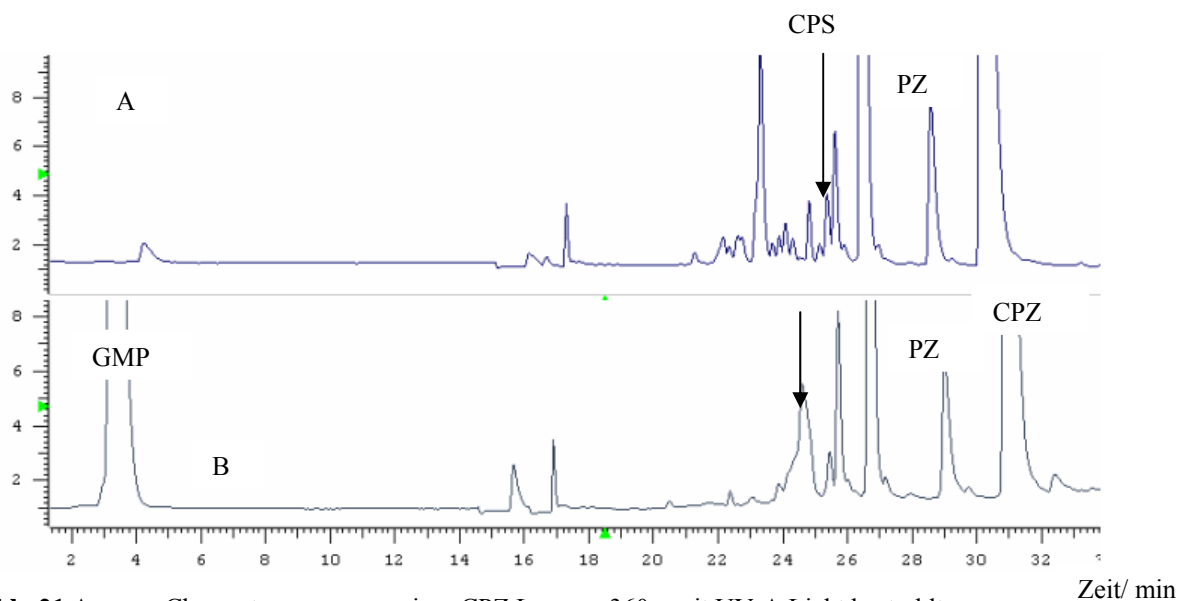


Abb. 21 A: Chromatogramm von einer CPZ Lösung, 360 s mit UV-A Licht bestrahlt
 B: Chromatogramm von einer CPZ/ GMP Lösung im Stoffmengenverhältnis 1:1, 360 s mit UV-A Licht bestrahlt

Bei dem Vergleich der beiden übereinandergelegten Chromatogramme der 360 s lang bestrahlten Lösung von Chlorpromazin und der Lösung mit dem Gemisch von Chlorpromazin und GMP bei pH 3 sind keine neuen Peaks im Chromatogramm zu erkennen (Abbildung 22). Das rote Radikalkation von Chlorpromazin ist im sauren pH Bereich stabil. Zur Identifizierung des Radikalkations wurde das DAD-Spektrum ausgewertet. In dem Peak bei 23 min ist noch ein weiterer Peak vorgelagert, der eine Absorption im langwelligen Bereich zeigt. Aus Angaben der Literatur ist bekannt, dass das rote Radikalkation unter anderem ein Absorptionsmaximum von 529 nm besitzt (Diehl et al., 2000). In dem Bereich 14 bis 17 min ist ebenfalls eine Absorption in dem langwelligen Bereich zu sehen, dieses ist aber vermutlich auf das Umschalten der Ventile zurückzuführen.

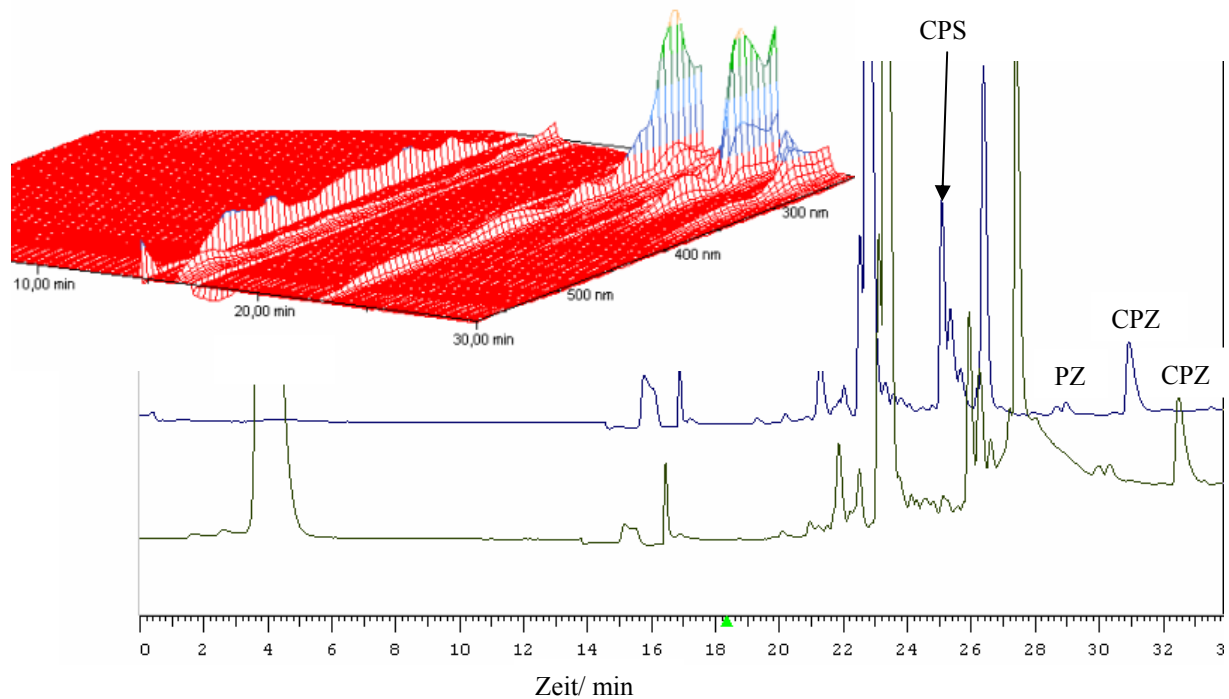


Abb. 22: Übereinandergelegte Chromatogramme der CPZ Untersuchung und der kombinierten Untersuchung von CPZ/ GMP bei pH 3 und 360 s mit UV-A Licht bestrahlt

Abb. 23: DAD Spektrum der kombinierten Bestrahlung von CPZ und GMP

3.1.9 Ergebnisse zur photochemischen Untersuchung von Promethazinhydrochlorid

Zunächst wurde Promethazinhydrochlorid in wässriger phosphatgepufferter Lösung bei pH 3 und pH 7 bestrahlt. Die Belichtungszeit der Promethazin Untersuchungen wurde im Vergleich zu Chlorpromazin Untersuchungen auf 50 Minuten erhöht, weil sich Promethazin durch eine höhere Photostabilität auszeichnet. Die Promethazinslösungen wurden 0, 10, 20, 30, 40 und 50 min lang bestrahlt. Die Schaltzeit der Säulenschaltung wurde von 14,5 auf 11,5 min verringert. Die photochemische Zersetzung von Promethazin und das resultierende Spektrum der Photoprodukte ist bei pH 7 wiederum nicht so ausgeprägt wie bei der pH 3 Untersuchungsreihe. In den Diagrammen der Abbildungen 24 und 25 ist die detektierte prozentuale Peakfläche von Promethazin und einiger Photoprodukte gegen die einzelnen Bestrahlungszeiten aufgezeichnet.

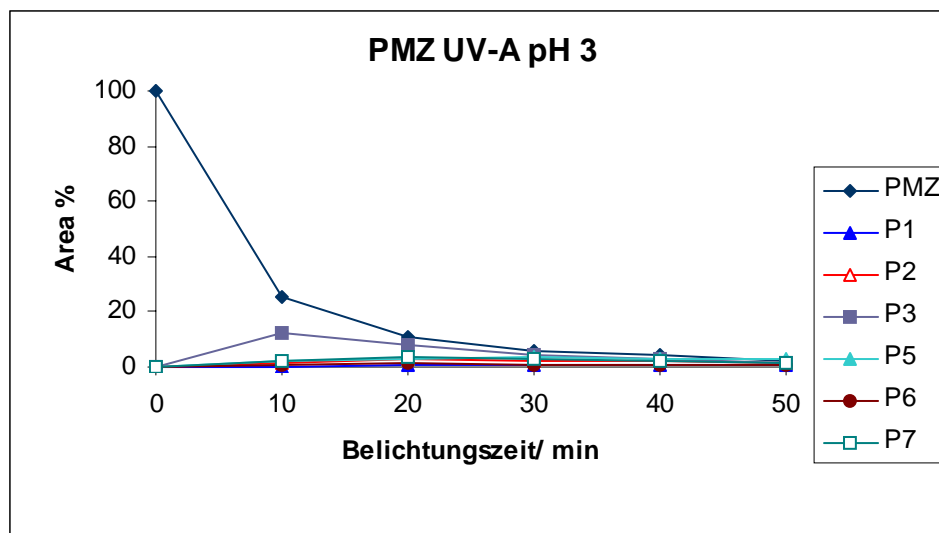


Abb. 24: Promethazinhydrochlorid bei pH 3 mit UV-A belichtet

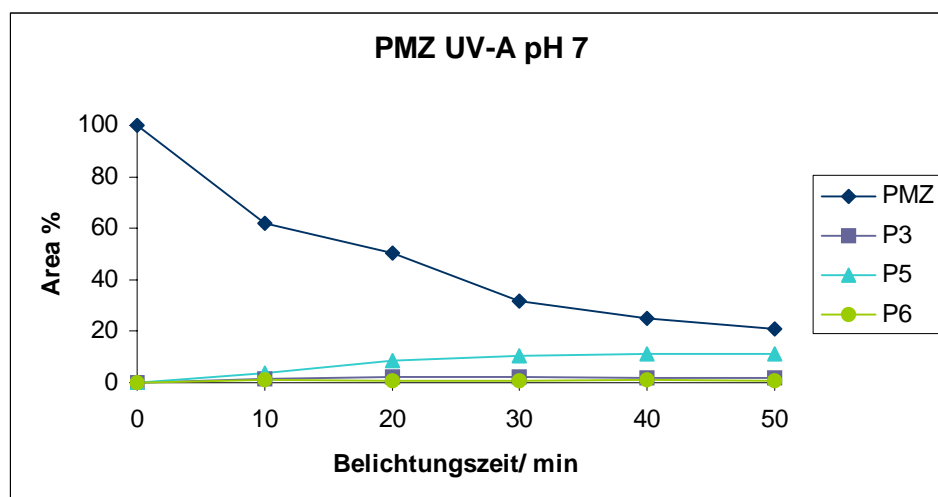


Abb. 25: Promethazinhydrochlorid bei pH 7 mit UV-A belichtet

Beim Vergleichen des kinetischen Verlaufs des photolytischen Abbaus bei den verschiedenen pH-Werten fällt auf, dass die Photostabilität des Promethazinhydrochlorids bei pH 7 höher ist als bei pH 3. Diese Tatsache wurde auch schon bei den Untersuchungen zu Chlorpromazin beobachtet. Nach der 50 min Belichtung ist bei pH 3 nur 1% des Promethazins noch nicht photochemisch umgesetzt worden. Im Vergleich dazu wurde bei der 50 min Belichtung bei pH 7 noch eine prozentuale Peakfläche von 21% detektiert.

In dem Chromatogramm in Abbildung 26 A ist Promethazin nach 10 min UV-A Belichtung bei pH 3 zu sehen. In Abbildung 26 B wurde Promethazin 10 min bei pH 7 mit UV-A Licht bestrahlt.

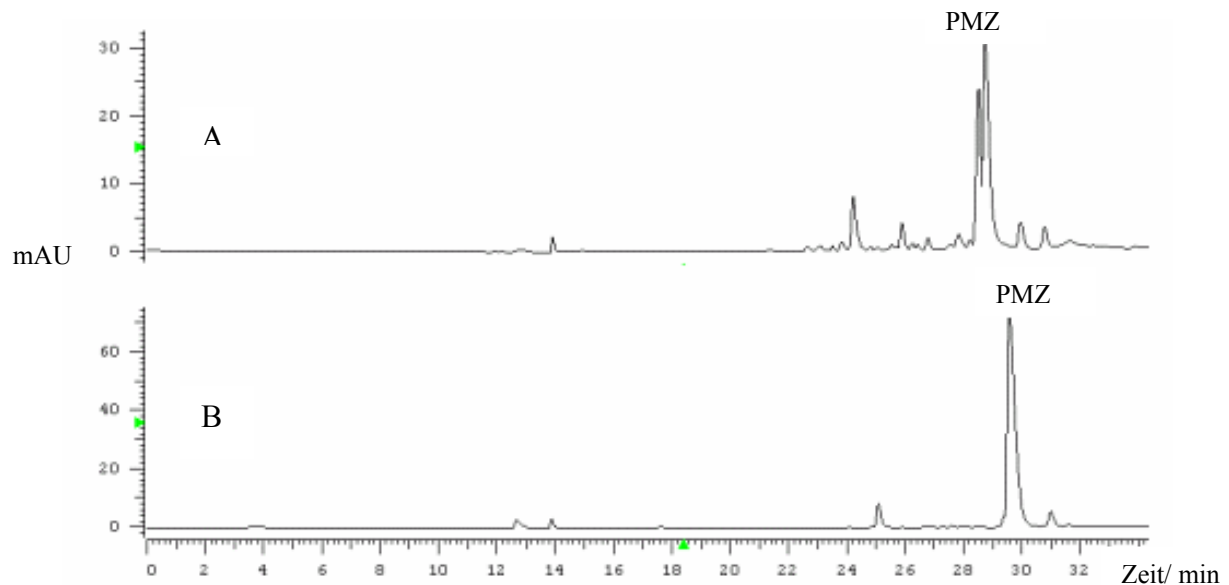


Abb. 26 A: Chromatogramm der Promethazinhydrochlorid Lösung nach 10 min UV-A Bestrahlung bei pH 3

B: Chromatogramm der Promethazinhydrochlorid Lösung nach 10 min UV-A Bestrahlung bei pH 7

Die Belichtung der Promethazinprobelösung mit einem eingestellten pH-Wert von 3 führt zu einer Vielzahl von Photoprodukten. Insgesamt sieben dieser Photoprodukte wurden in dem Diagramm in Abbildung 24 ausgewertet.

Zum Vergleich entstehen bei der Bestrahlung der Probelösung bei pH 7 wenige Photoprodukte. Drei dieser Photoprodukte wurden graphisch in Abbildung 25 ausgewertet.

3.1.10 Ergebnisse zur photochemischen Umsetzung von Promethazin mit Alanyltryptophan

In der Literatur wird die Arzneistoffgruppe der Phenothiazine als photoallergisch beschrieben. Deshalb wurde in weiterführenden Versuchen Promethazin mit dem Dipeptid Alanyltryptophan im äquimolaren Verhältnis photochemisch untersucht. Die UV-A Bestrahlungen der Untersuchungslösung wurden ebenfalls in wässrig phosphatgepufferter Lösung bei pH 3 und pH 7 durchgeführt.

In Abbildung 27 ist der photochemische Abbau von Promethazin in Gegenwart von Alanyltryptophan dargestellt. Der kinetische Kurvenverlauf der Photozersetzung von Promethazin und die entstehenden Photoprodukte sind dem Kurvenverlauf der alleinigen Bestrahlung von Promethazin in Abbildung 24 vergleichbar. Die detektierte prozentuale Peakfläche des Alanyltryptophans nimmt mit zunehmender Belichtungszeit ab. Nach 50 min Bestrahlung beträgt die Peakfläche des Alanyltryptophans noch 85% vom Ausgangswert. Bei

der alleinigen Bestrahlung von Alanyltryptophan unter sonst gleichen Bedingungen beträgt die Peakfläche nach 50 min UV-A Belichtung noch 92%.

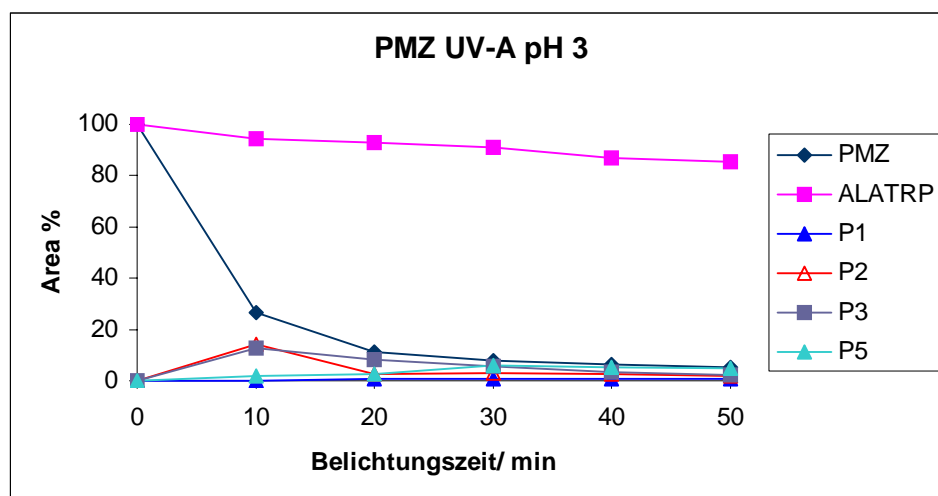


Abb. 27: Promethazinhydrochlorid in Anwesenheit von Alanyltryptophan bei pH 3 mit UV-A belichtet

In der Abbildung 28 sind zwei Chromatogramme dieser Untersuchung dargestellt, es handelt sich hierbei um die Chromatogramme der 50 min langen Belichtung von Promethazin in Ab- und Anwesenheit von Alanyltryptophan. In dem oberen Chromatogramm A wurde Promethazin ohne Alanyltryptophan belichtet und im unterem Chromatogramm B entsprechend mit dem Dipeptid. In dem unteren Chromatogramm wurde Alanyltryptophan nach einer Retentionszeit von 18 min eluiert.

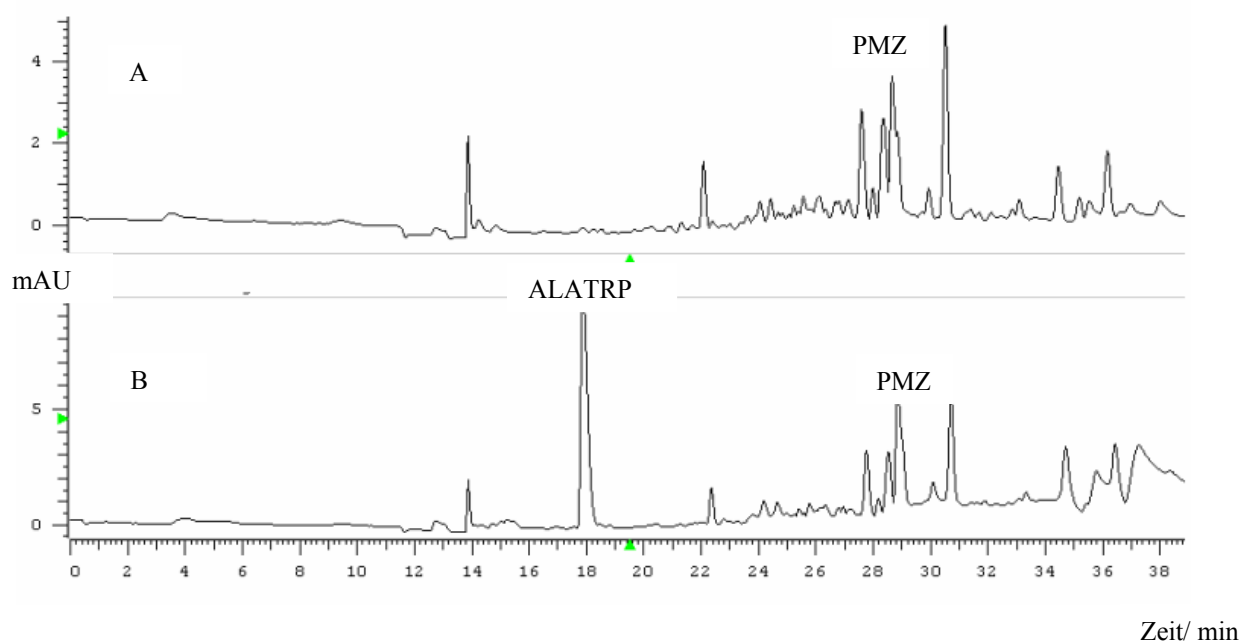


Abb. 28: (A) Promethazin bei pH 3 mit UV-A Licht 50 min belichtet

(B) Promethazin bei pH 3 mit Alanyltryptophan 50 min mit UV-A belichtet

Bei dem Vergleich der beiden Chromatogramme ist bei genauer Betrachtung kein neuer Peak zu erkennen, der ein neues Photoprodukt der beiden Edukte darstellen könnte. In dem unteren Chromatogramm, sind im hinteren Teil stark verbreiterte Peaks zu sehen, die im oberen Chromatogramm nicht erkennbar sind. Dieser Tailing-Effekt könnte aus der Anwesenheit von Alanyltryptophan resultieren.

Da die Entstehung der Photoprodukte und das Bindungsverhalten der aktiven Photozwischenprodukte auch von dem pH-Wert abhängig ist, wurde die Untersuchung bei pH 7 unter sonst gleichbleibenden Bedingungen wiederholt. In der Abbildung 29 ist der kinetische Verlauf dieser Untersuchung abgebildet.

Der Kurvenverlauf des Promethazins und die resultierenden Photoprodukte sind mit der alleinigen Bestrahlung von Promethazin vergleichbar. Auch die detektierte prozentuale Peakfläche des Alanyltryptophans nimmt mit längerer Belichtungszeit ab und weist nach 50 min Bestrahlung einen Wert von 91% auf. Bei der alleinigen Belichtung von Alanyltryptophan sind nach 50 min Belichtung 94% des Alanyltryptophans, unter identischen Reaktionsbedingungen noch nicht photochemisch umgewandelt worden (Abbildung 31).

Die statistische Auswertung (beschrieben in Kap. 3.1.8) über die Regressionsgerade der Alanyltryptophan-Kurve in Abbildung 29 ergibt, dass die Steigung der Geraden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ ungleich Null ist. Dagegen ist die Steigung der unbelichteten Alanyltryptophan Regressionsgeraden in Abbildung 30 mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ gleich Null. Beim statistischen Vergleich der Regressionsgeradensteigungen des unbestrahlten Alanyltryptophans (Abbildung 30) mit der der Steigung der Geraden des bestrahlten Alanyltryptophans in Abwesenheit von Promethazin (Abbildung 31) unterscheiden sich die Geraden signifikant. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung lassen darauf schließen, dass Alanyltryptophan bei Bestrahlung in Anwesenheit von Promethazin abgebaut wurde, da die Steigung der Geraden ungleich Null ist.

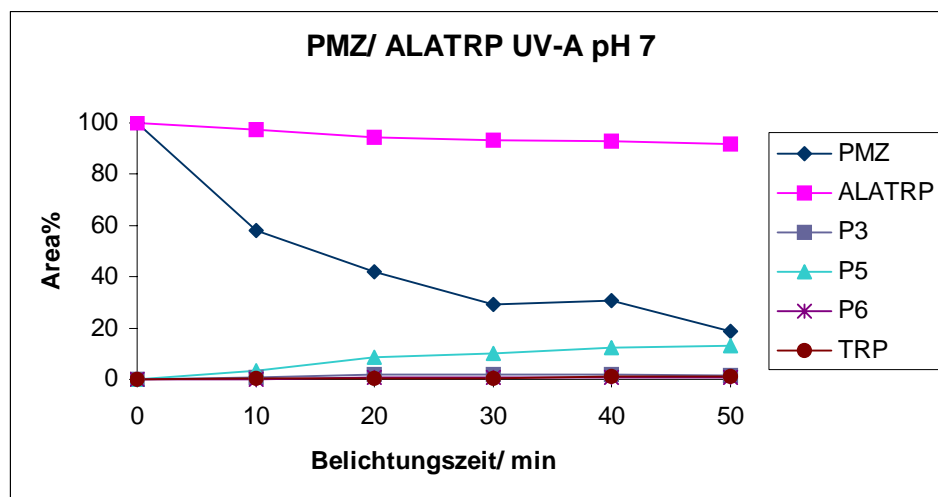


Abb. 29: Promethazinhydrochlorid in Anwesenheit von Alanyltryptophan bei pH 7 mit UV-A belichtet

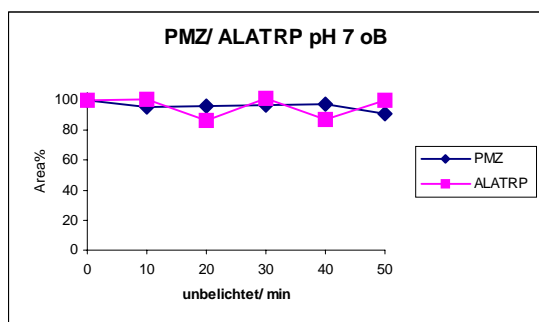


Abb. 30: PMZ/ ALATRP bei pH 7 ohne Belichtung

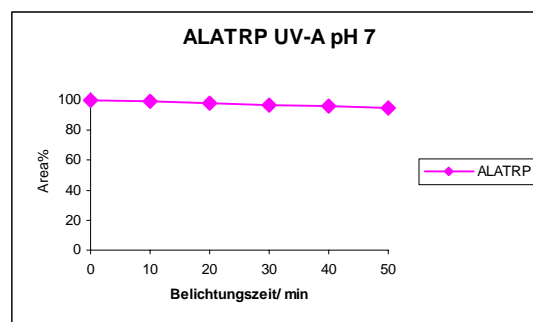


Abb. 31: ALATRP bei pH 7 mit UV-A Belichtung

Das aus Alanyltryptophan photochemisch entstandene Tryptophan, das mit einer Tryptophan-Vergleichslösung über die Retentionszeit identifiziert wurde, ist ebenfalls in dem kinetischen Diagramm (Abbildung 29) aufgezeichnet. In der folgenden Abbildung 32 sind vier Chromatogramme der Bestrahlung von Promethazin in An- und Abwesenheit von Alanyltryptophan abgebildet. Chromatogramm 1 zeigt das Chromatogramm von unbelichtetem Promethazin mit Alanyltryptophan. Die Chromatogramme der belichteten Proben wurden bei starker Vergrößerung ausgewertet. Die Chromatogramme 2 und 3 zeigen die 50 min Bestrahlung von Alanyltryptophan und Promethazin.

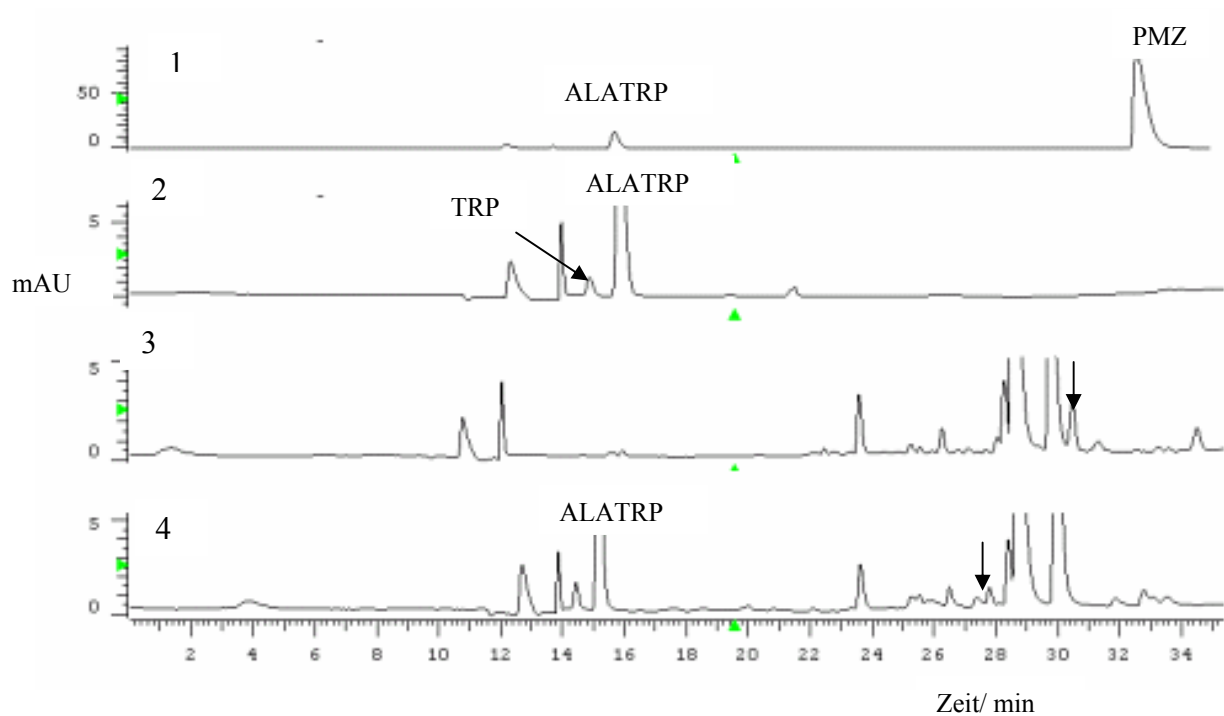


Abb.32: (1) Promethazin mit Alanyltryptophan bei pH 7 ohne UV-A Belichtung
 (2) Alanyltryptophan bei pH 7 mit UV-A 50 min belichtet
 (3) Promethazin bei pH 7 mit UV-A 50 min belichtet
 (4) Promethazin mit Alanyltryptophan bei pH 7 mit UV-A 50 min belichtet

In dem Chromatogramm 3 ist bei einer Retentionszeit von 30,3 min ein Peak eines Photoproduktes zu erkennen, der bei der gemeinsamen Bestrahlung von Promethazin und Alanyltryptophan in dem Chromatogramm 4 nicht zu beobachten ist. Dafür sind in dem Chromatogramm 4 im Bereich von 27-28 min zwei Peaks zu sehen, die in den Chromatogrammen 2 und 3 nicht zu erkennen sind. Das Photoprodukt bei 30,3 min könnte in Anwesenheit von Alanyltryptophan zu einem neuen Photoprodukt reagiert haben.

3.1.11 Vergleich der photochemischen Stabilität von Phenothiazinen

Mit den drei Phenothiazinen: Chlorpromazinhydrochlorid, Promethazinhydrochlorid, Promazinhydrochlorid wurden Photostabilitätsprüfungen durchgeführt. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die Probelösungen in äquimolaren Mengen hergestellt. Alle drei Arzneistoffe wurden in rein wässriger Lösung jeweils 0, 90, 180, 270, 360 und 450 s mit dem UV-A Niederdruckstrahler belichtet. Da die drei Arzneistoffe als Hydrochloride vorliegen, muss der pH-Wert der Probelösung dementsprechend im sauren pH Bereich liegen. In der Abbildung 33 ist der photochemische Abbau der drei Stoffe kinetisch

dargestellt. Die halblogarithmische Auswertung ergibt für die Arzneistoffe Promazin und Promethazin einen linearen Verlauf. Die Geschwindigkeitskonstanten von Promazin und Promethazin unterscheiden sich nur geringfügig. Die Geschwindigkeitskonstante für Promethazin beträgt $0,0016 \text{ s}^{-1}$ und für Promazin $0,0014 \text{ s}^{-1}$. Bei der halblogarithmischen Darstellung von Chlorpromazin weist die Kurve bei 90 s eine Knickstelle auf. Die Kurve fällt bis 90 s steil ab, danach fällt die Kurve weiter linear ab und die Reaktionsgeschwindigkeit verlangsamt sich (s. Anhang Abb. 4).

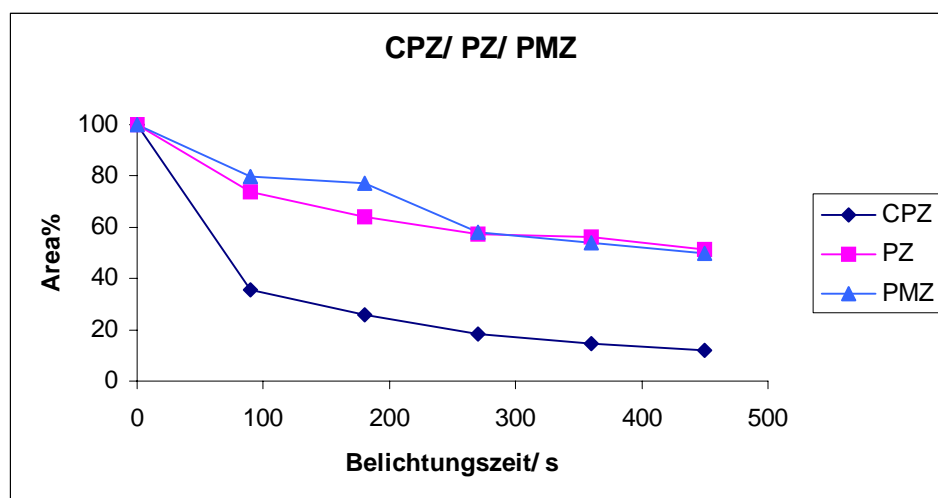


Abb. 33: Bestrahlung der einzelnen äquimolaren Lösungen von Chlorpromazinhydrochlorid, Promethazinhydrochlorid, Promazinhydrochlorid mit UV-A Licht

3.1.12 Zusammenfassung

Aus den Untersuchungsergebnissen geht hervor, dass die Photostabilität von Phenothiazinen stark vom pH-Wert abhängig ist. Mit abnehmendem pH-Wert werden die Phenothiazine rascher in ihre Photoprodukte umgewandelt. In ungepufferter wässriger Lösung wurde beim Vergleich der Photostabilitäten von Chlorpromazin, Promethazin und Promazin deutlich, dass Chlorpromazin die größte Photolysegeschwindigkeitskonstante aufweist und am schnellsten von den drei untersuchten Phenothiazinen unter Bestrahlung von UV-A Licht abgebaut wurde. Promethazin und Promazin werden nahezu gleich schnell abgebaut und weisen fast gleiche Werte in der Geschwindigkeitskonstante auf. Darüber hinaus hängt auch die Art der resultierenden Photoprodukte vom pH-Wert ab.

Beim Screening auf mögliche Reaktionen mit Biomolekülen wurde für Chlorpromazin eine Reaktion mit GMP bei pH 7 unter Belichtung von UV-A Licht beobachtet. Die Reaktivität der

Photoprodukte konnte bei pH 3 nicht nachgewiesen werden. Außerdem konnte die Behauptung, dass zwischen der C-2 Position des dechlorierten Chlorpromazins und der C-8 Position des Purins eine kovalente Bindung entsteht, nicht bestätigt werden.

Darüber hinaus wurde bei der UV-A Belichtung von Promethazin in Anwesenheit von dem Dipeptid Alanyltryptophan eine Reaktion beobachtet. Auch diese Reaktion ist vom pH-Wert abhängig. Bei pH 7 wurden im Chromatogramm nach der Belichtung von Promethazin und Alanyltryptophan weitere Peaks identifiziert, die bei der alleinigen Belichtung von Promethazin im Chromatogramm nicht ersichtlich waren. Bei pH 3 hingegen konnte durch die Betrachtung der Chromatogramme keine Wechselwirkung zwischen Promethazin und dem Dipeptid festgestellt werden.

Mit dem entwickelten HPLC online System konnte durch die Reaktionen der Phenothiazine mit GMP und Alanyltryptophan unter Belichtung mit UV-A Licht im wässrigen Milieu die Phototoxizität und Photoallergenität dieser Substanzklasse bestätigt werden.

3.2 Untersuchungen zur photochemischen Stabilität von Hydrochlorothiazid und dessen photochemischer Reaktivität gegenüber Biomolekülen

3.2.1 Einführung

Hydrochlorothiazid (Abbildung 34) gehört zur Arzneistoffgruppe der Thiazide und wird als Diuretikum eingesetzt.

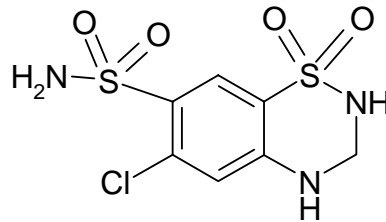


Abb. 34: Struktur Hydrochlorothiazid

Die Substanz hat schwach saure Eigenschaften, die Angaben schwanken zwischen $pK_{s1} = 8,8$; $8,6$; $9,5$; $pK_{s2} = 10,4$; $9,9$; $11,3$ (Florey). In neutraler Lösung weist die Substanz zwei Absorptionsmaxima bei 271 nm und 318 nm auf. Sowohl in saurer und alkalischer Lösung tritt reversible Hydrolyse ein, wobei in alkalischer Lösung die Rückreaktion nur bedingt abläuft. Bei zunehmender Alkalität der Lösung reagiert der entstandene Formaldehyd in einer Cannizzaro-Reaktion zu Ameisensäure. Das Stabilitätsoptimum von Hydrochlorothiazid liegt bei pH 7,2.

3.2.2 Photochemischer Abbau von Hydrochlorothiazid

Aufgrund von Photosensibilisierung der Haut nach Einnahme von Hydrochlorothiazid, die in der Literatur beschrieben wurde, untersuchten Tamat und Moore (Tamat, Moore, 1983) die Photostabilität von Hydrochlorothiazid. Hydrochlorothiazid wirkt auf zwei verschiedenen Wegen als Photosensitizer, einmal über das freie Radikal und zum anderen über den aktivierten Singulett-Sauerstoff. Das in 6-Stellung substituierte Chlor ist photochemisch instabil. Nach Untersuchungen (Jose, 1979) scheint die Mutagenität von Hydrochlorothiazid im Zusammenhang mit der Dehalogenierung zu stehen. Unter Bestrahlung kommt es vor allem zur photochemisch induzierten Hydrolyse sowie Dehalogenierung (Moore, Tamat, 1980) von Hydrochlorothiazid.

So wird Hydrochlorothiazid bei Bestrahlung im nahen UV Bereich in wässriger und methanolischer Lösung in photochemische Zerfallsprodukte umgewandelt. Bei der Photolyse wird das substituierte -Cl durch -H, -OR und -ROH ersetzt. Die Hydrolyse des Thiazinrings verläuft überlagert mit der Dechlorierung. In Gegenwart von Sauerstoff ist die Reaktion gehemmt. Der Mechanismus der Photolyse verläuft über ein radikalisches Kation. Das eigentliche Hydrolyseprodukt 5-Chlor-2,4-disulfonamid-anilin kann ebenfalls über Entstehung eines Radikalkations dechloriert werden (Abbildung 35).

Revelle (Revelle et al., 1997) fand dagegen keine Hydrolyseprodukte von Hydrochlorothiazid, sondern hauptsächlich Dehalogenierungsprodukte.

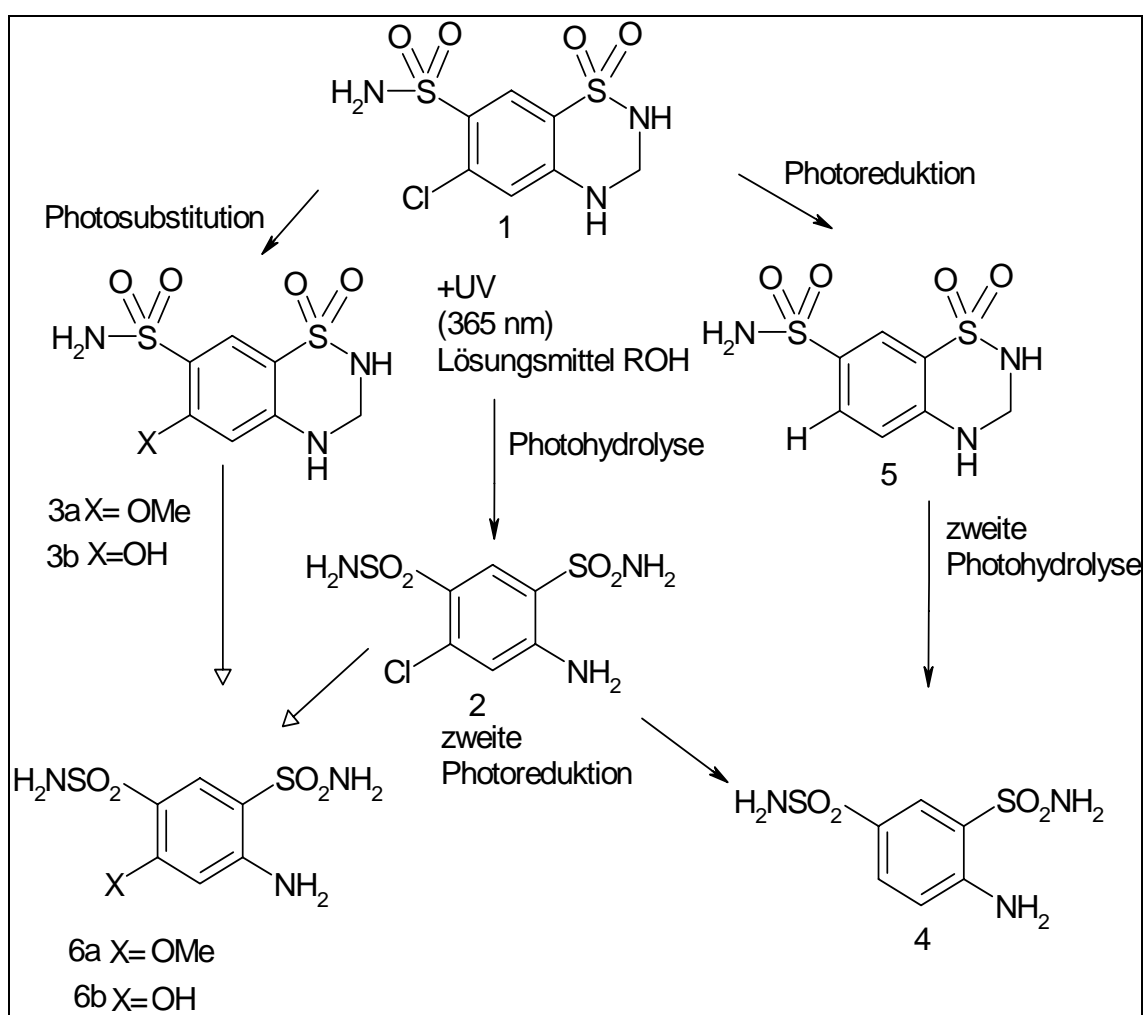


Abb. 35: Photochemischer Abbau von Hydrochlorothiazid in methanolischer Lösung

3.2.3 Phototoxische Reaktionen von Hydrochlorothiazid

Die Phototoxizität von Hydrochlorothiazid wurde in menschlichen in vivo Studien beschrieben (Diffey and Langtry, 1989). Die subzellulären Targets des photosensibilisierten Hydrochlorothiazids sind bis heute nicht bekannt. In verschiedenen photochemischen Untersuchungen zu Hydrochlorothiazid und *Candida albicans* (Johnson et al., 1986), Photohämolyse (Han et al. 2000) und Lipidperoxidation (Matsuo et al., 1986) wurden nur negative oder schwache Reaktionen beobachtet. Andererseits zeigten Hydrochlorothiazid und andere Diuretika im Comet Assay Test starke phototoxische Aktivität (Selvaag et al., 2002).

3.2.4 Chromatographische Bedingungen der Hydrochlorothiazid Untersuchungen

Die Bestrahlung und chromatographische Trennung des Hydrochlorothiazids in An- und Abwesenheit der Biomoleküle GMP und Alanyltryptophan erfolgte in pH 3 und pH 7 phosphatgepufferter (5 mmol/l^{-1}) wässriger Lösung. Die Pumpe 1 wurde isokratisch mit dem jeweiligen Puffer mit einem Fluss von 1 ml/ min betrieben. Pumpe 2 wurde mit einem Acetonitril/ Puffer Gradienten programmiert (s. Tab. 2). Nach der Belichtung im Photoreaktor wurden das Hydrochlorothiazid und die Biomoleküle auf der Säule 1 angereichert. Nach 2,9 min wurde die Säulenschaltung von der Load in die Injekt Position umgeschaltet, diese Schaltzeit wurde in Vorversuchen ermittelt. Nachdem die angereicherten Stoffe back-flush von der Säule 1 hinuntergespült wurden, erfolgte die chromatographische Trennung über die Säule 2 mit anschließender Detektion.

	Zeit (min)	0	2.9	26.0	36.0
Pumpe 1	Puffer%	100	100	100	100
Pumpe 2	Puffer%	100	100	75	50
	Acetonitril%	0	0	25	50

Tab. 2: Gradientenprofil und Schaltplan der beiden Pumpen für die Hydrochlorothiazid/ GMP/ ALATRP/ TRP Untersuchung

Das Gradientenprofil der Pumpe 2 wurde bei den Untersuchungen zu den DNA-Einzelsträngen geringfügig verändert. In den ersten 10 min wurde die Pumpe 2 mit einem 1/99 Verhältnis von Acetonitril und Puffer programmiert. Nach 10 min wurde der Acetonitrilanteil bis 36 min auf 50% erhöht. Darüber hinaus wurden die Ventile der Säulenschaltung nach 3,0 min umgeschaltet (s. Tab. 3).

	Zeit (min)	0	3.0	26.0	36.0
Pumpe 1	Puffer%	100	100	100	100
Pumpe 2	Puffer%	99	99	99	75
	Acetonitril%	1	1	1	25

Tab. 3: Gradientenprofil und Schaltplan der beiden Pumpen für die Hydrochlorothiazid/ DNA-Untersuchung

3.2.5 Ergebnisse der Photostabilitätsuntersuchungen von Hydrochlorothiazid

In den Diagrammen der Abbildungen 36 und 37 sind die Ergebnisse der UV-A Belichtung von Hydrochlorothiazid bei pH 3 und pH 7 abgebildet. Dargestellt sind die prozentualen Peakflächen des Hydrochlorothiazids und zwei seiner Photoprodukte gegen die Belichtungszeit mit der UV-A Lampe.

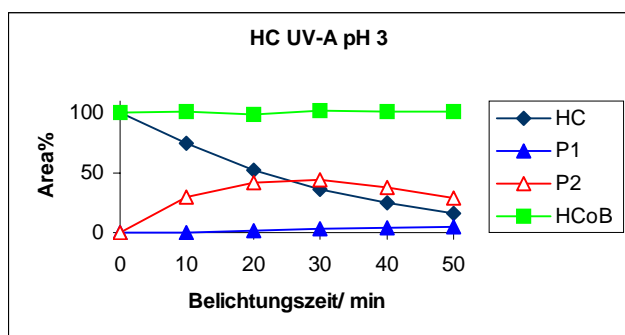


Abb.36: Photozersetzung einer wässrigen Hydrochlorothiazid Lösung gepuffert bei pH 3 und Belichtung mit der UV-A Lampe

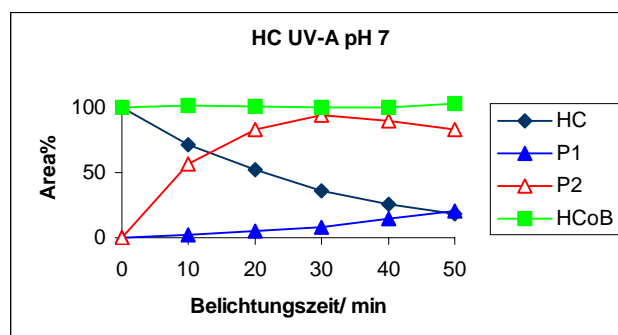


Abb.37: Photozersetzung einer wässrigen Hydrochlorothiazid Lösung gepuffert bei pH 7 und Belichtung mit der UV-A Lampe

Mit zunehmender Belichtungsdauer wird die detektierte Signalfläche des Hydrochlorothiazids immer kleiner. Bei pH 3 sind nach 50 min Bestrahlung nur noch 15% des Arzneistoffes nicht umgesetzt worden. Die Peakfläche des unbekanntes Photoproduktes 2 steigt bis zu der 30 min Belichtung stetig an, fällt aber bei 40 und 50 min Belichtung wieder ab. Dieses Verhalten kann darauf hindeuten, dass das Photoprodukt 2 nicht photostabil ist und in weitere Photoprodukte umgesetzt wurde.

Bei der Kontrolluntersuchung wurde das Hydrochlorothiazid 0, 10, 20, 30, 40 und 50 min lang im Photoreaktor ohne Belichtung angehalten. Auch nach 50 min Standzeit im

Photoreaktor wurde das Hydrochlorothiazid weder bei pH 3 noch bei pH 7 hydrolysiert, die Peakfläche lag bei allen sechs Bestimmungen bei 100%.

3.2.6 Photochemische Untersuchungen zu Hydrochlorothiazid und verschiedenen Biomolekülen

In weiteren Versuchen wurde Hydrochlorothiazid in Gegenwart von biologischen Molekülen mit dem Ziel bestrahlt, mögliche phototoxische und photoallergische Reaktionen sichtbar zu machen. Dabei wurden zur Untersuchung von möglichen Wechselwirkungen von Hydrochlorothiazid mit Proteinen in Gegenwart von Licht die Aminosäure Tryptophan und das Dipeptid Alanyltryptophan verwendet. Als Modellsubstanz für die DNA wurde die Base Guanosinmonophosphat für die Untersuchungen verwendet. Außerdem wurden DNA Oligonukleotide als antisense und sense Einzelstränge eingesetzt.

3.2.7 Ergebnisse zur photochemischen Umsetzung von Hydrochlorothiazid mit 5-Guanosinmonophosphat unter Variation des pH-Wertes

Zuerst wurde Hydrochlorothiazid in Anwesenheit von GMP in phosphatgepufferter wässriger Lösung auf pH 3 eingestellt und 0, 10, 20, 30, 40 und 50 min mit UV-A Licht bestrahlt. Zum Vergleich wurde die Untersuchung ohne Belichtung wiederholt. Auch das GMP wurde in Abwesenheit von Hydrochlorothiazid mit und ohne Belichtung untersucht.

Die Graphik in Abbildung 38 zeigt die Ergebnisse der Belichtung von Hydrochlorothiazid zusammen mit GMP. Der Kurvenverlauf des photochemischen Abbaus von Hydrochlorothiazid in Gegenwart von GMP entspricht dem Verlauf der alleinigen Bestrahlung von Hydrochlorothiazid. Der Kurvenverlauf der entstehenden Photoprodukte P1 und P2 ist ebenfalls mit der Abbildung 36 vergleichbar. Die detektierte Signalfläche des GMPs nimmt hingegen bei zunehmender Belichtungszeit kontinuierlich ab und erreicht nach 50 min Bestrahlungszeit einen Peakflächenanteil von 95%.

Die statistische Auswertung (beschrieben in Kap. 3.1.8) über die Regressionsgerade der GMP-Kurve in Abbildung 38 ergibt, dass die Steigung der Regressionsgeraden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ ungleich Null ist. Die Steigung der Regressionsgerade der unbelichteten GMP-Kurve in Abbildung 39 ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ gleich Null. Vergleicht man die Steigung der Regressionsgeraden des GMPs in Abbildung 38 mit der Steigung der Regressionsgeraden des unbelichteten GMPs in Abbildung

39, so unterscheiden sich die beiden Steigungen signifikant. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung lassen darauf schließen, dass GMP bei Bestrahlung in An- und Abwesenheit von Hydrochlorothiazid geringfügig abgebaut wurde, da die Steigung der Geraden ungleich Null ist. Bei der Auswertung der Chromatogramme konnten aber keine neuen Photoprodukte, die aus dem abgebauten GMP resultieren könnten, identifiziert werden.

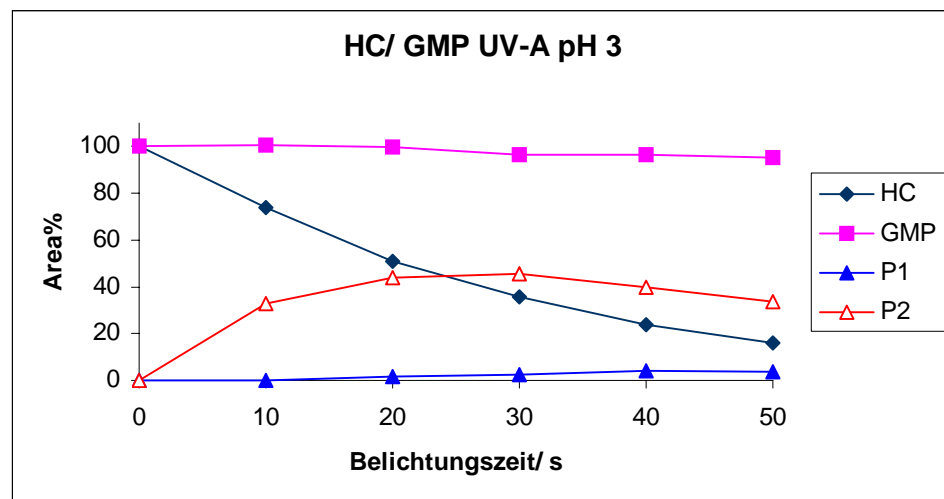


Abb. 38: Photozersetzung von HC/ GMP bei pH 3 und UV-A Belichtung

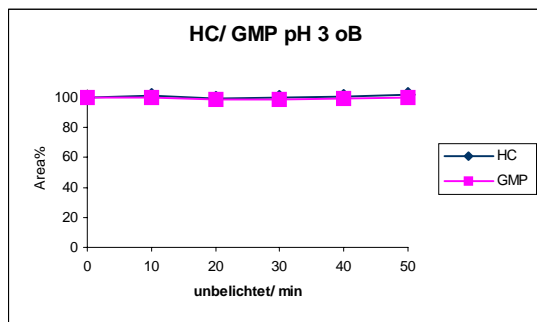


Abb. 39: HC/ GMP bei pH 3 unbelichtet

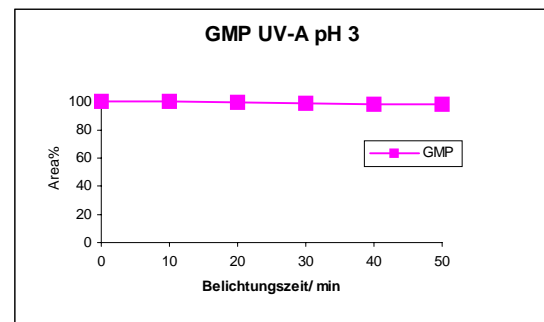


Abb. 40: GMP bei pH 3 mit UV-A belichtet

Da die Reaktion mit Biomolekülen vom pH-Wert abhängig ist, wurde die gesamte Untersuchung in phosphatgepufferter wässriger Lösung bei pH 7 wiederholt. Der Kurvenverlauf des photochemischen Abbaus des Hydrochlorothiazids und die Entstehung der Photoprodukte in Anwesenheit von GMP ist ebenfalls mit der alleinigen Belichtung von Hydrochlorothiazid vergleichbar. Die detektierte Peakfläche des GMP ist über den gesamten Belichtungszeitraum leicht ansteigend. Bei der Auswertung der Chromatogramme wurde ersichtlich, dass unter dem GMP-Peak ein Photoprodukt des Hydrochlorothiazids liegt und es

aus diesem Grund zu einer prozentualen Erhöhung des GMP Peaks kommt. In den Chromatogrammen konnten wie bei pH 3 keine weiteren Reaktionsprodukte identifiziert werden.

3.2.8 Ergebnisse zur photochemischen Umsetzung von Hydrochlorothiazid mit Tryptophan

Hydrochlorothiazid wurde in Anwesenheit von Tryptophan in einer auf pH 3 eingestellten phosphatgepufferten wässrigen Lösung mit UV-A Licht belichtet (s. Abbildung 41). Der kinetische Verlauf des photochemischen Abbaus von Hydrochlorothiazid und die resultierenden Photoprodukte sind mit der alleinigen Bestrahlung von Hydrochlorothiazid vergleichbar (s. Abbildung 36). Dieses wird auch durch die fast identischen Photolysegeschwindigkeitskonstanten belegt. Für die alleinige Belichtung von Hydrochlorothiazid bei pH 3 wurde eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von $0,0367 \text{ s}^{-1}$ und für die Belichtung von Hydrochlorothiazid in Anwesenheit von Tryptophan wurde eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von $0,0355 \text{ s}^{-1}$ ermittelt (s. Anhang Abb. 5). In der Abbildung 42 ist die unbelichtete Kontrolluntersuchung von Hydrochlorothiazid in Anwesenheit von Tryptophan graphisch dargestellt. Tryptophan selbst wurde ebenfalls durch UV-A Strahlung photodegradiert (Abbildung 43). Die detektierten Peakflächen des Tryptophans nehmen kontinuierlich ab und erreichen nach der 50 min Bestrahlung einen Wert von 97%.

Die statistische Auswertung (beschrieben in Kap. 3.1.8) über die Regressionsgerade der Tryptophan-Kurve in Abbildung 41 ergibt, dass die Steigung der Regressionsgeraden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ ungleich Null ist. Die Steigung der unbelichteten Tryptophan-Regressionsgeraden in Abbildung 42 ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ gleich Null. Vergleicht man die Steigung der Regressionsgeraden des Tryptophans in Abbildung 41 mit der Steigung der Regressionsgeraden des unbelichteten Tryptophans in Abbildung 42, so unterscheiden sich die beiden Steigungen signifikant. Beim statistischen Vergleich der Regressionsgeradensteigung des unbestrahlten Tryptophans (Abbildung 42) mit der Regressionsgeradensteigung des bestrahlten Tryptophans in Abwesenheit von Hydrochlorothiazid (Abbildung 43) unterscheiden sich die Steigungen der Regressionsgeraden ebenfalls signifikant. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung lassen darauf schließen, dass Tryptophan bei Bestrahlung in An- und Abwesenheit von Hydrochlorothiazid abgebaut wurde, da die Steigung der Regressionsgeraden ungleich Null

ist. Tryptophan wird jedoch in Anwesenheit von Hydrochlorothiazid sehr viel schneller abgebaut, da der Wert der Steigung signifikant größer ist als bei der Belichtung von Tryptophan in Abwesenheit von Hydrochlorothiazid.

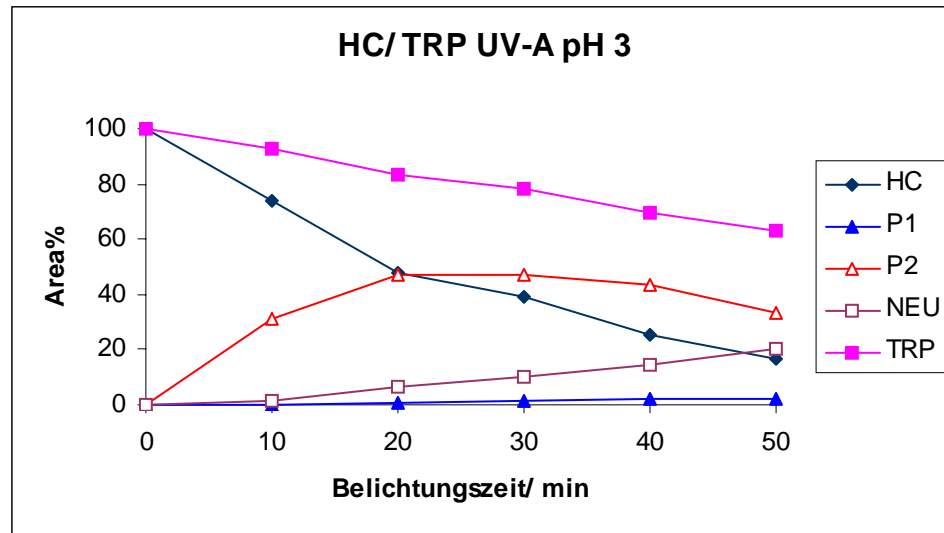


Abb. 41: Photozersetzung von HC/ TRP bei pH 3 und UV-A Belichtung

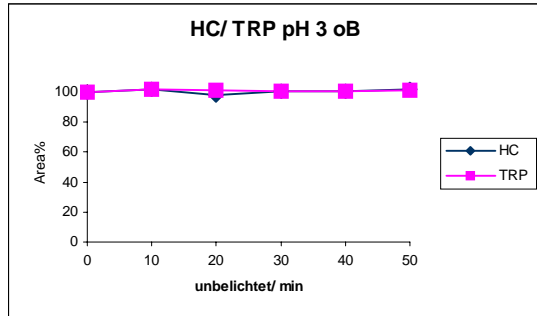


Abb. 42: HC/ TRP bei pH 3 unbelichtet

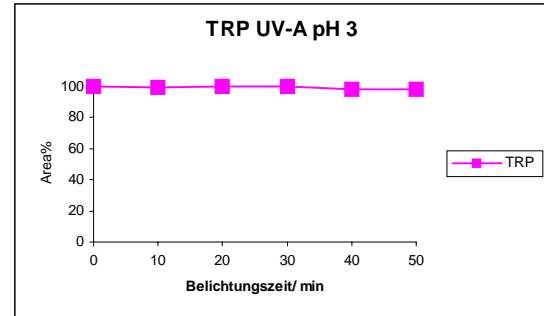


Abb. 43: TRP bei pH 3 mit UV-A belichtet

In den Chromatogrammen dieses Versuches wurde außerdem ein neuer Peak identifiziert, der möglicherweise ein Photoprodukt des photochemisch degradierten Tryptophans darstellt. Denn die Fläche dieses Peaks (NEU) steigt etwa im gleichen Maße an wie der abfallende Kurvenverlauf des Tryptophans.

In der folgenden Graphik (Abbildung 44) sind vier Chromatogramme der Untersuchungsreihe zu Hydrochlorothiazid und Tryptophan abgebildet.

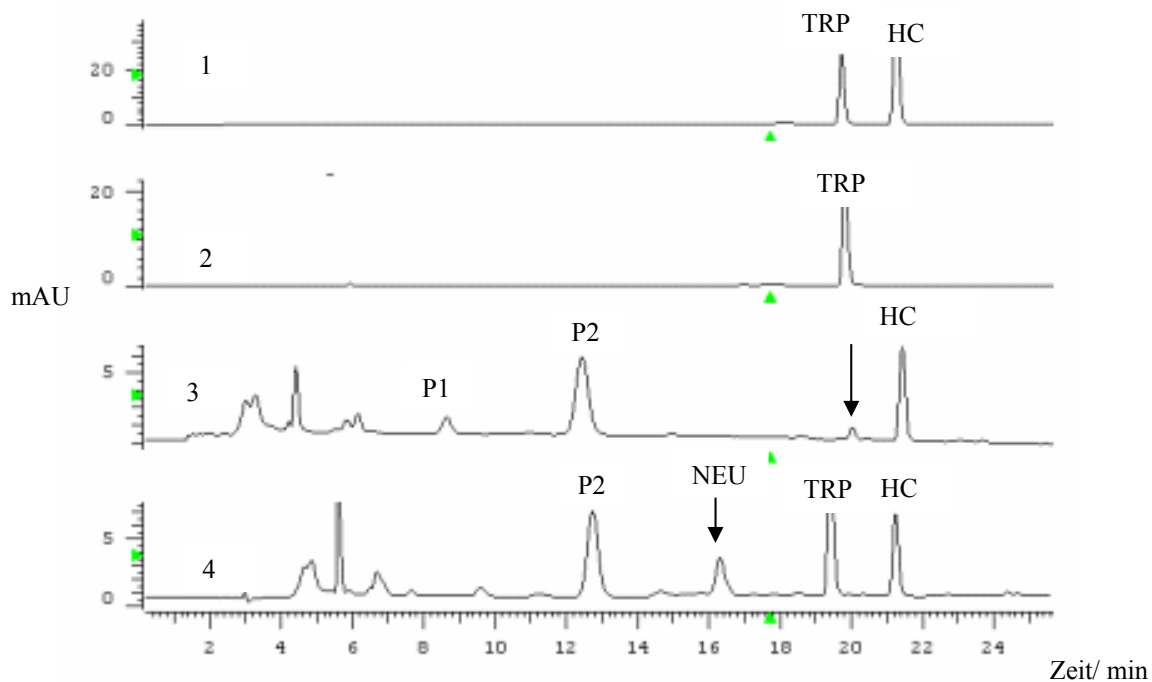


Abb. 44: (1) Hydrochlorothiazid mit Tryptophan bei pH 3 ohne UV-A Belichtung
 (2) Tryptophan bei pH 3 mit UV-A 50 min belichtet
 (3) Hydrochlorothiazid bei pH 3 mit UV-A 50 min belichtet
 (4) Hydrochlorothiazid mit Tryptophan bei pH 3 mit UV-A 50 min belichtet

Das Chromatogramm 1 wurde ohne Belichtung und ohne Standzeit im Photoreaktor aufgenommen. Man kann zwei gut aufgetrennte Peaks von Hydrochlorothiazid und Tryptophan erkennen. Chromatogramm 2 zeigt die 50 min Belichtung von Tryptophan in Abwesenheit von Hydrochlorothiazid. Photoprodukte des Tryptophan sind nur nach stärkerer Vergrößerung des Chromatogramms zu sehen. Chromatogramm 4 stellt die 50 min lange Belichtung von Hydrochlorothiazid in Gegenwart von Tryptophan dar. In dem Chromatogramm ist deutlich das neue Photoprodukt mit einer Retentionszeit von 16,3 min zu erkennen. Dieses Photoprodukt ist weder bei der alleinigen Belichtung von Tryptophan noch bei der alleinigen Belichtung von Hydrochlorothiazid (Chromatogramm 3) zu identifizieren. Andererseits ist im Chromatogramm 3 bei der alleinigen Bestrahlung von Hydrochlorothiazid ein weiteres Photoprodukt mit einer Retentionszeit von 20 min zu sehen, das aber in den anderen Chromatogrammen nicht auftaucht.

3.2.9 Ergebnisse zur photochemischen Umsetzung von Hydrochlorothiazid mit Alanyltryptophan

Aufgrund der Resultate der Untersuchungen zu Hydrochlorothiazid/ Tryptophan, die im vorangegangenen Kapitel beschrieben wurden, haben sich weitere Überlegungen zu möglichen photochemischen Reaktionen zwischen Hydrochlorothiazid und komplexeren Peptiden ergeben. Es sollte untersucht werden wie sich die Photoaktivierung von Hydrochlorothiazid auf eine Peptidbindung auswirkt. Als Modellpeptid wurde das Dipeptid Alanyltryptophan eingesetzt.

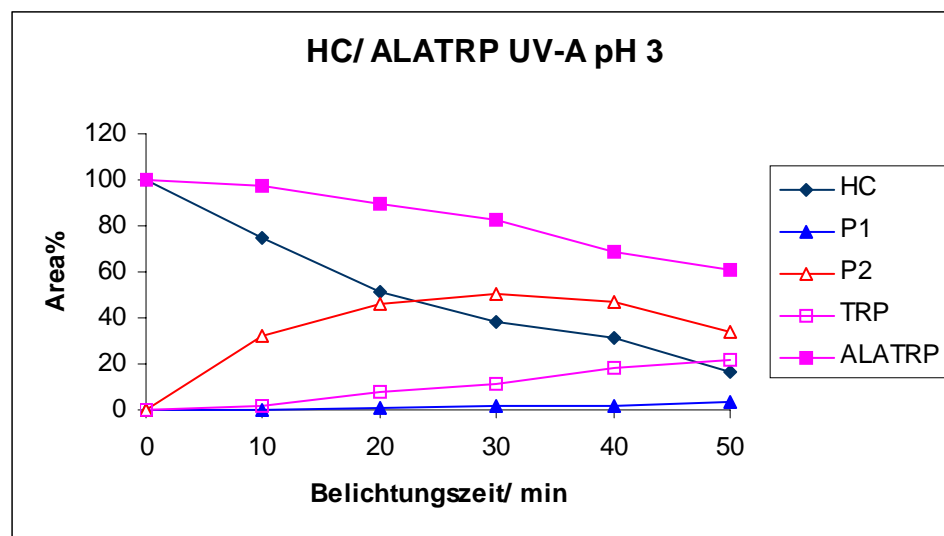


Abb. 45: Photozersetzung von HC/ ALATRP bei pH 3 und UV-A Belichtung

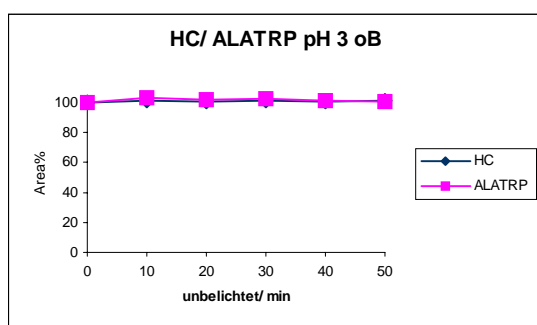


Abb. 46: HC/ ALATRP bei pH 3 unbelichtet

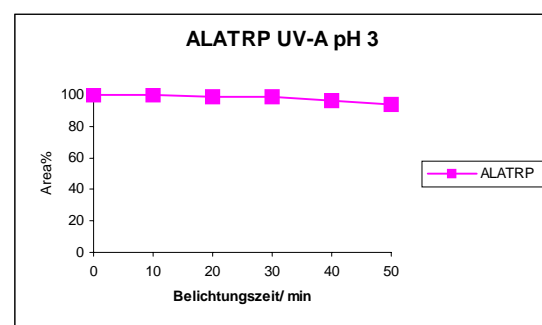


Abb. 47: ALATRP bei pH 3 mit UV-A belichtet

In Abbildung 45 ist der photochemische Abbau von Hydrochlorothiazid in Anwesenheit von Alanyltryptophan dargestellt. Der kinetische Verlauf von Hydrochlorothiazid und der Photoprodukte P1 und P2 ist mit den vorangegangenen Versuchen vergleichbar (Abbildung

36). Die prozentual detektierte Peakfläche des Alanyltryptophans nimmt mit zunehmender Belichtungsdauer ab und erreicht nach der 50 min UV-A Bestrahlung noch 60%. Ein neu entstandenes Photoprodukt wurde mit Hilfe einer Tryptophan Vergleichslösung über die Retentionszeit als Tryptophan identifiziert. Mit zunehmender Belichtungszeit entsteht eine größere Menge an Tryptophan, nach 50 min UV-A Bestrahlung beträgt die detektierte Peakfläche 21%. In der Abbildung 46 ist die unbelichtete Untersuchung zu Hydrochlorothiazid in Anwesenheit von Alanyltryptophan dargestellt und in Abbildung 47 ist die alleinige Belichtung von Alanyltryptophan mit UV-A Licht abgebildet. Es ist zu beobachten, dass Alanyltryptophan auch ohne Anwesenheit von Hydrochlorothiazid photodegradiert wurde. Die gemessene Peakfläche nimmt mit längeren Bestrahlungszeiten langsam ab und die prozentuale Peakfläche erreicht bei der längsten Bestrahlung einen Wert von 93%.

Die statistische Auswertung (beschrieben in Kap. 3.1.8) über die Regressionsgerade der Kurve des Alanyltryptophans in Abbildung 45 ergibt, dass die Steigung der Regressionsgeraden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ ungleich Null ist. Die Steigung der Regressionsgeraden der unbelichteten Alanyltryptophan Kurve in Abbildung 46 ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ gleich Null. Vergleicht man die Steigung der Regressionsgeraden der Alanyltryptophan-Kurve in Abbildung 45 mit der Steigung der Regressionsgeraden des unbelichteten Alanyltryptophans in Abbildung 46, so unterscheiden sich die beiden Steigungen signifikant. Beim statistischen Vergleich der Regressionsgeradensteigung des unbestrahlten Alanyltryptophans (Abbildung 46) mit der Regressionsgeraden des bestrahlten Alanyltryptophans in Abwesenheit von Hydrochlorothiazid (Abbildung 47) unterscheiden sich die Steigungen der Regressionsgeraden ebenfalls signifikant. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung lassen darauf schließen, dass Alanyltryptophan bei Bestrahlung in An- und Abwesenheit von Hydrochlorothiazid abgebaut wurde, da die Steigung der Regressionsgeraden ungleich Null ist. Alanyltryptophan wurde jedoch in Anwesenheit von Hydrochlorothiazid sehr viel schneller abgebaut, da der Wert der Steigung signifikant größer ist als bei der Belichtung von Alanyltryptophan in Abwesenheit von Hydrochlorothiazid.

Die Abbildung 48 zeigt vier Chromatogramme dieser Untersuchung. In Chromatogramm 1 wurde die Probelösung, bestehend aus Hydrochlorothiazid und Alanyltryptophan ohne Belichtung und ohne Standzeit im Photoreaktor chromatographiert.

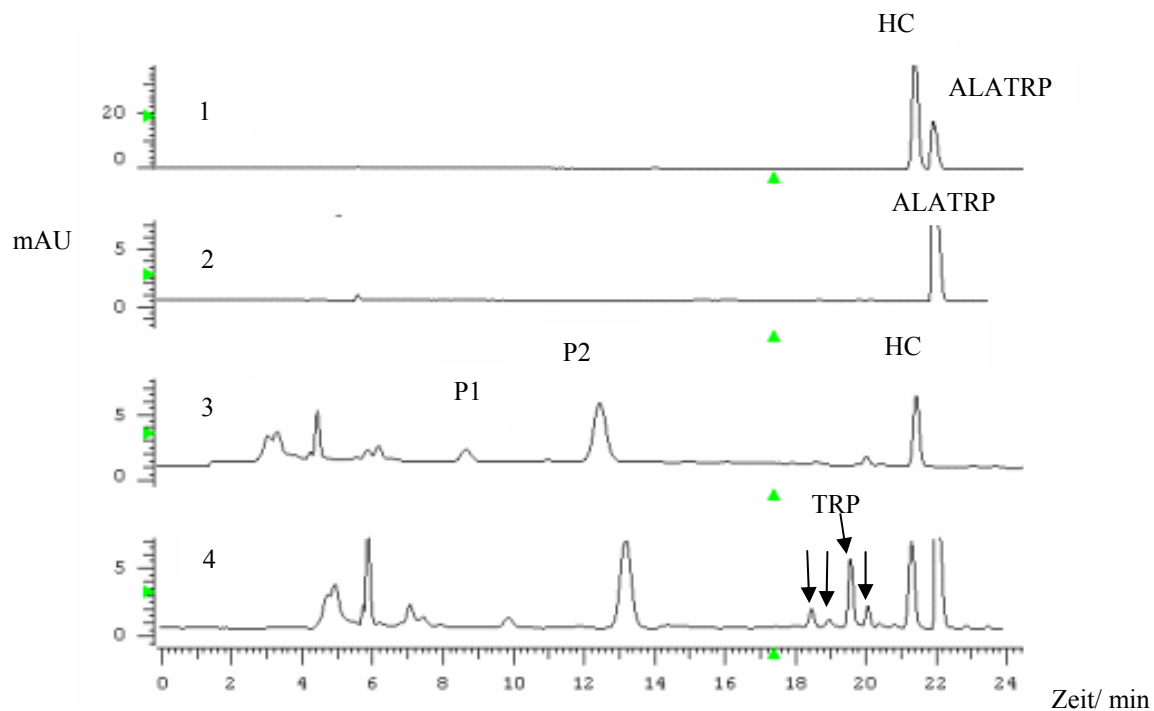


Abb. 48: (1) Hydrochlorothiazid und Alanyltryptophan ohne UV-A Belichtung
 (2) Alanyltryptophan bei pH 3 mit UV-A 50 min belichtet
 (3) Hydrochlorothiazid bei pH 3 mit UV-A 50 min belichtet
 (4) Hydrochlorothiazid mit Alanyltryptophan bei pH 3 mit UV-A 50 min belichtet

Die beiden Stoffe verfügen über ähnliche chromatographische Eigenschaften und die Retentionszeiten liegen nah beieinander. Das Chromatogramm 2 zeigt die 50 min Belichtung von Alanyltryptophan. Außer dem Alanyltryptophan-Peak können noch einige weitere Peaks der resultierenden Photoprodukte beobachtet werden. Im Chromatogramm 3 ist die alleinige Belichtung von Hydrochlorothiazid mit UV-A Licht über eine Dauer von 50 min zu sehen. Das Chromatogramm 4 zeigt die 50 min Belichtung von Hydrochlorothiazid in Anwesenheit von Alanyltryptophan. Beim Vergleich der vier Chromatogramme ist festzustellen, dass bei der Belichtung von Hydrochlorothiazid in Anwesenheit von Alanyltryptophan vier Peaks von Photoprodukten zu sehen sind, die in den anderen Chromatogrammen nicht zu beobachten sind. Eines dieser Photoprodukte wurde als Tryptophan über eine Referenzlösung identifiziert. Die Peptidbindung des Dipeptids wurde aufgrund des entstandenen Tryptophans folglich durch das photoaktivierte Hydrochlorothiazid gespalten.

Die Untersuchungsreihe wurde bei pH 7 wiederholt. Da aber die chromatographischen Trenneigenschaften sehr von pH-Wert Änderungen abhängig sind, konnte Tryptophan unter diesen Bedingungen nicht mehr von Alanyltryptophan getrennt werden. Eine genaue Auswertung war unter diesen Bedingungen nicht möglich.

3.2.10 Ergebnisse zur photochemischen Umsetzung von Hydrochlorothiazid mit Alanyltryptophan und 5-Guanosinmonophosphat

In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, inwieweit sich eine mögliche Photoaktivierung des Dipeptids Alanyltryptophan durch das Hydrochlorothiazid auf die DNA-Base GMP auswirkt. Da bei der Untersuchung von GMP und Hydrochlorothiazid keine Hinweise auf eine Schädigung von GMP gefunden wurden, könnten nun vielleicht die aktivierten Photoprodukte des Alanyltryptophans als Photosensitizer wirken und zu einer oxidativen Schädigung des GMPs führen. In der Vergangenheit wurde von Elektronentransfers zwischen Proteinen und der DNA berichtet (Cullis et al., 1987).

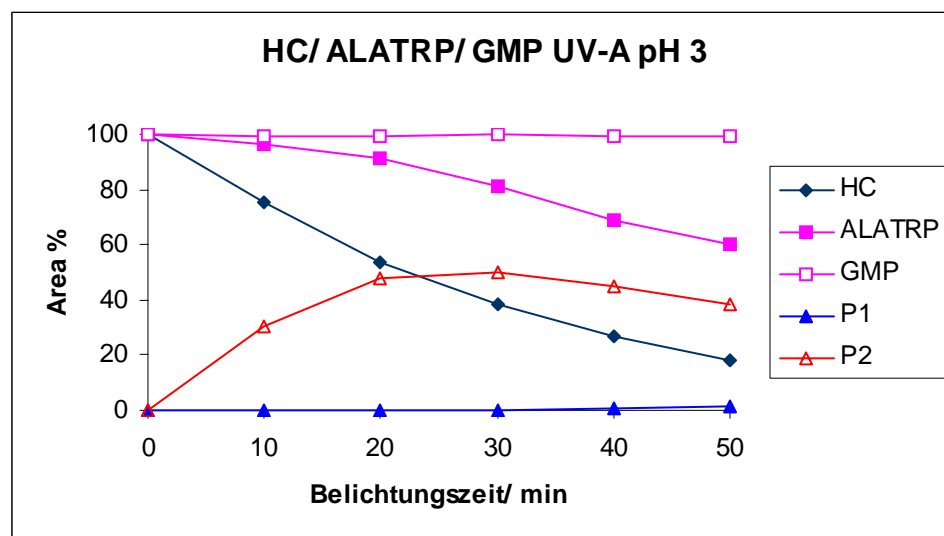


Abb. 49: Photozersetzung von Hydrochlorothiazid in Anwesenheit von Alanyltryptophan und GMP bei pH 3 und Belichtung mit der UV-A Lampe

In dem Diagramm in Abbildung 49 ist die Photozersetzung von Hydrochlorothiazid in Gegenwart von Alanyltryptophan und GMP aufgezeichnet. Die kinetischen Kurvenverläufe des Alanyltryptophans und des Hydrochlorothiazids und seiner Photoprodukte entsprechen den vorangegangenen Untersuchungen. Die Steigung der Regressionsgeraden der GMP-Kurve nimmt bei der gesamten Untersuchung nicht ab, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ ist die Steigung gleich Null. Bei dem statistischen Vergleich der Regressionsgeradensteigungen des unbelichteten GMPs aus Abbildung 39 mit der Regressionsgeradensteigungen des belichteten GMPs in Abbildung 49 unterscheiden sich die Steigungen der Regressionsgeraden nicht signifikant, was auf keinen oxidativen Abbau oder Verbrauch

des GMPs für mögliche resultierende Photoprodukte hindeutet. Bei Betrachtung der gesamten Chromatogramme dieses Versuches konnten auch keine neuen Photoprodukte entdeckt werden, die aus dem GMP hervorgegangen sein könnten. Die Änderung des pH-Wertes der Untersuchungsreihe auf pH 7 brachte keine neuen Ergebnisse.

3.2.11 Ergebnisse zur photochemischen Umsetzung von Hydrochlorothiazid mit DNA-Einzelsträngen

Da in den bisherigen Versuchen keine Hinweise auf eine Schädigung von GMP in Gegenwart von Hydrochlorothiazid und UV-A Licht festgestellt werden konnten, es aber in der Literatur Hinweise auf genotoxische Reaktionen von photoaktiviertem Hydrochlorothiazid gibt, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurde Hydrochlorothiazid nun mit kurzen komplementären DNA-Einzelsträngen in Gegenwart von UV-A Licht untersucht.

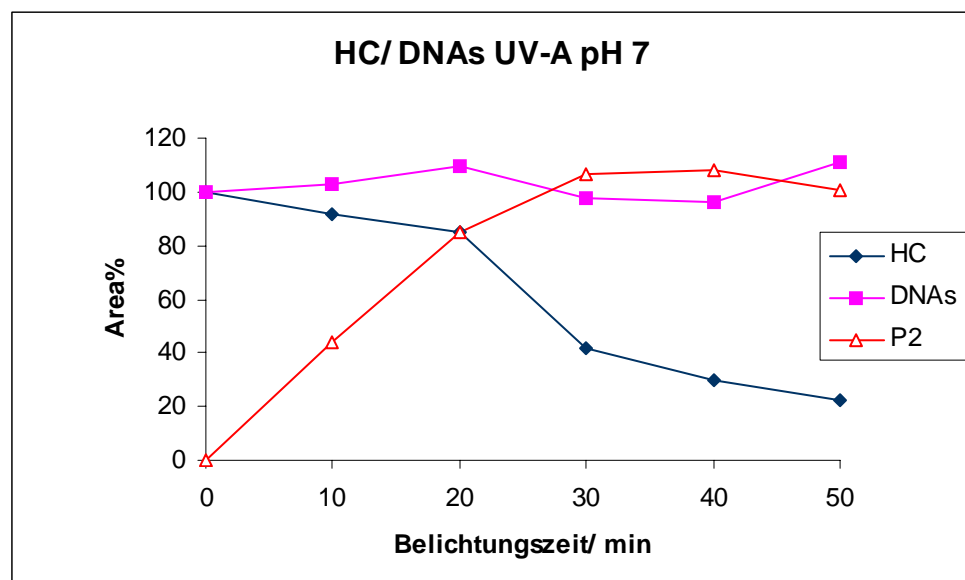


Abb. 50: HC und DNAs bei pH 7 mit UV-A belichtet

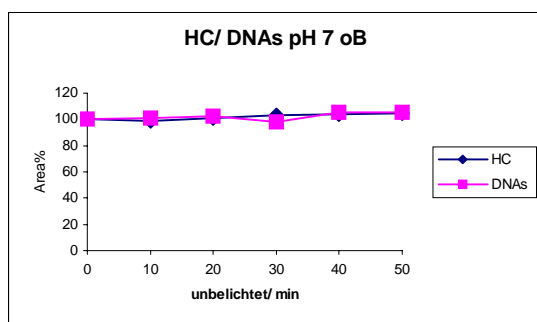


Abb. 51: HC mit DNAs bei pH 7 unbelichtet

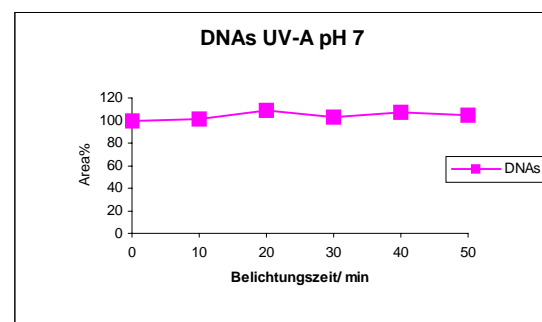


Abb. 52: DNAs bei pH 7 mit UV-A belichtet

Zuerst wurde Hydrochlorothiazid in Anwesenheit des DNA-sense-Stranges unterschiedlich lang belichtet. Die Abbildung 50 zeigt das Ergebnis.

Die statistische (beschrieben in Kap. 3.1.8) Auswertung der Regressionsgeraden der DNAs-Strang Kurve in Abbildung 50 ergibt, dass die Steigung der Regressionsgeraden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ gleich Null ist. Die Steigung der unbelichteten DNAs Regressionsgeraden in Abbildung 51 ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ gleich Null. Vergleicht man die Steigung der Regressionsgeraden des DNAs-Stranges in Abbildung 50 mit der Steigung des unbelichteten DNAs-Stranges in Abbildung 51, so unterscheiden sich die beiden Steigungen nicht signifikant. Beim statistischen Vergleich der Regressionsgeradensteigung des unbestrahlten DNAs-Stranges (Abbildung. 51) mit der Steigung der Regressionsgeraden des bestrahlten DNAs-Stranges in Abwesenheit von Hydrochlorothiazid (Abbildung. 52) unterscheiden sich die Geraden in der Steigung ebenfalls nicht signifikant. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung lassen darauf schließen, dass der DNAs-Strang bei Bestrahlung in An- und Abwesenheit von Hydrochlorothiazid nicht abgebaut wurde, da die Steigungen der Regressionsgeraden gleich Null sind.

In der Abbildung 53 sind vier Chromatogramme der Belichtung von Hydrochlorothiazid in Gegenwart von dem DNAs-Strang dargestellt.

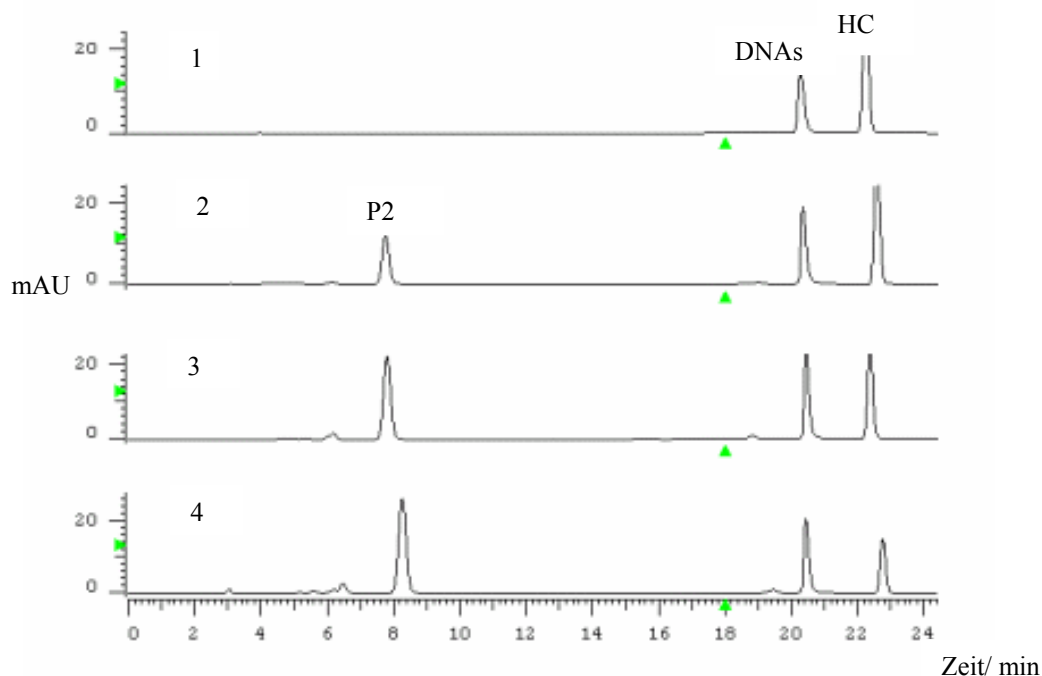


Abb. 53: (1) Hydrochlorothiazid und DNAs bei pH 7 ohne UV-A Belichtung
(2) Hydrochlorothiazid und DNAs bei pH 7 mit UV-A Licht 10 min belichtet
(3) Hydrochlorothiazid und DNAs bei pH 7 mit UV-A Licht 20 min belichtet
(4) Hydrochlorothiazid und DNAs bei pH 7 mit UV-A Licht 30 min belichtet

Im Chromatogramm 1 ist die unbestrahlte Probe von der DNAs und dem Hydrochlorothiazid abgebildet. In den Chromatogrammen 2, 3 und 4 wurden die Proben 10, 20, und 30 min lang mit UV-A belichtet. Der DNAs-Peak bleibt bei allen drei Bestrahlungen als scharfer Peak zu erkennen. Außerdem sind die schon bekannten Photoprodukte des Hydrochlorothiazids zu erkennen. Beim Vergleich aller Chromatogramme sind keine neuen Photoprodukte zu erkennen, die aus dem DNAs-Einzelstrang resultieren könnten.

Die Untersuchung des Hydrochlorothiazids in Anwesenheit von dem DNAs-Einzelstrang wurde im folgenden mit dem DNAa-Einzelstrang unter gleichen Bedingungen wiederholt. Bei der Bestrahlung des DNAa-Stranges in Gegenwart von Hydrochlorothiazid wurde der DNAa-Strang unter Einfluss von UV-A Strahlung in weitere Peaks aufgeteilt. Die prozentuale Gesamtfläche des aufgeteilten DNAa-Peaks wurde gegen die Bestrahlungszeit aufgetragen. Die gesamte Peakfläche steigt bis auf 151% unter Einfluss von 50 min UV-A Belichtung an (Abbildung 54). In der Untersuchung von Hydrochlorothiazid in Anwesenheit des DNAa-Stranges ohne Belichtung, dargestellt in Abbildung 55, bleibt die gemessene Peakfläche beider Stoffe im Bereich von 100%. In der Abbildung 56 wurde der DNAa-Strang in Abwesenheit von Hydrochlorothiazid mit UV-A Licht belichtet. Die detektierten prozentualen Peakflächen lagen dabei im Bereich von 100% und in den Chromatogrammen der Untersuchungen war ein scharfer Peak der DNA zu sehen.

Beim statistischen Vergleich der Steigung der Regressionsgeraden der DNAa-Strang-Kurve in Abbildung 54 mit der Steigung der Regressionsgeraden der unbelichteten DNAa-Strang-Kurve in Abbildung 55 unterscheiden sich die beiden Steigungen signifikant. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung lassen darauf schließen, dass der DNAa-Strang bei Bestrahlung in Anwesenheit von Hydrochlorothiazid abgebaut oder strukturell verändert wurde, da die Steigung der Geraden ungleich Null ist.

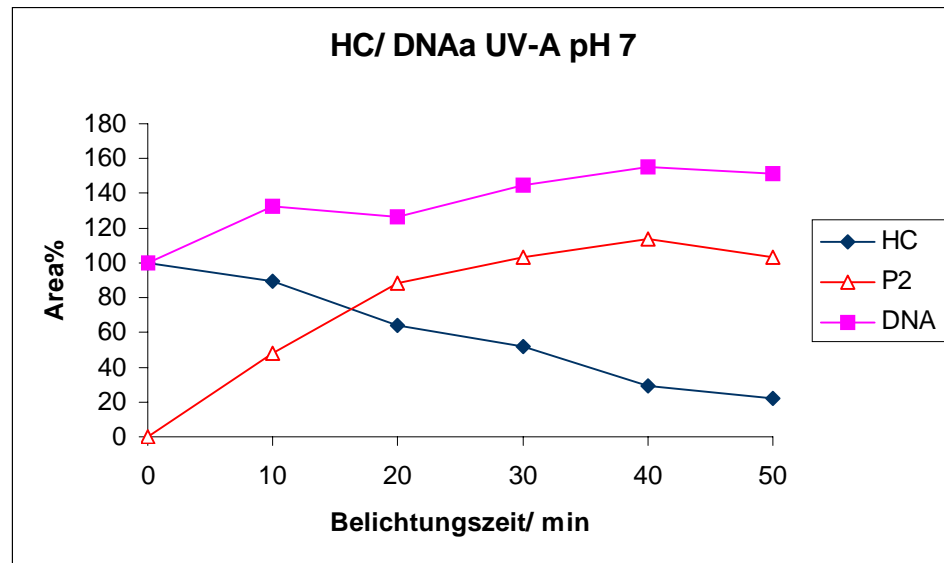


Abb. 54: HC und DNAa bei pH 7 und mit UV-A belichtet

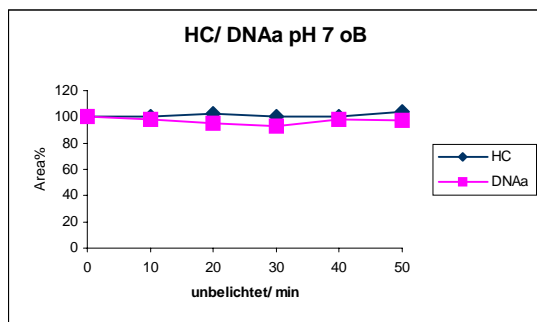


Abb. 55: HC und DNAa bei pH 7 unbelichtet

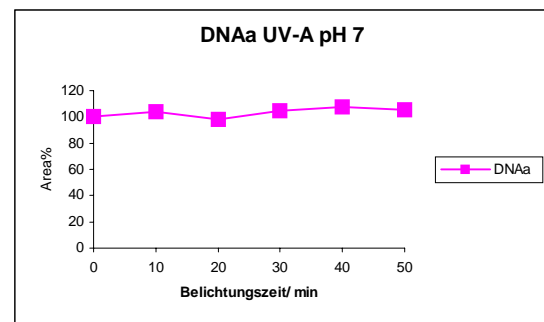


Abb. 56: DNAa bei pH 7 mit UV-A belichtet

In der Abbildung 57 sind vier Chromatogramme der Belichtungsstudie von dem DNAa-Strang in Gegenwart von Hydrochlorothiazid und UV-A Licht abgebildet. Von oben nach unten wurden die Edukte 0, 10, 20 und 30 min lang mit dem UV-A Strahler belichtet. Es ist deutlich zu erkennen wie der DNAa-Strang unter Einwirkung von UV-Strahlung in weitere Peaks zerfällt.

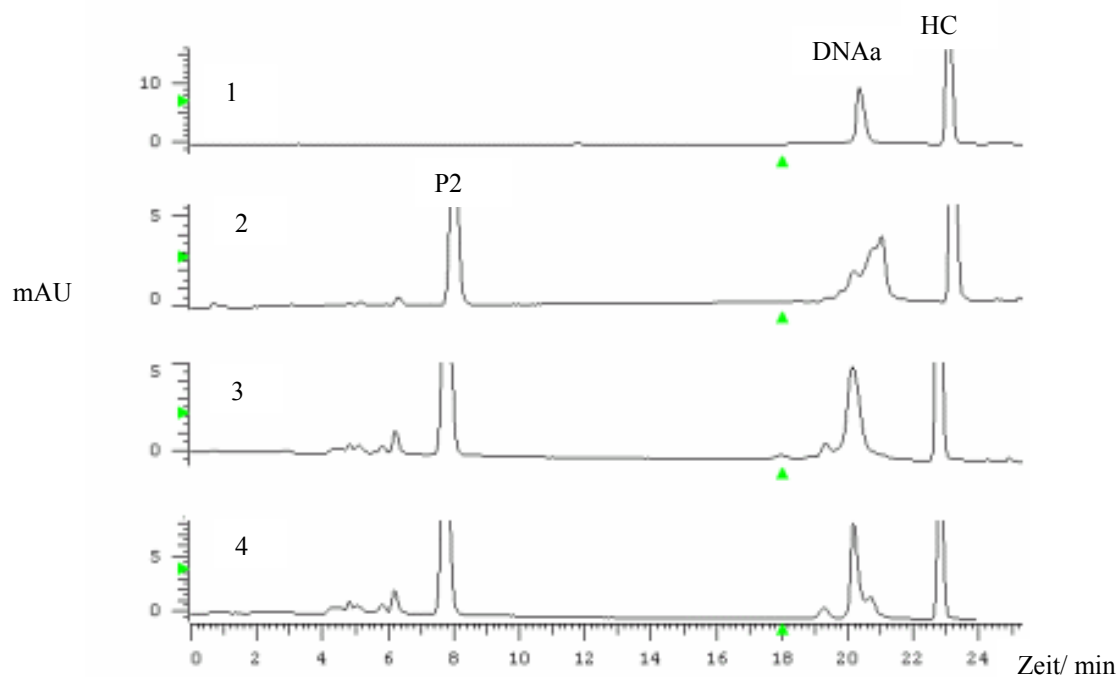


Abb. 57: (1) Hydrochlorothiazid und DNAa bei pH 7 ohne UV-A Belichtung
(2) Hydrochlorothiazid und DNAa bei pH 7 mit UV-A Licht 10 min belichtet
(3) Hydrochlorothiazid und DNAa bei pH 7 mit UV-A Licht 20 min belichtet
(4) Hydrochlorothiazid und DNAa bei pH 7 mit UV-A Licht 30 min belichtet

3.2.12 Zusammenfassung

Aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen geht hervor, dass Hydrochlorothiazid bei der photochemischen Aktivierung unter der Entstehung von mehreren Photoprodukten photochemisch zersetzt wurde.

Bei der Belichtung von Hydrochlorothiazid in Gegenwart von Biomolekülen wurden folgende Wechselwirkungen beobachtet:

In Gegenwart von Tryptophan und UV-A Belichtung, konnte dessen beschleunigter photochemischer Abbau beobachtet werden. Außerdem ist ein Photoprodukt entstanden, das bei der alleinigen Belichtung von Tryptophan und Hydrochlorothiazid nicht gefunden wurde.

Bei den Versuchen mit Hydrochlorothiazid und dem Dipeptid wurde eine Spaltung der Peptidbindung durch das photoaktivierte Hydrochlorothiazid nachgewiesen. Außerdem konnten mehrere neue Photoprodukte beobachtet werden, die bei der alleinigen Bestrahlung von Hydrochlorothiazid und Alanyltryptophan nicht entstanden sind.

Eine Wechselwirkung zwischen Hydrochlorothiazid und der DNA-Base GMP konnte nicht nachgewiesen werden. Auch die Variation des pH-Wertes brachte keine neuen Erkenntnisse.

Deshalb wurde Hydrochlorothiazid in Gegenwart von kurzen DNA-Einzelsträngen bestrahlt. Dabei konnte eine Wechselwirkung mit dem bestrahltem Hydrochlorothiazid und dem DNA-antisense Strang nachgewiesen werden. Bei den Untersuchungen mit dem DNA-sense-Strang in Gegenwart von bestrahltem Hydrochlorothiazid wurden keine Wechselwirkungen beobachtet.

Aufgrund der Degradation der Peptide und Spaltung der Peptidbindung muss von einem erhöhtem photoallergenem Potential von Hydrochlorothiazid ausgegangen werden. Außerdem ist das phototoxische und photogenotoxische Potential durch die Interaktion des Hydrochlorothiazids mit dem DNA-antisense Strang bestätigt worden.

3.3 Untersuchungen zur photochemischen Stabilität von Ofloxacin und dessen photochemischer Reaktivität gegenüber Biomolekülen

3.3.1 Einführung

Ofloxacin gehört zu der Gruppe der Gyrasehemmer, die als Antibiotika therapeutisch eingesetzt werden. Die neueren Vertreter dieser Gruppe wie z. B. das Norfloxacin, Enoxacin und Ciprofloxacin sind mit einem Fluoratom substituiert. Die fluorierten Gyrasehemmer zeichnen sich durch breite antibakterielle Aktivität und ein stark erweitertes Wirkungsspektrum aus. Ofloxacin ist an der Position 6 mit Fluor substituiert, zusätzlich kann an der Position 8 ein Fluoratom substituiert sein (Abbildung 58). Ofloxacin kann aufgrund der Acidobasizität (pK_a 5,23 und pK_a 7,39) unter biologischen Bedingungen Zwitterionen ausbilden. Bei pH 3 liegt Ofloxacin überwiegend in der kationischen Form vor, während sich bei pH 7 das Zwitterion ausbildet.

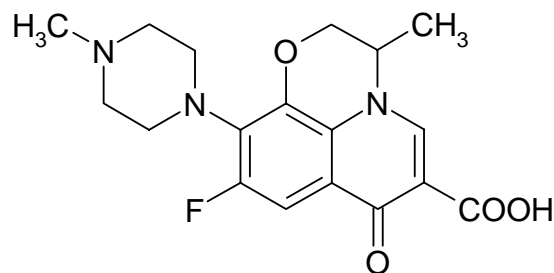


Abb.58: Struktur von Ofloxacin

Bei fast allen Gyrasehemmern wurden als Nebenwirkungen Photosensibilisierungen und Hautdermatosen beobachtet. In Tierversuchen wurde durch Gabe von Chinolonen in Gegenwart von UV-A Licht die Entwicklung von Photoallergien (Marutani et al., 1998) und Hauttumoren beobachtet. Bei 1% der Patienten, die mit Fluorchinolonen behandelt wurden, können nach der Verabreichung Hautreaktionen wie Erytheme oder Urtikaria (Stahlmann et al., 1998) auftreten. Der zugrundeliegende Wirkungsmechanismus ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Zum einen wird angenommen, dass Fluorchinolone als Photosensitizer phototoxische Reaktionen verursachen (Johnson et al., 1997; Mayne et al., 1997). Dabei wird die DNA durch die entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies oxidativ geschädigt. (Martinez et al., 1998; Robertson et al., 1991; Wagai et al., 1992). Für Norfloxacin wurden im Comet Assay nach Bestrahlung mit UV-A Licht Effekte beobachtet (Reavy et al., 1997). Die

photochemischen Eigenschaften von Norfloxacin und die Bildung von Singulett-Sauerstoff waren dabei stark von dem pH-Wert abhängig (Bilski et al., 1996).

Auf der anderen Seite können Derivate durch eine Halogensubstituierung in Position 8 phototoxische Reaktionen hervorrufen. Unter Einwirkung von UV-Strahlung kommt es bei dem Chinolon Sparfloxacin zu Dehalogenierung in 8-Position (Engler et al., 1998). Eine Einführung einer Methoxy-Gruppe in Position 8 führt hingegen zu einer Reduzierung der Phototoxizität (Marutani et al., 1993) und zu einer Zunahme der Photostabilität (Matsumoto et al., 1992).

Für Ofloxacin wurden photoinduzierte Effekte beschrieben (Jensen et al., 1987; Jungst et al., 1987). Phototoxische Reaktionen wurden *in vivo* nach Bestrahlung mit UV-A Licht gezeigt (Horio et al., 1994).

Auch die Photoprodukte der Gyrasehemmer zeigen noch antimikrobielle Aktivität (Sunderland et al., 2001).

Die Abbildung 59 zeigt die Photodegradation von Ofloxacin unter aeroben Bedingungen bei einem pH-Wert von 7,3. Dabei kommt es zu einer N-demethylierung des Ofloxacins (Cuquerella et al., 2003). Bei der Belichtung von Ofloxacin resultiert der angeregte Singulett-Zustand. Da der Singulett-Zustand nur sehr kurzlebig ist, geht dieser in den länger andauernden Triplett-Zustand über. Das Ofloxacin im Triplett-Zustand führt in Verbindung mit Sauerstoff zum Singulett-Sauerstoff. Als andere Möglichkeit wäre eine Umwandlung von Ofloxacin im Singulett-Zustand zum Ofloxacin Radikalkation denkbar. Im weiteren Reaktionsverlauf kommt es dann zur Abspaltung der Methylgruppe am Ofloxacin.

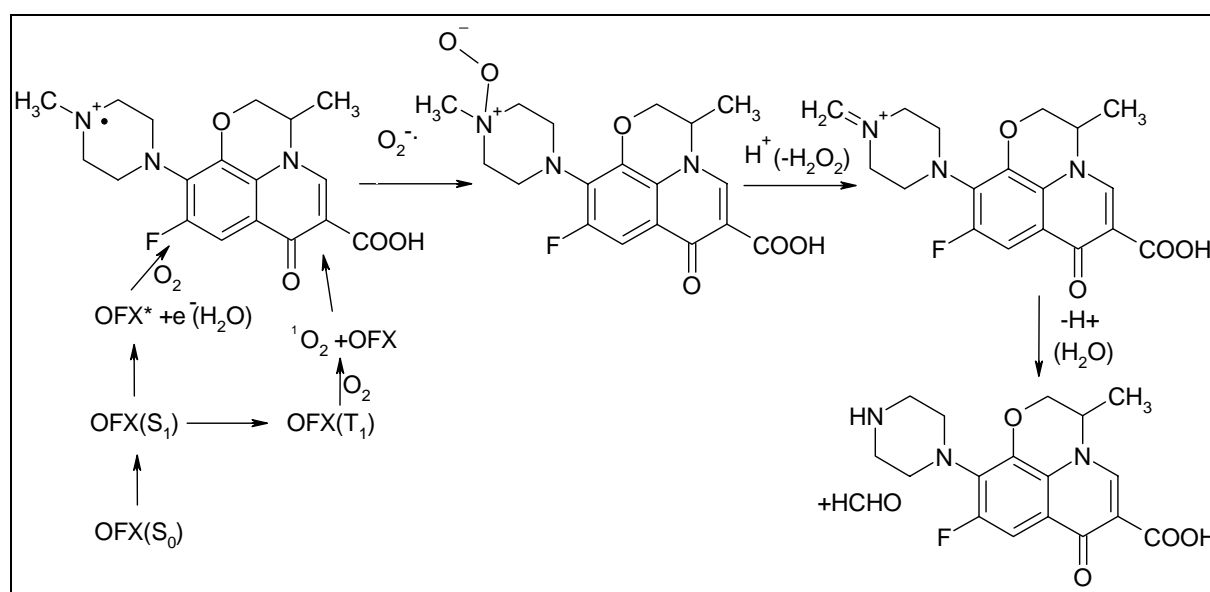


Abb.59: Photochemischer Abbau von Ofloxacin

3.3.2 Chromatographische Bedingungen der Ofloxacin Untersuchungen

Die isokratische Pumpe 1 befördert das Ofloxacin und das GMP mit der wässrigen phosphatgepufferten mobilen Phase in den Photoreaktor zur Belichtung. Der pH-Wert der mobilen Phase und der Probenlösung wurde bei den beiden vergleichenden Untersuchungsreihen entweder auf pH 3 oder pH 7 eingestellt. Nach der Belichtung und nach dem Herauspumpen des Ofloxacins, GMPs und der Photoprodukte aus dem Photoreaktor auf die Säule 1 wurden die Ventile der Säulenschaltung bei 2,9 min von der Load in die Injekt Position geschaltet. Danach wurden die Stoffe mit einem Acetonitril/ Puffer Gradienten der Pumpe 2 über die Säule 2 chromatographiert (s. Tab. 4). Der pH-Wert der wässrigen phosphatgepufferten mobilen Phase der Gradienten-Pumpe 2 wurde auf den gleichen pH-Wert wie der Puffer der Pumpe 1 eingestellt. Außerdem wurde bei der pH 7 Untersuchungsreihe der Gradient erst nach 5,5 min gestartet (s. Tab. 5). Der Fluss beider Pumpen betrug 1ml/ min.

	Zeit (min)	0	2.9	17.0	23.0
Pumpe 1	Puffer%	100	100	100	100
Pumpe 2	Puffer%	100	100	63	63
	Acetonitril%	0	0	37	37

Tab. 4: Gradientenprofil und Schaltplan der beiden Pumpen für die Ofloxacin/ GMP Untersuchung bei pH 3

	Zeit (min)	0	2.9	5.5	17.0	23.0
Pumpe 1	Puffer%	100	100	100	100	100
Pumpe 2	Puffer%	100	100	100	63	63
	Acetonitril%	0	0	0	37	37

Tab. 5: Gradientenprofil und Schaltplan der beiden Pumpen für die Ofloxacin/ GMP Untersuchung bei pH 7

3.3.3 Ergebnisse der Photostabilitätsuntersuchungen von Ofloxacin

Zuerst wurde Ofloxacin allein bei pH 3 und pH 7 jeweils 0, 10, 20, 30, 40 und 50 min mit dem UV-A Strahler im Photoreaktor bestrahlt. Die detektierten Peakflächen von Ofloxacin und der Photoprodukte wurden in Diagrammen graphisch gegen die Zeit ausgewertet. In Abbildung 60 ist die Belichtung von Ofloxacin bei pH 3 dargestellt. Die photochemische Degradation des Arzneistoffes nimmt mit zunehmender Belichtungsdauer zu, und die

gemessene prozentuale Peakfläche erreicht nach der 50 min Belichtung einen Wert von 52%. Darüber hinaus wurden neun Peakflächen von Photoprodukten zusätzlich ausgewertet.

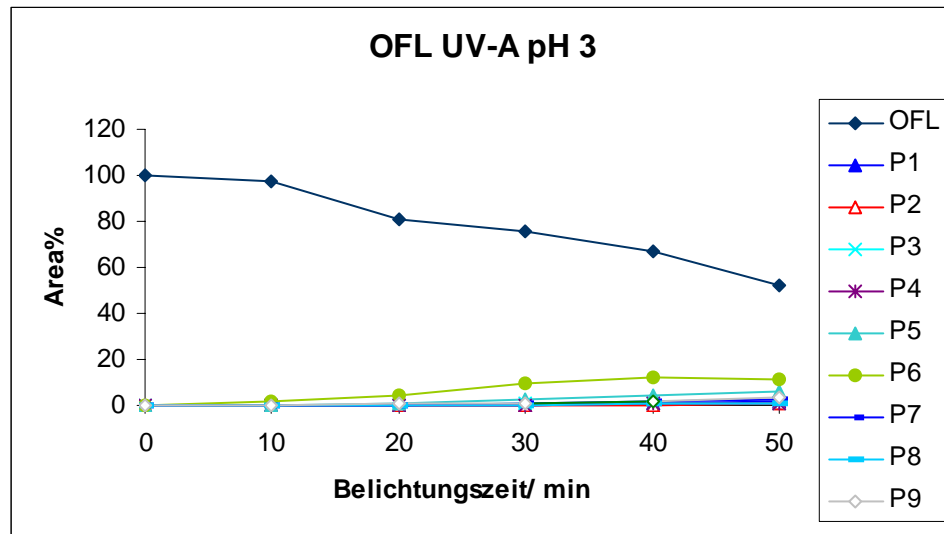


Abb. 60: Photozersetzung einer wässrig phosphatgepufferten Ofloxacinlösung bei pH 3 mit der UV-A Lampe

In der Abbildung 61 sind die Untersuchungsergebnisse der Bestrahlung von Ofloxacin bei pH 7 abgebildet. Dabei ist anhand des Kurvenverlaufes zu beobachten, dass der photochemische Zerfall von Ofloxacin bei pH 7 viel rascher vonstatten geht als bei pH 3. Nach 10 min Bestrahlung resultiert für das Ofloxacin eine detektierte Peakfläche von nur 11%. Dieser Wert reduziert sich nach einer Belichtungszeit von 50 min auf 1% der unbestrahlten Ausgangspeakfläche. Die Anzahl der entstehenden Photoprodukte ist geringer und dementsprechend wurden nur fünf resultierende Photoprodukte graphisch ausgewertet.

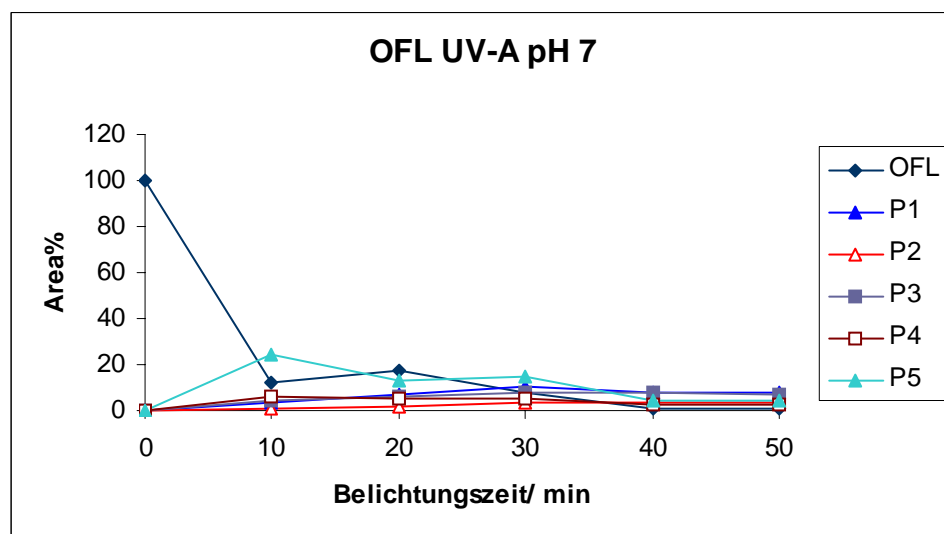


Abb. 61: Photozersetzung einer wässrig phosphatgepufferten Ofloxacinlösung bei pH 7 mit der UV-A Lampe

3.3.4 Ergebnisse der photochemischen Untersuchung von Ofloxacin in Gegenwart von 5-Guanosinmonophosphat

Zur Untersuchung der Phototoxizität wurde Ofloxacin in An- und Abwesenheit von GMP jeweils 0, 10, 20, 30, 40 und 50 min lang in der Reaktionskapillare des Photoreaktors belichtet und anschließend chromatographiert. Das Ergebnis ist in der Abbildung 62 dargestellt. Die detektierten Peakflächen des Ofloxacins und des GMPs nehmen erst langsam, bei zunehmender Belichtung zunehmend schneller ab. Das Experiment wurde insgesamt sechsmal wiederholt. Aus den resultierenden Untersuchungsergebnissen wurden die Standardabweichungen der prozentualen Peakflächen bestimmt. In der Abbildung 62 ist zu erkennen, dass die Präzision der Methode bei zunehmender Belichtungszeit abnimmt. Die neun entstehenden Photoprodukte wurden ebenfalls graphisch ausgewertet. Dabei ist gleichzeitig ein Anstieg der prozentual detektierten Peakfläche des Photoproduktes 5 mit dem abfallenden Verlauf von Ofloxacin und GMP bei der 50 min Belichtung festzustellen. Die unbelichtete Kontrolluntersuchung von Ofloxacin und GMP unter gleichen Bedingungen ist in Abbildung 63 zu sehen.

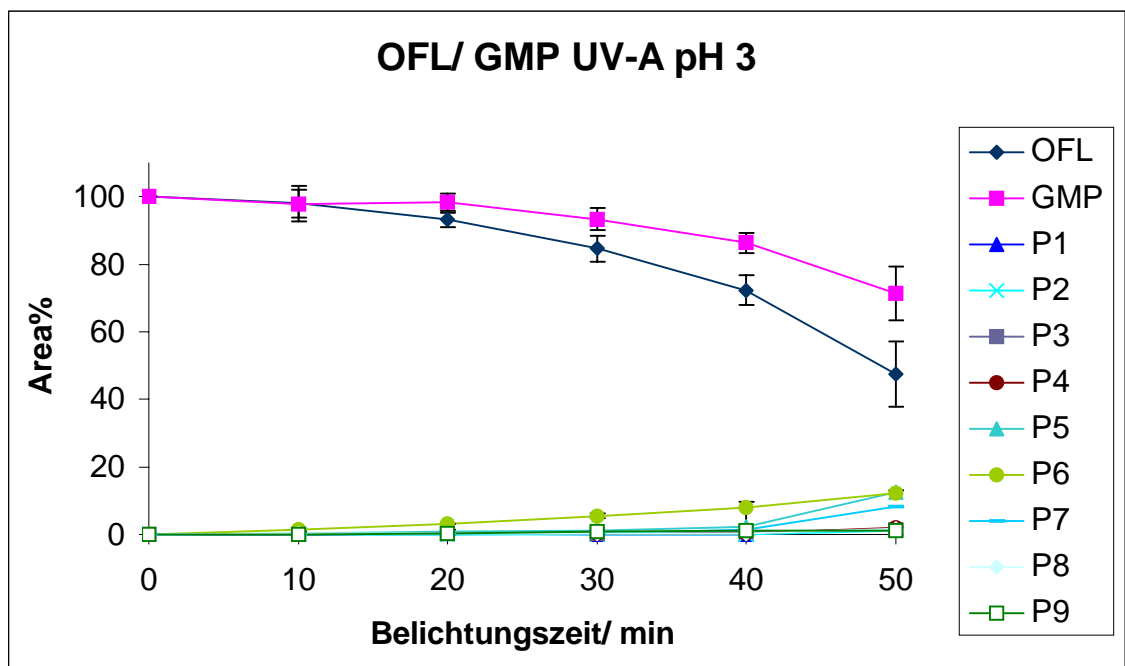


Abb. 62: Photozersetzung von OFL/ GMP bei pH 3 und UV-A Belichtung (n=6)

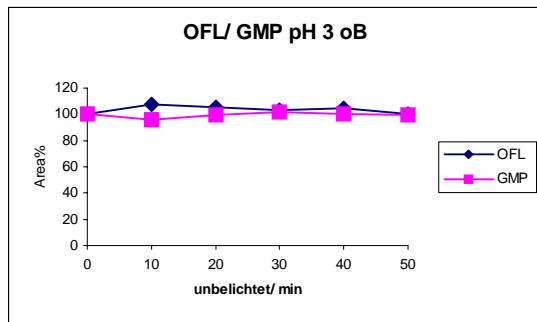


Abb. 63: OFL/ GMP bei pH 3 unbelichtet

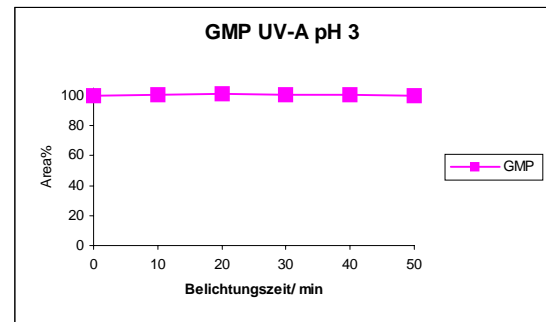


Abb. 64: GMP bei pH 3 mit UV-A belichtet

In dem Diagramm der Abbildung 64 ist die Bestrahlung von GMP ohne Ofloxacin in Abwesenheit von UV-A Licht graphisch dargestellt.

Die statistische Auswertung (beschrieben in Kap. 3.1.8) der Regressionsgeraden der GMP-Kurve in Abbildung 62 ergibt, dass die Steigung der Geraden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ ungleich Null ist. Die Steigung der Regressionsgeraden der unbelichteten GMP-Kurve in Abbildung 63 ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0,1$ gleich Null. Vergleicht man die Steigung der Regressionsgeraden des GMPs in Abbildung 62 mit der Steigung der Regressionsgeraden des unbelichteten GMPs in Abbildung 63, so unterscheiden sich die beiden Steigungen signifikant. Beim statistischen Vergleich der Regressionsgeradensteigung des unbestrahlten GMPs (Abbildung 63) mit der der Steigung der Regressionsgeraden des bestrahlten GMPs in Abwesenheit von Ofloxacin (Abbildung 64) unterscheiden sich die Geraden in der Steigung nicht signifikant. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung lassen darauf schließen, dass das GMP bei Bestrahlung in Anwesenheit von Ofloxacin abgebaut wurde, da die Steigung der Regressionsgeraden ungleich Null ist.

In der Abbildung 65 sind vier Chromatogramme zu der pH 3 Belichtungsstudie von Ofloxacin in An- und Abwesenheit von GMP zu sehen. In Chromatogramm 1 ist die unbelichtete Probelösung von Ofloxacin und GMP chromatographiert worden. Es sind deutlich die beiden Peaks der beiden Stoffe zu identifizieren. Das GMP wurde nach einer Retentionszeit von 8 min zuerst eluiert und nach 14,4 min wurde das Ofloxacin von dem UV-Detektor erfasst. Chromatogramm 2 bildet die 50 min Belichtung von GMP ab. In dem Chromatogramm 3 wurde Ofloxacin ohne GMP 50 min belichtet. Außer dem noch vorhandenen Ofloxacin sind zusätzlich eine Vielzahl von Photoprodukten zu erkennen. Im untersten Chromatogramm 4 ist schließlich die 50 min Belichtung von Ofloxacin in Anwesenheit von GMP abgebildet. Bei dem Vergleich der Chromatogramme 3 und 4 sind mehrere Unterschiede im Spektrum der

Photoprodukte zu erkennen. Im Chromatogramm 4 sind eine Reihe von zusätzlichen Photoprodukten zu sehen, die bei der alleinigen Belichtung von Ofloxacin und GMP nicht zu beobachten sind. Folglich sind bei der Belichtung von Ofloxacin in Gegenwart von GMP neue Photoprodukte aus dem Ofloxacin und dem GMP hervorgegangen.

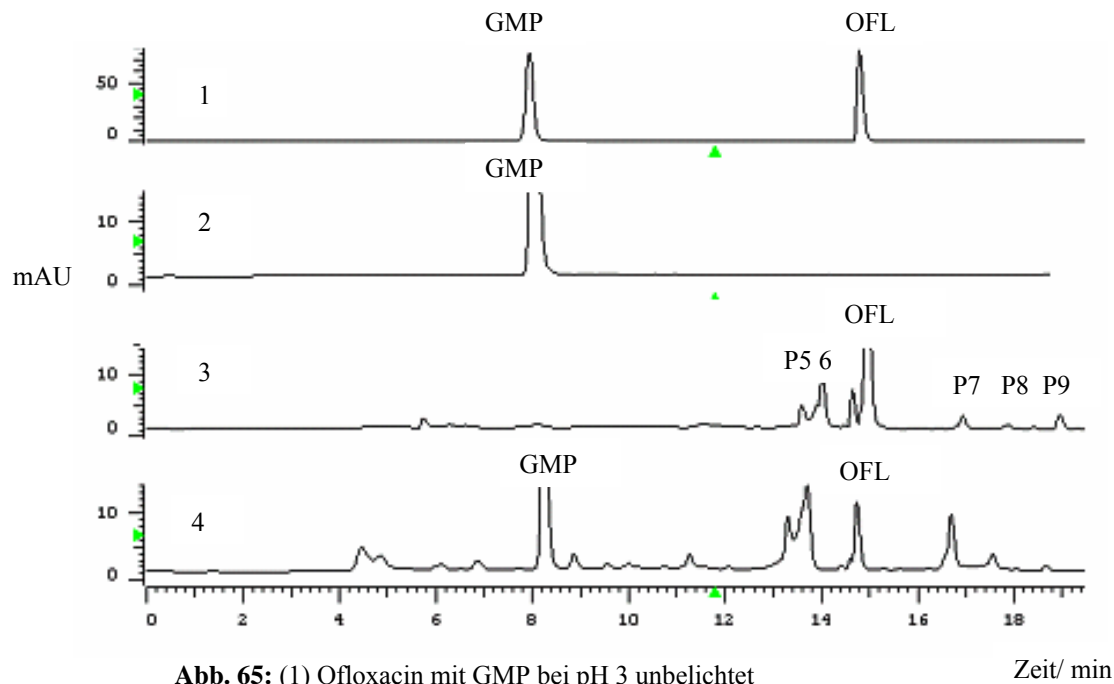


Abb. 65: (1) Ofloxacin mit GMP bei pH 3 unbelichtet
(2) GMP bei pH 3 mit UV-A Licht 50 min belichtet
(3) Ofloxacin bei pH 3 mit UV-A Licht 50 min belichtet
(4) Ofloxacin mit GMP bei pH 3 mit UV-A Licht 50 min belichtet

Die gleiche Untersuchung wurde bei pH 7 unter sonst gleichen Versuchsbedingungen wiederholt. Innerhalb dieser Untersuchung konnte keine Wechselwirkung zwischen Ofloxacin und dem GMP beobachtet werden. Die detektierten Signalflächen von GMP nahmen mit zunehmender Belichtungsdauer auch nicht ab. Die photochemische Wechselwirkung zwischen den beiden Edukten scheint ebenfalls in einer Abhängigkeit vom pH-Wert zu stehen.

3.3.5 Ergebnisse der photochemischen Untersuchung von Ofloxacin in Gegenwart von Alanyltryptophan

Die UV-A Belichtung von Ofloxacin mit einer äquimolaren Menge von Alanyltryptophan wurde aufgrund der Ergebnisse von Ofloxacin und GMP in wässriger phosphatgepufferter Lösung bei pH 3 durchgeführt. In der Abbildung 66 ist der kinetische Verlauf von Ofloxacin

und Alanyltryptophan bei fünf verschiedenen Belichtungszeiten dargestellt. Die detektierten Signalflächen von Ofloxacin und von Alanyltryptophan nehmen bei zunehmender Belichtungszeit ab. Nach einer Belichtungszeit von 50 min beträgt die detektierte Peakfläche des Alanyltryptophans nur noch 10% der unbestrahlten Ausgangsfläche.

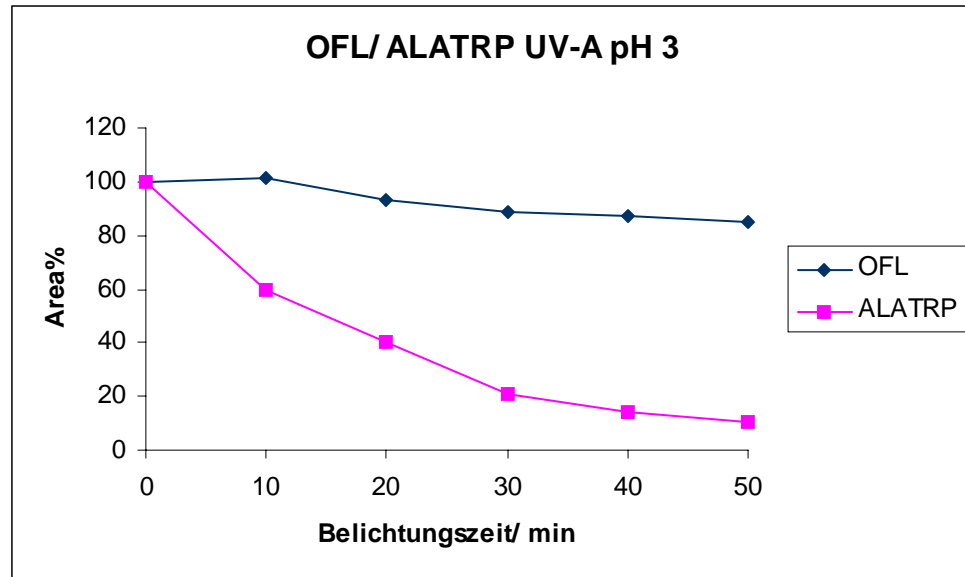


Abb. 66: Photozerersetzung von OFL/ ALATRP bei pH 3 mit UV-A Belichtung

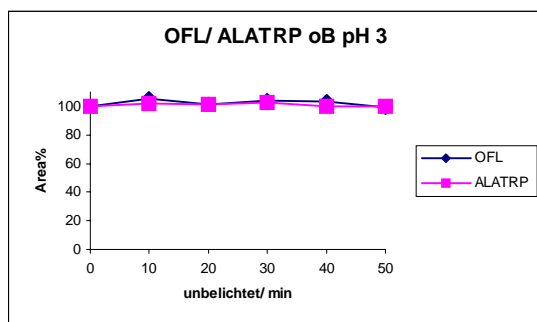


Abb. 67: OFL/ ALATRP bei pH 3 unbelichtet

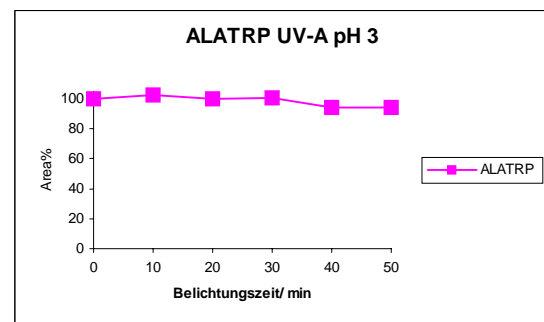


Abb. 68: ALATRP bei pH 3 mit UV-A belichtet

Der prozentuale Flächenanteil des Ofloxacins sinkt auf 84%, im Vergleich dazu wurde bei der alleinigen Bestrahlung von Ofloxacin bei pH 3 ein Wert von 52% gemessen (s. Abbildung 60). Die Anwesenheit des Alanyltryptophans verlangsamt also den photochemischen Abbau von Ofloxacin.

Die statistische Auswertung (beschrieben in Kap. 3.1.8) über die Regressionsgerade der Alanyltryptophan-Kurve in Abbildung 66 ergibt, dass die Steigung der Regressionsgeraden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ ungleich Null ist. Die Steigung der Regressionsgeraden des unbelichteten Alanyltryptophans in Abbildung 67 ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ gleich Null. Vergleicht man die Steigung der Regressionsgeraden des Alanyltryptophans in Abbildung 66 mit der Steigung der Regressionsgeraden des unbelichteten Alanyltryptophans in Abbildung 67, so unterscheiden sich die beiden Steigungen signifikant. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung lassen darauf schließen, dass Alanyltryptophan bei Bestrahlung in Anwesenheit von Ofloxacin abgebaut wurde, da die Steigung der Regressionsgeraden ungleich Null ist.

In der unteren Abbildung 69 sind vier Chromatogramme zu der Untersuchung von Ofloxacin mit Alanyltryptophan abgebildet.

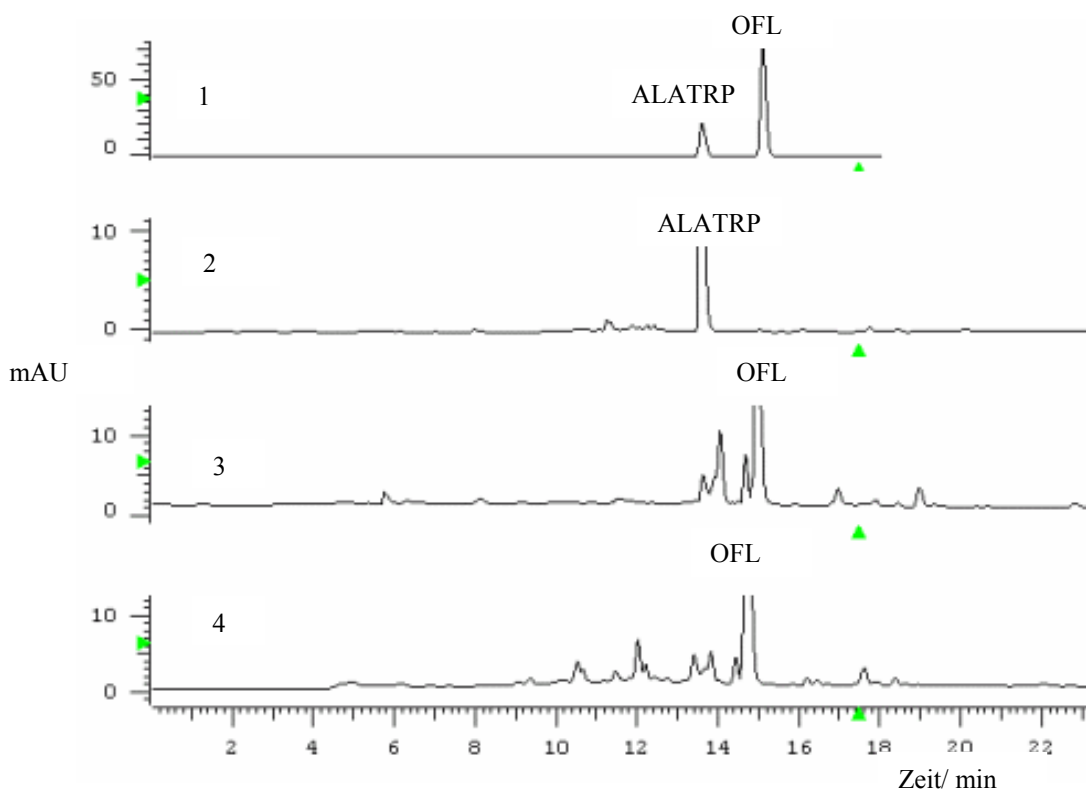


Abb. 69:(1) Ofloxacin mit ALATRP bei pH 3 unbelichtet
(2) Alanyltryptophan bei pH 3 mit UV-A Licht 50 min belichtet
(3) Ofloxacin bei pH 3 mit UV-A Licht 50 min belichtet
(4) Ofloxacin mit Alanyltryptophan bei pH 3 mit UV-A Licht 50 min belichtet

In Chromatogramm 1 ist die unbelichtete Probe von Ofloxacin mit Alanyltryptophan abgebildet. Außer den beiden Edukten sind keine weiteren Peaks zu erkennen. Das

Chromatogramm 2 zeigt die 50 min lange Belichtung von Alanyltryptophan. Bei starker Vergrößerung sind geringe Mengen von dem photochemisch zersetzten Alanyltryptophan zu beobachten. Chromatogramm 3 zeigt die 50 min alleinige Belichtung von Ofloxacin. Das Chromatogramm 4 zeigt die 50 min Belichtung von Ofloxacin in Anwesenheit des Dipeptids. Bei dem Vergleich der vier Chromatogramme ist deutlich zu sehen, dass Alanyltryptophan in Gegenwart von Ofloxacin und UV-A Licht fast vollständig in viele zusätzliche Photoprodukte degradiert wurde.

3.3.6 Zusammenfassung

Bei der Photostabilitätsprüfung mit UV-A Licht wurde Ofloxacin bei pH 3 und pH 7 belichtet, dabei wurde Ofloxacin bei pH 7 schneller abgebaut als bei pH 3. Im Vergleich zu den anderen untersuchten Arzneistoffen ist Ofloxacin bei pH 3 photostabiler als bei pH 7. Die photochemische Instabilität bei pH 7, könnte mit der Zwitterionstruktur von Ofloxacin bei diesen Bedingungen im Zusammenhang stehen. Die schlechte Löslichkeit von Ofloxacin bei pH 7 könnte ebenfalls ein Grund für den beschleunigten Abbau sein.

Aus den vorliegenden Ergebnissen wurde ersichtlich, dass auch die photochemischen Interaktionen zwischen dem Ofloxacin und den Biomolekülen von dem pH-Wert abhängig ist. Ofloxacin geht bei pH 3 mit verschiedenen Biomolekülen Wechselwirkungen ein. Zum einen konnte in Gegenwart von Ofloxacin und UV-A Belichtung eine Abnahme des detektierten GMPs bei zunehmender Belichtung festgestellt werden. Bei der gleichzeitigen Bestrahlung von Ofloxacin und GMP deutet der Kurvenverlauf auf eine Autokatalysereaktion hin. GMP wurde bei pH 3 nur in Gegenwart von Ofloxacin abgebaut, so dass unter diesen Bedingungen von einer Phototoxizität des Arzneistoffs ausgegangen werden muss. Außerdem wurden unter Belichtung der beiden Stoffe weitere Peaks im Chromatogramm sichtbar, welche bei der alleinigen Belichtung von Ofloxacin und GMP nicht zu erkennen waren. Bei pH 7 scheint das GMP unter diesen Reaktionsbedingungen nicht angegriffen worden zu sein, zumindest sind bei einer Belichtungszeit von 50 min im Experiment keine Hinweise darauf zu finden.

Die Ergebnisse zu Ofloxacin und dem Dipeptid Alanyltryptophan zeigen einen deutlichen photochemischen Abbau von Alanyltryptophan in Gegenwart von Ofloxacin und UV-A Licht. Nach 50 min UV-A Belichtung wurde fast das gesamte Alanyltryptophan in Gegenwart von Ofloxacin zersetzt. Auf der anderen Seite wurde Ofloxacin in Gegenwart von Alanyltryptophan und UV-A Licht bei pH 3 im Vergleich zu der alleinigen Bestrahlung von Ofloxacin deutlich langsamer abgebaut. Möglicherweise werden bei der photochemischen Spaltung des

Dipeptids Protonen freigesetzt, die zu einem Absinken des pH-Wertes führen. Dieses wiederum könnte zu einer Stabilisierung des Ofloxacins führen. Darüber hinaus könnten Photoprodukte des Alanyltryptophans als Radikalfänger fungieren und somit das Ofloxacin vor einem radikalischen Angriff schützen. Damit wäre auch der rasche photochemische Abbau des Alanyltryptophans zu erklären. Außerdem konnte die Entstehung von Tryptophan nicht beobachtet werden, möglicherweise wurde Tryptophan selber bevorzugt durch gebildete Radikale angegriffen und degradiert, was wiederum die erhöhte Stabilität von Ofloxacin erklären würde.

Durch die vorgestellten Ergebnisse wurde eine phototoxische und photoallergene Wirkung von Ofloxacin bestätigt.

3.4 Untersuchungen zur photochemischen Stabilität von Mefloquin und dessen photochemischer Reaktivität gegenüber Biomolekülen

3.4.1 Einführung

Mefloquin (Abbildung 70) wird in der Malariatherapie eingesetzt. In der Literatur werden eine Vielzahl von Untersuchungen von Arzneistoffen zur Malariatherapie in Bezug auf phototoxische Reaktionen beschrieben. Am häufigsten wurde Chloroquin behandelt. Über photochemische Untersuchungen zu Mefloquin wird wenig berichtet. Auch Mefloquin steht im Verdacht phototoxische und photoallergische Reaktionen zu verursachen.

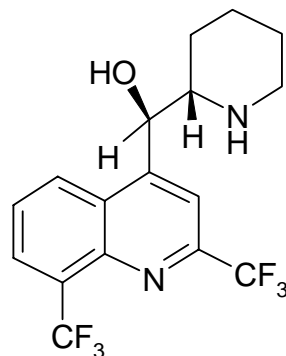


Abb. 70: Struktur von Mefloquin

Bei der Bestrahlung von Mefloquin wurde als Photoprodukt das 2,8-bis(trifluoro-methyl)-4-hydroxychinolin identifiziert, dargestellt in der Abbildung 71 (Tonnesen and Grislingaas, 1990). Eine Dehalogenierung von Fluor wird hingegen wegen der starken Bindung für unwahrscheinlich gehalten.

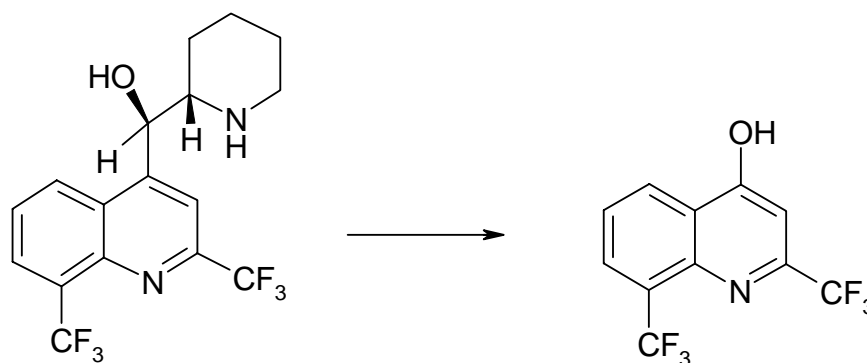


Abb. 71: Photochemischer Abbau von Mefloquin

Mefloquin wirkt als Photosensitizer und bildet in Gegenwart von Licht bestimmter Wellenlänge Singulett-Sauerstoff (Motten et al., 1999). Durch den langlebigen energiereichen Triplett-Zustand von Mefloquin und 2,8-bis(trifluoro-methyl)-4-hydroxychinolin können im weiteren Verlauf reaktive Sauerstoffspezies entstehen oder Biomoleküle in Radikale umgewandelt werden (Tønnesen et al., 1991). Mefloquin zeigt gegenüber 3T3 Fibroblasten eine phototoxische Wirkung und führt in den Zellen zu einer Lipidperoxidation (Aloisi et al., 2004).

3.4.2 Chromatographische Bedingungen der Mefloquin Untersuchungen

Die Probe, bestehend aus Mefloquin und Alanyltryptophan, wurde nach der Injektion über das Rheodyne Ventil durch die wässrig-phosphatgepufferte (pH 3) mobile Phase der isokratischen Pumpe 1 in den Photoreaktor befördert und nach der Belichtung auf der Säule 1 für 7 min angereichert. Nach 7,0 min wurde die Säulenschaltung von der Load-Stellung in die Injekt-Position umgeschaltet. Nach dem Umschalten wurde das Mefloquin und das Alanyltryptophan mit der Gradienten-Pumpe 2 unter Verwendung eines Acetonitril-/Puffergradienten über die Säule 2 chromatographisch aufgetrennt und detektiert (s. Tab. 6). Bei dem Puffer handelt es sich um einen wässrigen Phosphatpuffer eingestellt auf pH 3.

	Zeit (min)	0	7.0	10.0	18.0	25.0	38.0
Pumpe 1	Puffer%	100	100	100	100	100	100
Pumpe 2	Puffer%	97	97	85	65	50	50
	Acetonitril%	3	3	15	35	50	50

Tab. 6: Gradientenprofil, Fließmittelzusammensetzung und Schaltplan zu der Mefloquin/ALATRP Untersuchung

3.4.3 Ergebnisse zur photochemischen Untersuchung von Mefloquin mit Alanyltryptophan

Um mögliche photoallergische Reaktionen nachweisen zu können wurde Mefloquin in An- und Abwesenheit von Alanyltryptophan exemplarisch untersucht. Die Versuche wurden in phosphatgepuffert wässriger Lösung bei pH 3 durchgeführt. Die Probe wurde bei sechs verschiedenen Belichtungszeiten von 0, 10, 20, 30, 40 und 50 min mit dem UV-A-Quecksilberniederstrahler belichtet. Das Ergebnis ist in Abbildung 72 dargestellt. Deutlich ist eine Abnahme der Peakflächen bei zunehmenden Belichtungszeiten zu beobachten. Die detektierten Peakflächen des Mefloquins erreichen nach 20 min Bestrahlung einen Wert von

75%, der bei der Erhöhung der Belichtungszeit konstant bleibt. Die Peakfläche des Alanyltryptophans nimmt mit zunehmender Bestrahlung kontinuierlich ab und erreicht nach 50 min Bestrahlung ein Minimum von 55%. Bei der alleinigen Bestrahlung von Alanyltryptophan über 50 min wurde hingegen nur eine Abnahme der prozentualen Peakfläche auf 84% gemessen (Abbildung 74).

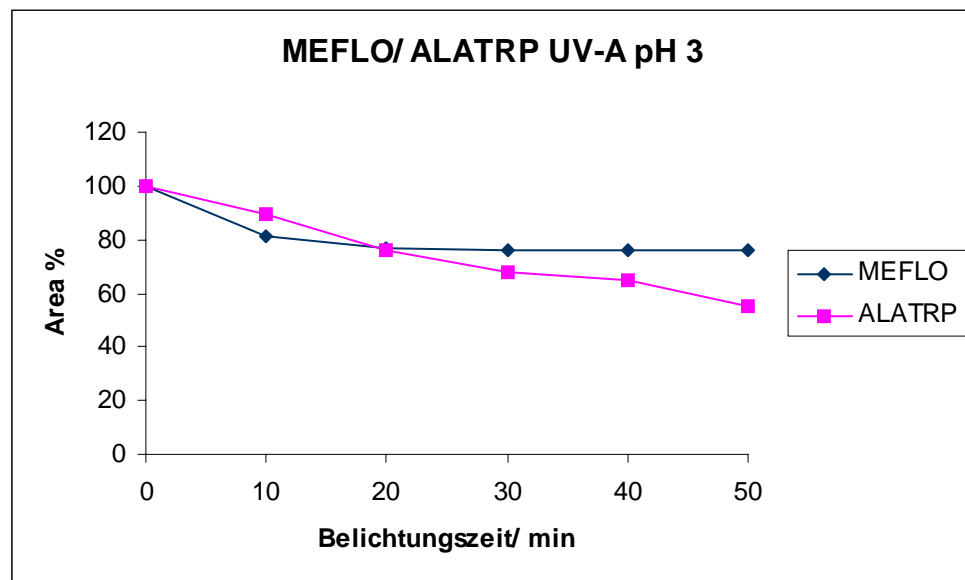


Abb. 72: Photozersetzung von MEFLO/ ALATRP bei pH 3 und UV-A Belichtung

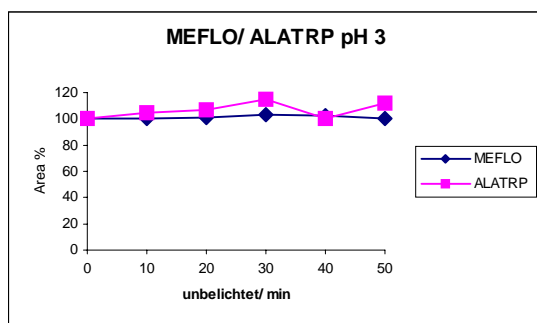


Abb. 73: MEFLO/ ALATRP bei pH 3 unbelichtet

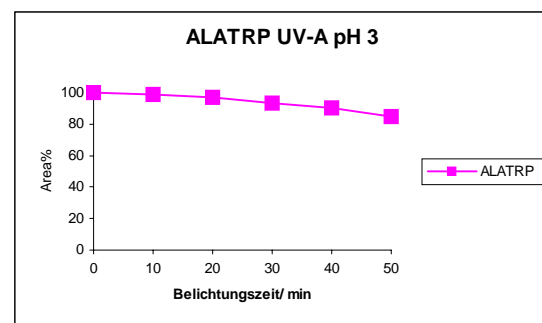


Abb. 74: ALATRP bei pH 3 und UV-A Belichtung

Die statistische Auswertung (beschrieben in Kap. 3.1.8) über die Regressionsgerade der Alanyltryptophan-Kurve in Abbildung 72 ergibt, dass die Steigung der Geraden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ ungleich Null ist. Die Steigung der Regressionsgeraden des unbelichteten Alanyltryptophans in Abbildung 73 ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ gleich Null. Vergleicht man die Steigung der Regressionsgeraden des Alanyltryptophans in Abbildung 72 mit der Steigung der Regressionsgeraden des unbelichteten Alanyltryptophans in Abbildung 73, so unterscheiden sich die beiden Steigungen signifikant. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung lassen darauf schließen, dass Alanyltryptophan bei Bestrahlung in Anwesenheit von Mefloquin beschleunigt abgebaut wurde, da die Steigung der Regressionsgeraden ungleich Null ist.

Mit der Darstellung (Abbildung 75) von vier Chromatogrammen soll die verstärkte Photozersetzung von Alanyltryptophan in Gegenwart des Photosensitizers Mefloquin deutlich gemacht werden. Die Chromatogramme zeigen die photochemischen Untersuchungen von Mefloquin in An- und Abwesenheit von Alanyltryptophan. Das Chromatogramm 1 zeigt die beiden Peaks des unbestrahlten Mefloquins mit Alanyltryptophan. Im Chromatogramm 2 ist das Spektrum der alleinigen Belichtung von Alanyltryptophan bei 50 min UV-A Bestrahlung abgebildet. In diesem Chromatogramm sind ebenfalls einige Photoprodukte des Alanyltryptophans zu beobachten. Das Chromatogramm 3 zeigt die alleinige Belichtung von Mefloquin. Bei der detektierten Wellenlänge von 254 nm sind keine größeren Peaks möglicher Photoprodukte zu erkennen. Chromatogramm 4 zeigt die 50 min Belichtung von Mefloquin mit Alanyltryptophan. Neben den beiden Ausgangsverbindungen sind eine ganze Reihe von Photoprodukten in dem Chromatogramm 4 zu erkennen. Beim Vergleich von dem Chromatogramm 2 mit dem Chromatogramm 4 sind zwar fast die gleichen Peaks von Photoprodukten zu identifizieren, aber bei der Bestrahlung von Mefloquin in Anwesenheit von Alanyltryptophan sind die Peakflächen der Photoprodukte viel größer. Mefloquin scheint als Photosensitizer die photochemische Zersetzung des Alanyltryptophans also zu beschleunigen.

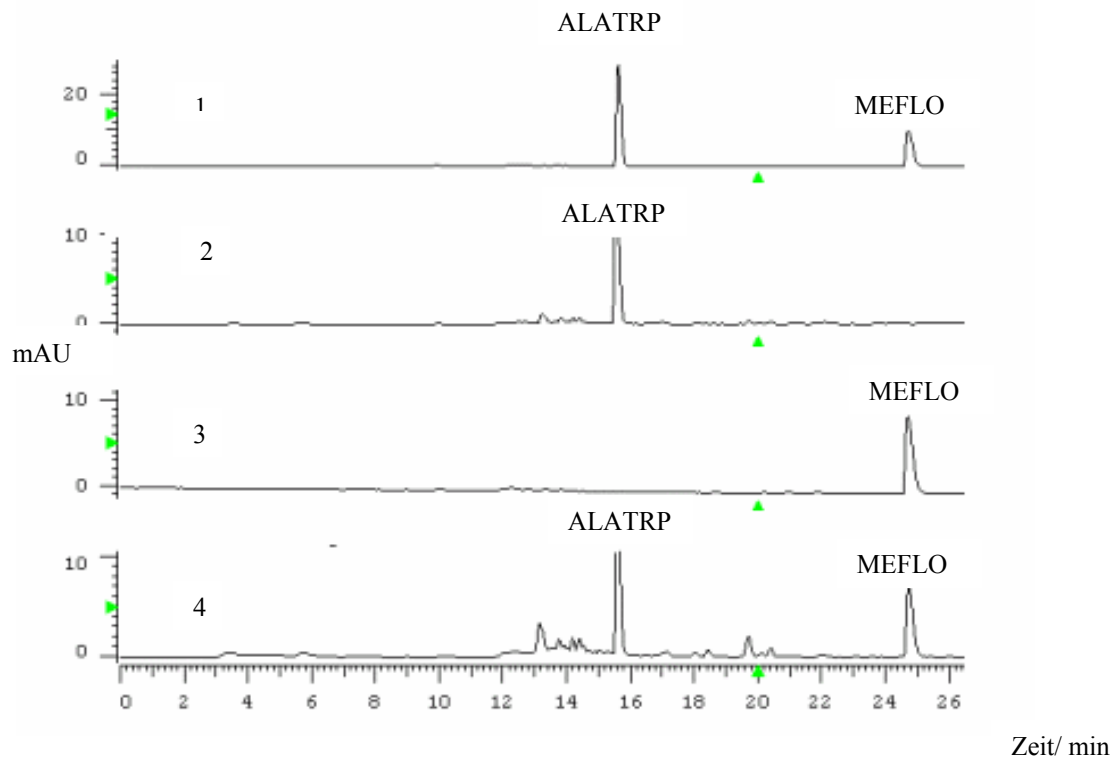


Abb. 75: (1) Mefloquin mit Alanyltryptophan ohne UV-A Belichtung
(2) Alanyltryptophan bei pH 3 mit UV-A Licht 50 min belichtet
(3) Mefloquin bei pH 3 mit UV-A Licht 50 min belichtet
(4) Mefloquin mit Alanyltryptophan bei pH 3 mit UV-A Licht 50 min belichtet

3.4.4 Ergebnisse der photochemischen Untersuchungen von Mefloquin mit 5-GMP

In weiterführenden Versuchen wurde Mefloquin in Gegenwart von der DNA-Base GMP in An- und Abwesenheit von UV-A Licht bei pH 3 und pH 7 untersucht. Bei dem Experiment wurde der Arzneistoff und die Base in einer äquimolaren Menge untersucht. Nach der Auswertung der Chromatogramme konnten keine neuen Addukte von möglichen Photoprodukten identifiziert werden. Die gemessene Peakfläche des GMP war bei allen Untersuchungen konstant und somit wurde das GMP nicht photochemisch abgebaut.

3.4.5 Zusammenfassung

Wegen der starken Photodegradation des Dipeptids Alanyltryptophan in Gegenwart von Mefloquin unter UV-A Bestrahlung ist von einem erhöhten photoallergenem Potential auszugehen. Wie bei der Untersuchung zu Ofloxacin konnte die Entstehung von Tryptophan nicht beobachtet werden, möglicherweise wurde das entstehende Tryptophan auch sofort

durch das aktivierte Mefloquin degradiert. Es könnte aber auch ein anderer Mechanismus bei der Degradation des Dipeptis zugrunde liegen.

In Gegenwart von der DNA-Base GMP wurde weder bei pH 3 noch bei pH 7 eine Wechselwirkung zwischen dem photoaktivierten Arzneistoff und dem Biomolekül festgestellt. Aus diesem Grund konnte die phototoxische oder photogenotoxische Aktivität von Mefloquin mit diesem Modell nicht bestätigt werden.

3.5 Untersuchungen zur photochemischen Stabilität von Tetracyclin und dessen photochemischer Reaktivität gegenüber Biomolekülen

3.5.1 Einführung

Tetracyclin (Abbildung 76) ist ein antibiotisch wirksamer Arzneistoff. Die Wirkung beruht auf der Hemmung der ribosomalen Protein-Biosynthese.

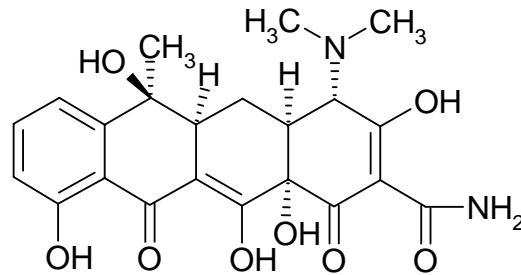


Abb. 76: Struktur von Tetracyclin

Tetracyclin ist instabil gegenüber Säuren und Basen. In saurehaltiger Lösung wurde die Abspaltung von Wasser an der C-6 Hydroxy-Gruppe beschrieben. Bei einem pH-Wert zwischen 2 und 6 epimerisiert Tetracyclin in das Epitetracyclin. Als Photoprodukt wurde Lumitetracyclin nach Bestrahlung in wässriger Lösung bei einem pH-Wert von 6,4 als Photoprodukt identifiziert (Abbildung 77).

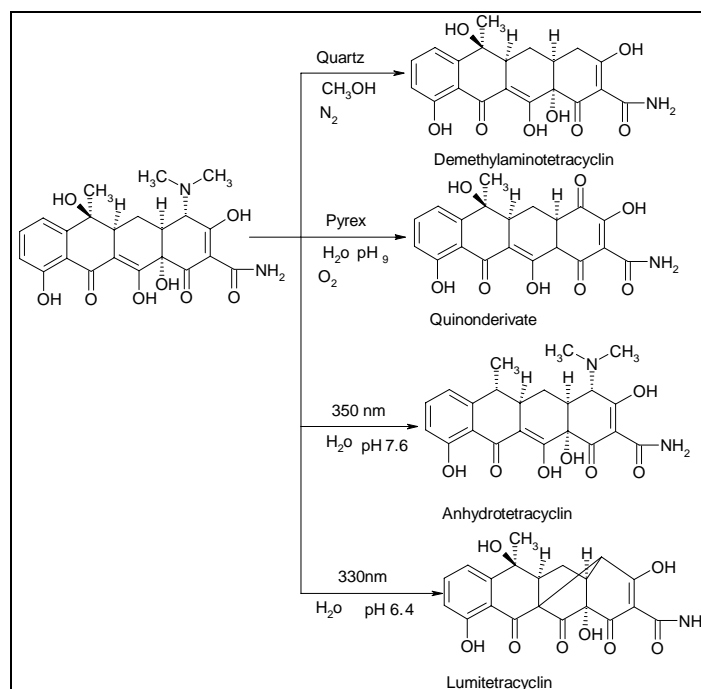


Abb.77: Photochemischer Abbau von Tetracyclin (Davies et al., 1979; Hasan et al., 1985)

Als weitere Photoprodukte wurden das Demethylaminotetracyclin, ein Quinonderivat und das Anhydrotetracyclin gefunden (s. Abbildung 77).

Tetracycline sind phototoxisch. Die phototoxische Wirkung wird mit der Bildung von Singulett-Sauerstoff (Hasan et al., 1984; 1986) und anderen Sauerstoffradikalen (Martin et al., 1987) in Verbindung gebracht. Außerdem wurde über ein Fall von Urtikaria und Erythem-Bildung unter der Einnahme von Tetracyclin und Sonnenlicht berichtet (Yap et al., 2000).

3.5.2 Chromatographische Bedingungen der Tetracyclin Untersuchungen

Die chromatographischen Bedingungen wurden aufgrund der ähnlichen Polarität von Tetracyclin und Ofloxacin von letzterem übernommen (s. Tab. 4).

3.5.3 Ergebnisse der Photostabilitätsuntersuchungen von Tetracyclin

Tetracyclin wurde in wässriger phosphatgepufferter Lösung bei pH 3 jeweils 0, 10, 20, 30, 40 und 50 min mit UV-A Licht bestrahlt. Die Kinetik des photochemischen Abbaus ist in der Abbildung 78 dargestellt. Die detektierten Signalflächen nehmen mit zunehmender Belichtungsdauer ab. Nach der 50 min Belichtung beträgt die Tetracyclin-Peakfläche 54% der unbestrahlten Ausgangsfläche. Parallel zur Abnahme der Tetracyclin Peakfläche nehmen die Peakflächen der Photoprodukte zu.

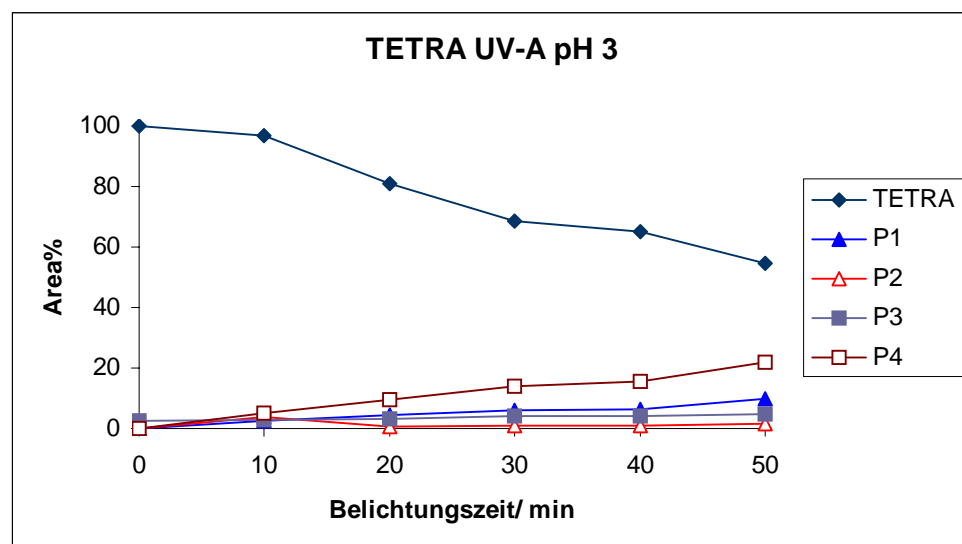


Abb. 78: Photozersetzung einer wässrig phosphatgepufferten Tetracyclinhydrochloridlösung bei pH 3 mit der UV-A Lampe

3.5.4 Ergebnisse der photochemischen Untersuchung von Tetracyclin in Gegenwart von 5-Guanosinmonophosphat

Tetracyclin wurde bei pH 3 mit einer äquimolaren Menge GMP mit UV-A Licht bestrahlt. Die Abbildung 79 zeigt den Verlauf der prozentualen Peakflächen von Tetracyclin und GMP. Außerdem wurden alle Photoprodukte des Tetracyclins ausgewertet. Der Kurvenverlauf des Tetracyclins und die Kurvenverläufe der entstehenden Photoprodukte sind mit der alleinigen Bestrahlung von Tetracyclin in der Abbildung 78 vergleichbar.

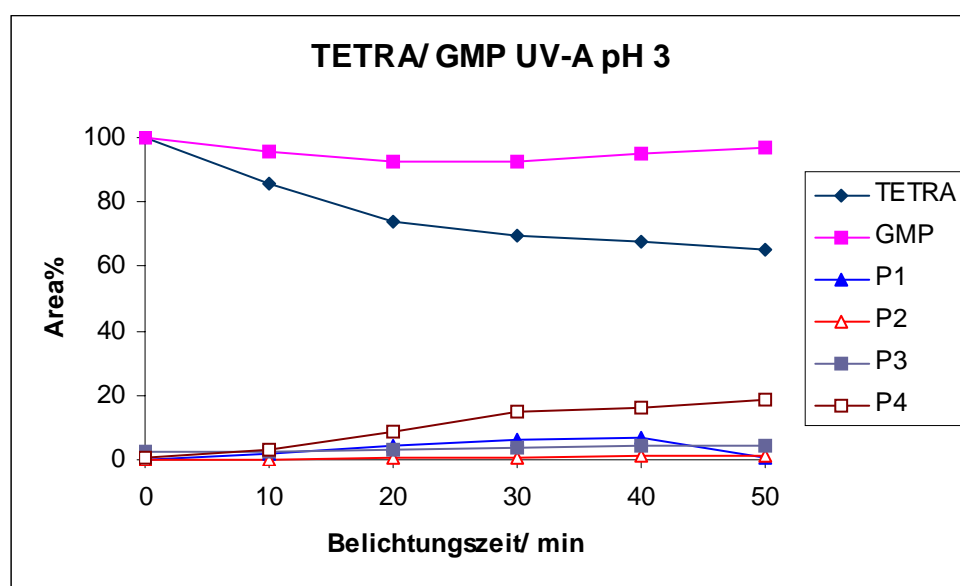


Abb. 79: Photozersetzung einer wässrig phosphatgepufferten Tetracyclinhydrochloridlösung in Anwesenheit von GMP bei pH 3 mit der UV-A Lampe belichtet

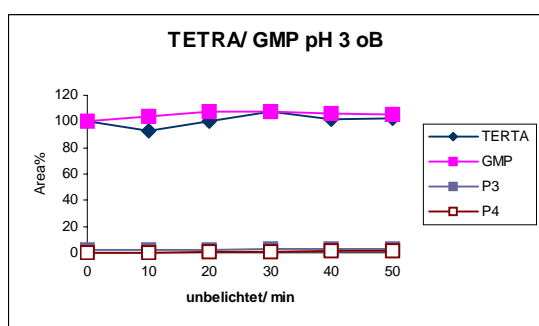


Abb. 80: TETRA/ GMP bei pH 3 unbelichtet

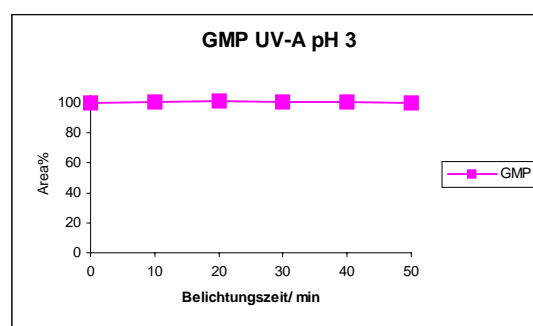


Abb. 81: GMP bei pH 3 mit UV-A belichtet

In der Abbildung 80 ist die unbelichtete Kontrolluntersuchung von Tetracyclin mit GMP graphisch abgebildet. Die detektierten Signalfächen der beiden Edukte nehmen mit zunehmender Standzeit im Photoreaktor nicht ab, jedoch entstehen auch ohne Belichtung die Produkte P 3 und P 4. In Abbildung 81 ist die alleinige Belichtung von GMP zu sehen.

Die statistische Auswertung (beschrieben in Kap. 3.1.8) über die Regressionsgerade der GMP-Kurve in Abbildung 79 ergibt, dass die Steigung der Geraden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ gleich Null ist. Die Steigung der Regressionsgeraden des unbelichteten GMPs in Abbildung 80 ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ gleich Null. Vergleicht man die Steigung der Regressionsgeraden des GMPs in Abbildung 79 mit der Steigung der Regressionsgeraden des unbelichteten GMPs in Abbildung 80, so unterscheiden sich die beiden Steigungen nicht signifikant. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung lassen darauf schließen, dass GMP bei Bestrahlung in Anwesenheit von Tetracyclin nicht abgebaut wurde, da die Steigung der Regressionsgeraden gleich Null ist. Bei dem Vergleich der Chromatogramme der gesamten Untersuchungen konnten keine weiteren Peaks identifiziert werden, die aus photochemischen oder anderen Wechselwirkungen der beiden Ausgangsstoffe hervorgegangen sein könnten.

3.5.5 Ergebnisse zur photochemischen Untersuchung von Tetracyclin in Gegenwart von Alanyltryptophan

Tetracyclin wurde mit einer äquimolaren Menge Alanyltryptophan bei pH 3 mit der UV-A Lampe 0, 10, 20, 30, 40 und 50 min belichtet. Aus dem Verlauf der kinetischen Kurven der Edukte in Abbildung 82 wird ersichtlich, dass beide Edukte mit zunehmender Belichtung abgebaut werden. Die gemessene Signalfäche des Alanyltryptophans beträgt nach der längsten Belichtung von 50 min noch 65% von der unbelichteten Ausgangsfläche.

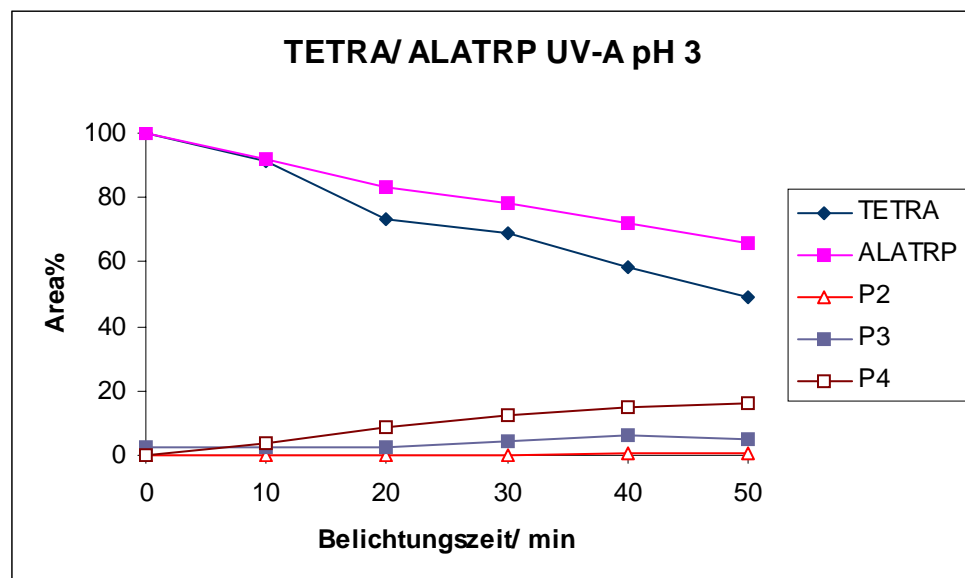


Abb. 82: Photozersetzung einer wässrig phosphatgepufferten Tetracyclinhydrochlorid Lösung in Anwesenheit von ALATRP bei pH 3 mit der UV-A Lampe

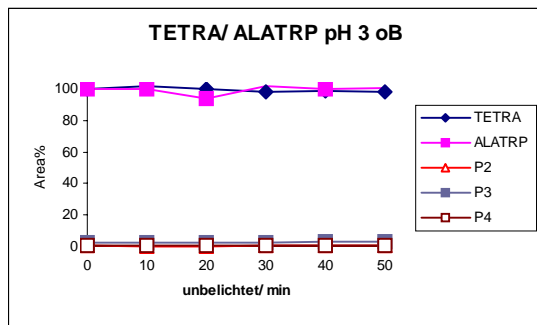


Abb. 83: TETRA/ ALATRP bei pH 3 unbelichtet

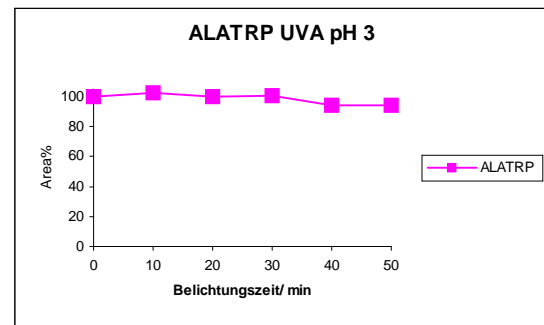


Abb. 84: ALATRP bei pH 3 mit UV-A belichtet

In der unbelichteten Kontrolluntersuchung von Tetracyclin mit Alanyltryptophan, dargestellt in Abbildung 83 ist keine Abnahme der prozentualen Peakflächen der Edukte ersichtlich. Die alleinige Belichtung von Alanyltryptophan führte zu einer leichten Abnahme der detektierten Signalfäche. Nach der 50 min Belichtung des Dipeptids betrug die Peakfläche noch 94%.

Die statistische Auswertung (beschrieben in Kap. 3.1.8) über die Regressionsgerade der Alanyltryptophan-Kurve in Abbildung 82 ergibt, dass die Steigung der Geraden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ ungleich Null ist. Die Steigung der Regressionsgeraden des unbelichteten Alanyltryptophans in Abbildung 83 ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ gleich Null. Vergleicht man die Steigung der Regressionsgeraden des Alanyltryptophans in Abbildung 82 mit der Steigung der Regressionsgeraden des unbelichteten Alanyltryptophans in Abbildung 83, so unterscheiden sich die beiden Steigungen signifikant. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung lassen darauf schließen, dass Alanyltryptophan bei Bestrahlung in Anwesenheit von Tetracyclin abgebaut wurde, da die Steigung der Regressionsgeraden ungleich Null ist.

Folglich führt die Belichtung des Dipeptids in Gegenwart von Tetracyclin zu einer beschleunigten Photozersetzung.

In Abbildung 85 sind vier Chromatogramme der Untersuchung zusehen. In Chromatogramm 1 wurde Tetracyclin mit Alanyltryptophan unbelichtet chromatographiert. Das Chromatogramm 2 zeigt die 50 min alleinige Belichtung von Alanyltryptophan und Chromatogramm 3 die alleinige Belichtung von Tetracyclin. Vergleicht man die ersten drei Chromatogramme mit der 50 min Belichtung von Tetracyclin in Anwesenheit des Dipeptids im Chromatogramm 4, so sind in diesem Chromatogramm zusätzliche Peaks zu erkennen. Diese Peaks könnten aus der Photozersetzung von Alanyltryptophan resultieren.

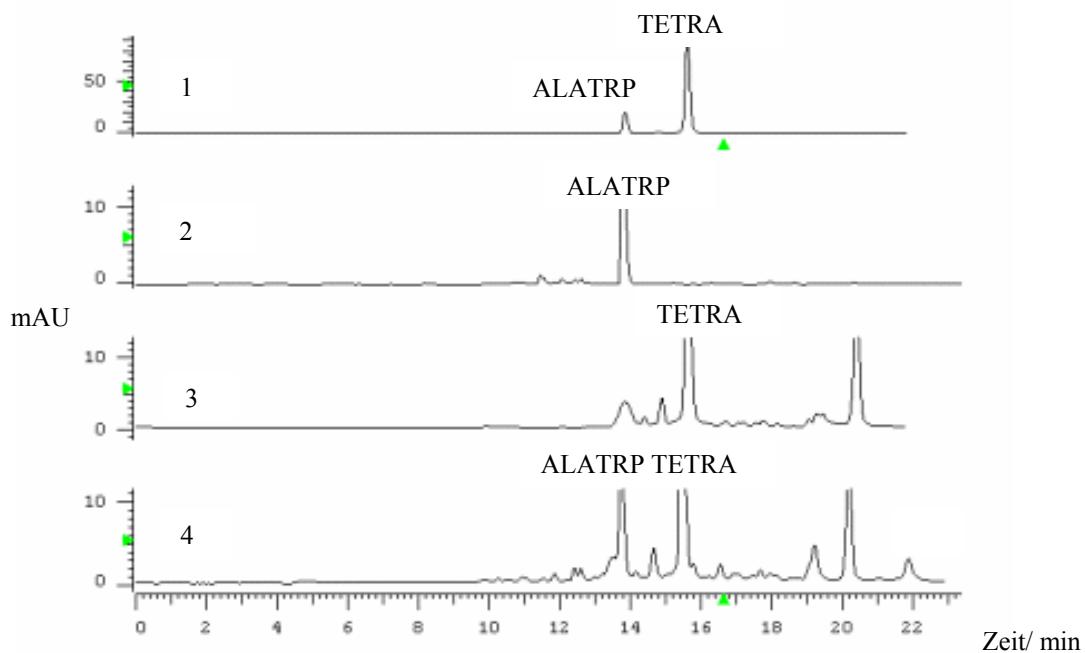


Abb. 85: (1) Tetracyclin mit Alanyltryptophan bei pH 3 unbelichtet
(2) Alanyltryptophan bei pH 3 mit UV-A Licht 50 min belichtet
(3) Tetracyclin bei pH 3 mit UV-A Licht 50 min belichtet
(4) Tetracyclin mit Alanyltryptophan bei pH 3 mit UV-A Licht 50 min belichtet

3.5.6 Zusammenfassung

Die photochemischen Untersuchungen von Tetracyclin in An- und Abwesenheit des Biomoleküls GMP und des Dipeptids Alanyltryptophan zeigen uneinheitliche Ergebnisse. Einerseits wurde keine Wechselwirkung von Tetracyclin mit GMP in Gegenwart von UV-A Licht nachgewiesen, andererseits wurde Alanyltryptophan in Gegenwart des photoaktivierten Tetracyclins wesentlich schneller abgebaut, als bei der alleinigen Bestrahlung von Alanyltryptophan. Die beschriebene phototoxische und photogenotoxische Wirkung von Tetracyclin konnte mit der Modellsubstanz GMP nicht bestätigt werden. Das photoallergene Potential von Tetracyclin wurde jedoch mit dem Modellpeptid bestätigt. Die Untersuchungsreihe konnte nur bei pH 3 durchgeführt werden. Die Untersuchung von Tetracyclin bei pH 7 war nicht möglich, weil Tetracyclin unter den veränderten Bedingungen auch ohne Belichtung sehr instabil war.

3.6 Untersuchungen zur photochemischen Stabilität von Etodolac und dessen photochemischer Reaktivität gegenüber Biomolekülen

3.6.1 Einführung

Der Arzneistoff Etodolac (Abbildung 86) ist ein antiphlogistisches Analgetikum.

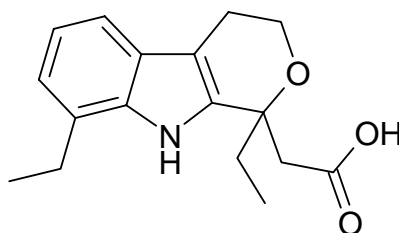


Abb. 86: Struktur von Etodolac

Lee untersuchte die hydrolytische Reaktionskinetik und den zugrundeliegenden Mechanismus. Die Reaktionskinetik entsprach dabei der 1. Ordnung (Lee et al., 1988). In der Literatur wurde das photochemische Verhalten von Etodolac bisher nicht beschrieben. Ebenfalls existiert keine Literatur die phototoxische oder photoallergene Reaktionen beschreibt. Etodolac steht lediglich im Verdacht photosensibilisierend zu wirken.

3.6.2 Chromatographische Bedingungen der Etodolac Untersuchungen

Etodolac wurde entweder alleine oder mit Biomolekülen im Photoreaktor in wässriger phosphatgepufferter Lösung belichtet. Nach der Bestrahlung wurden Etodolac und die Peptide auf der Säule 1 angereichert. Das GMP wurde direkt über die Säule 1 chromatographiert und detektiert. Die Säulenschaltung wurde nach 6,0 min von der Load in die Injekt Position umgeschaltet. Danach wurden Etodolac, Peptide und die Photoprodukte backflush mit einem Acetonitril/ Puffergradienten hinuntergespült und anschließend über die Säule 2 chromatographisch getrennt (s. Tab. 7).

	Zeit (min)	0	6.0	10.0	26.0	36.0
Pumpe 1	Puffer%	100	100	100	100	100
Pumpe 2	Puffer%	95	95	80	65	50
	Acetonitril%	5	5	20	35	50

Tab. 7: Gradientenprofil und Schaltplan der beiden Pumpen für die Etodolac Untersuchung

3.6.3 Ergebnisse der Photostabilitätsuntersuchungen von Etodolac

Etodolac wurde vorerst ohne Biomoleküle photochemisch untersucht. Dabei wurde Etodolac in phosphatgepufferter wässriger Lösung bei pH 3 und pH 7 mit dem UV-A Niederdruckstrahler belichtet. In den Abbildungen 87 und 88 ist die Zerfallskinetik von

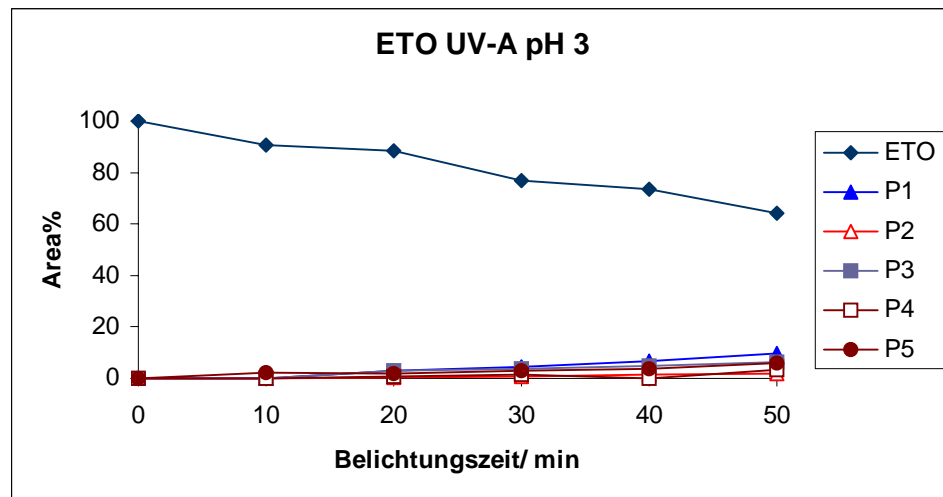


Abb. 87: Photozersetzung einer wässrig phosphatgepufferten Etodolac-Lösung bei pH 3 mit UV-A Licht

Etodolac bei 0, 10, 20, 30, 40 und 50 min langer Belichtung dargestellt. Die halblogarithmische Darstellung der pH 7 Untersuchung deutet eine Reaktionskinetik 1. Ordnung an (s. Anhang Abb. 6). Der photochemische Abbau verläuft also nach der gleichen Reaktionskinetik, wie der hydrolytische Abbau. Vergleicht man die Kurvenverläufe der beiden Diagramme so ist festzustellen, dass Etodolac bei pH 3 etwas schneller photochemisch abgebaut wurde als bei pH 7. Bei pH 3 sind nach 50 min UV-A Belichtung 64% des Etodolacs und bei pH 7 sind hingegen 77% noch nicht photochemisch abgebaut. Darüber hinaus entstehen bei der Bestrahlung der auf pH 3 eingestellten Probelösung insgesamt mehr Photoprodukte als bei der pH 7 Untersuchung.

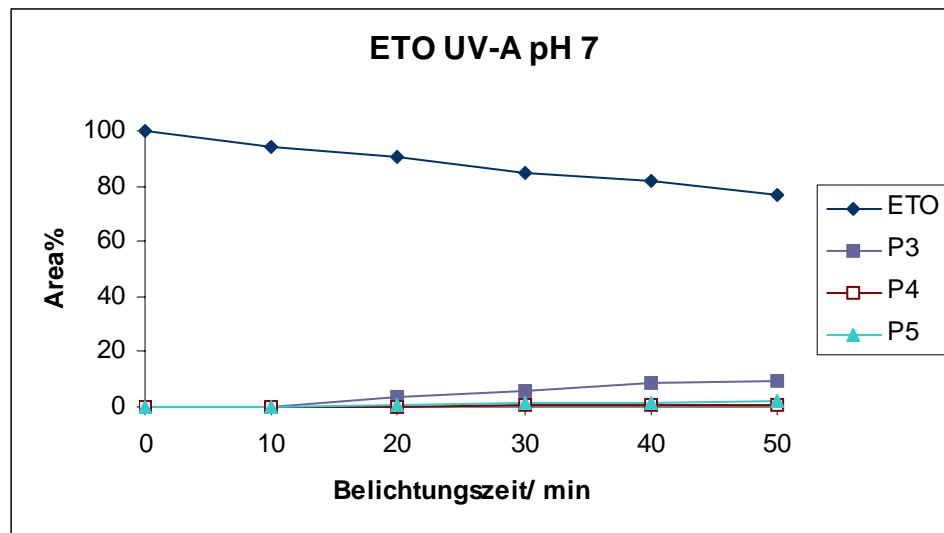


Abb. 88: Photozersetzung einer wässrig phosphatgepufferten Etodolac-Lösung bei pH 7 mit UV-A Licht

3.6.4 Ergebnisse zur photochemischen Umsetzung von Etodolac mit 5-Guanosinmonophosphat

In den folgenden Untersuchungen wurde Etodolac in Anwesenheit von GMP bei pH 3 und pH 7 belichtet. In der Literatur sind keine Hinweise auf phototoxische oder photogenotoxische Reaktion von Etodolac in Gegenwart von UV-A Licht zu finden, infolgedessen sind keine Wechselwirkungen zwischen dem Arzneistoff Etodolac oder den resultierenden Photoprodukten von Etodolac mit der DNA-Base GMP zu erwarten. Die Abbildung 89 zeigt graphisch den photochemischen Abbau von Etodolac in Gegenwart von GMP bei pH 7. Die Probe wurde 0, 10, 20, 30, 40 und 50 min lang mit UV-A Licht bestrahlt. Der Kurvenverlauf des Abbaus von Etodolac und die entstehenden Photoprodukte gleichen dem der alleinigen Bestrahlung von Etodolac (Abbildung 88).

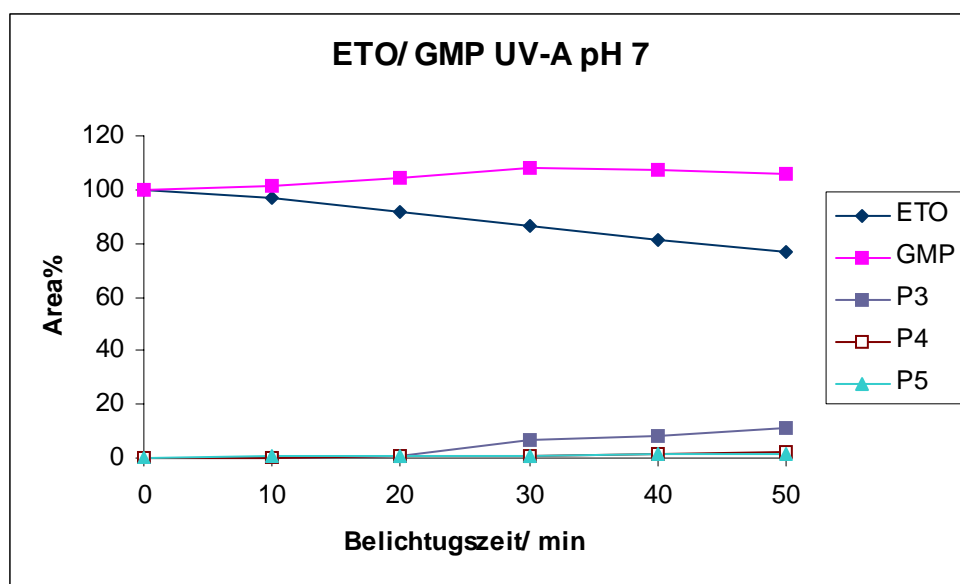


Abb. 89: Photozersetzung von ETO/ GMP bei pH 7 und UV-A Belichtung

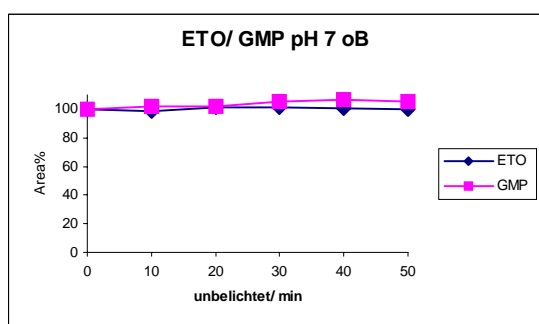


Abb. 90: ETO/ GMP bei pH 7 unbelichtet

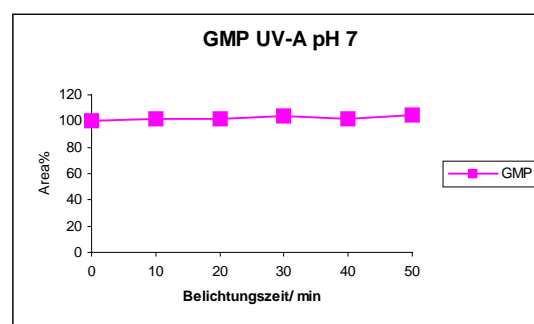


Abb. 91: GMP bei pH 7 mit UV-A belichtet

Die Kurven von Etodolac mit GMP ohne Belichtung bei sonst aber identischen Bedingungen sind in Abbildung 90 dargestellt. Die alleinige Belichtung von GMP ist in Abbildung 91 dargestellt.

Die statistische Auswertung (beschrieben in Kap. 3.1.8) über die Regressionsgerade der GMP-Kurve in Abbildung 89 ergibt, dass die Steigung der Geraden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ ungleich Null ist. Die Steigung der Regressionsgeraden des unbelichteten GMPs in Abbildung 90 ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ ungleich Null. Vergleicht man die Steigung der Regressionsgeraden des GMPs in Abbildung 89 mit der Steigung des unbelichteten GMPs in Abbildung 90, so unterscheiden sich die beiden Steigungen nicht signifikant. Beim statistischen Vergleich der Regressionsgeradensteigung des unbestrahlten GMPs (Abbildung 90) mit der Steigung der

Regressionsgeraden des bestrahlten GMPs in Abwesenheit von Etodolac (Abbildung 91) unterscheiden sich die Geraden in der Steigung nicht signifikant. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung lassen darauf schließen, dass das GMP bei Bestrahlung in Anwesenheit von Etodolac nicht abgebaut wurde, da sich die Steigungen der Regressionsgeraden nicht unterscheiden.

In der Abbildung 92 sind vier Chromatogramme der Untersuchung zu Etodolac in An- und Abwesenheit von GMP zu sehen. In Chromatogramm 1 ist die Probelösung ohne Belichtung chromatographiert worden. Außer den beiden Peaks der Edukte sind keine weiteren Signale zu identifizieren. In Chromatogramm 2 ist zusätzlich die 50 min Belichtung von GMP abgebildet. Es sind keine Photoprodukte, die aus der Belichtung von GMP hervorgegangen sein könnten, zu erkennen. Das Chromatogramm 3 bildet das Ergebnis der alleinigen 50 min Belichtung von Etodolac ab. Nur bei starker Vergrößerung des Chromatogramms sind vereinzelte Peaks von Photoprodukten zu erkennen. In Chromatogramm 4 wurde Etodolac in Anwesenheit von GMP 50 min lang im Photoreaktor mit UV-A Licht bestrahlt. Aus dem Vergleich der Chromatogramme 3 und 4 ergeben sich keine Unterschiede, es sind keine neuen Photoprodukte zu erkennen. Aufgrund dieser Beobachtung kann man davon ausgehen, dass es zu keiner Reaktion zwischen den Photoprodukten des Etodolacs und des GMPs gekommen ist.

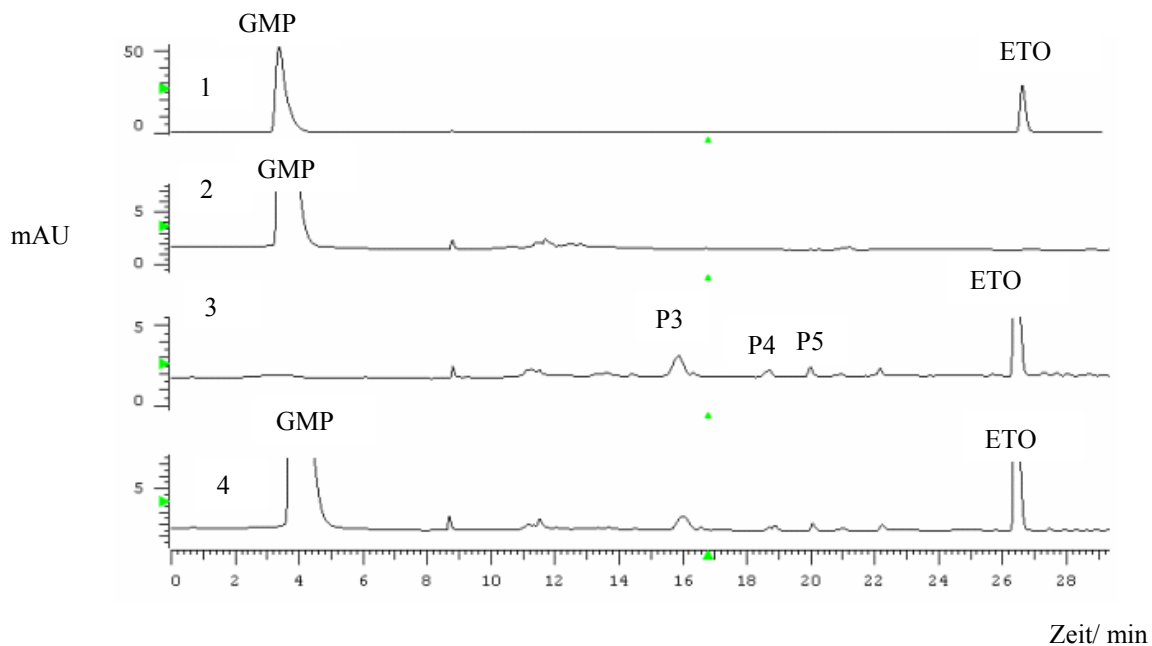


Abb. 92: (1) Etodolac mit GMP bei pH 7 unbelichtet
(2) GMP bei pH 7 mit UV-A 50 min belichtet
(3) Etodolac bei pH 7 mit UV-A 50 min belichtet
(4) Etodolac und GMP bei pH 7 mit UV-A 50 min belichtet

3.6.5 Ergebnisse der photochemischen Umsetzung von Etodolac mit Tryptophan

Etodolac wurde in Gegenwart von UV-A Licht mit der Aminosäure Tryptophan bestrahlt. In den folgenden drei Graphiken sind die Untersuchungsergebnisse dieser Studie abgebildet. Die Abbildung 93 zeigt die Belichtung von Etodolac in Anwesenheit von Tryptophan. Der Kurvenverlauf, der den photochemischen Abbau von Etodolac und die Entwicklung der Photoprodukte widerspiegelt, ist mit der alleinigen Bestrahlung von Etodolac in Abbildung 87 vergleichbar. Außerdem ist bei der Belichtung von Etodolac in Anwesenheit von Tryptophan in allen Chromatogrammen ein neuer Peak (NEU) zu sehen, der mit zunehmender Belichtung größer wurde, dieser wurde auch graphisch ausgewertet.

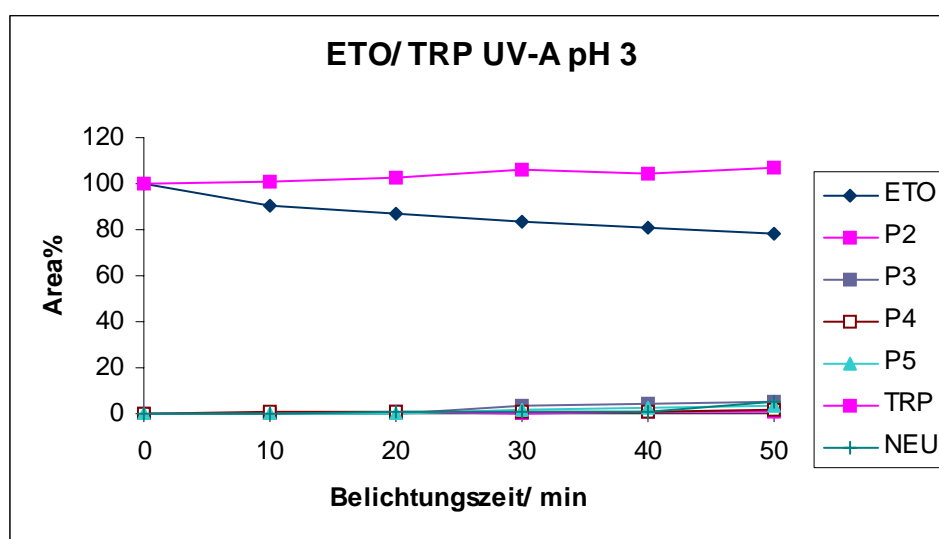


Abb. 93: Photozersetzung von ETO/ TRP bei pH 3 und UV-A Belichtung

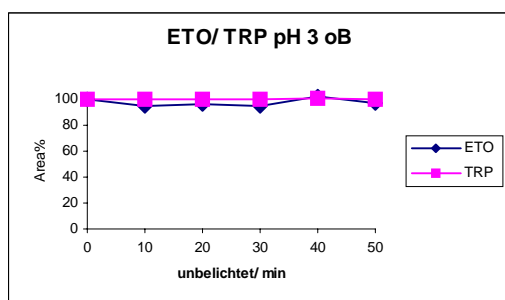


Abb. 94: ETO/ TRP bei pH 3 unbelichtet

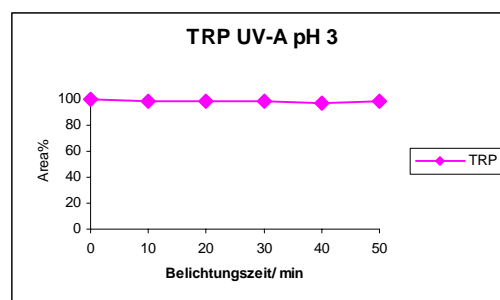


Abb. 95: TRP bei pH 3 und UV-A Belichtung

Bei der Kontrolluntersuchung (Abbildung 94) wurde die Probe bestehend aus Etodolac und in Anwesenheit von Tryptophan 0, 10, 20, 30, 40 und 50 min lang im Photoreaktor ohne Belichtung untersucht. Außerdem wurde Tryptophan alleine unter gleichen Bedingungen mit

Belichtung untersucht (Abbildung 95). Nach der 50 min Belichtung wurde für die Peakfläche des Tryptophans ein Wert von 98% gemessen.

Eine statistische Auswertung über die Regressionsgerade der Tryptophan-Kurve in Abbildung 93 ist nicht möglich, weil unter dem Peak von Tryptophan ein Photoprodukt des Etodolacs liegt. Die Tryptophan-Kurve weist aus diesem Grund einen steigenden Verlauf auf.

In der Abbildung 96 sind vier Chromatogramme der Untersuchung von Etodolac und Tryptophan dargestellt.

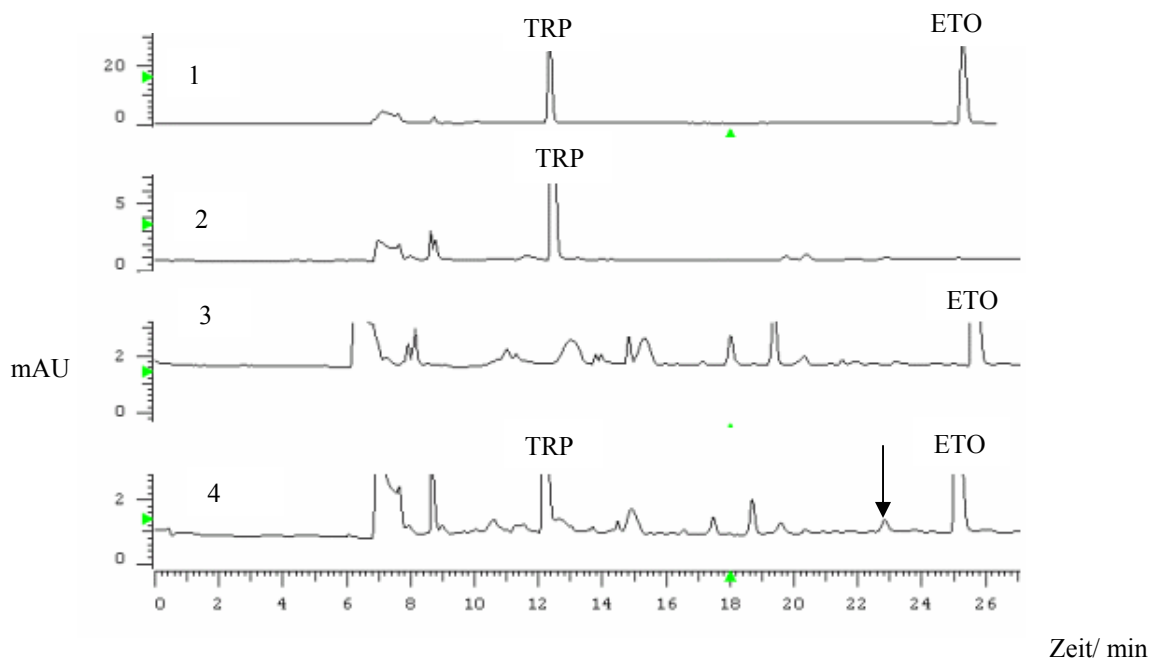


Abb. 96: (1) Etodolac mit Tryptophan bei pH 3 unbelichtet
(2) Tryptophan 50 min bei pH 3 mit UV-A belichtet
(3) Etodolac 50 min bei pH 3 mit UV-A belichtet
(4) Etodolac mit Tryptophan 50 min bei pH 3 mit UV-A belichtet

Das Chromatogramm 1 zeigt die unbelichtete Probe von Etodolac und Tryptophan. In dem zweiten Chromatogramm wurde Tryptophan 50 min mit UV-A Licht bestrahlt. Im Chromatogramm 3 wurde Etodolac alleine 50 min im Photoreaktor bestrahlt und in Chromatogramm 4 wurde Etodolac in Anwesenheit von Tryptophan 50 min belichtet. Beim Vergleichen aller Chromatogramme ist festzustellen, dass aus der alleinigen Bestrahlung von Etodolac ein ähnliches Spektrum an Photoprodukten entsteht wie bei der Bestrahlung von Etodolac in Anwesenheit von Tryptophan. Darüber hinaus entsteht bei der Bestrahlung von Etodolac in Gegenwart von Tryptophan ein neues Photoprodukt, das in Chromatogramm 4 bei einer Retentionszeit von 22,9 min liegt.

3.6.6 Ergebnisse der photochemischen Umsetzung von Etodolac mit Alanyltryptophan

In einem weiteren Experiment wurde Etodolac mit dem Dipeptid Alanyltryptophan in Gegenwart von UV-A Licht bei pH 3 und pH 7 untersucht. Zuerst wurde die Untersuchung bei pH 3 mit einer äquimolaren Probelösung von Etodolac und Alanyltryptophan durchgeführt. In der Abbildung 97 sind die Ergebnisse der Bestrahlung von Etodolac mit dem Dipeptid als prozentuale Peakflächen der Stoffe in Abhängigkeit zu den unterschiedlichen Bestrahlungszeiten abgebildet. Der photochemische Abbau des Etodolacs und die resultierenden Photoprodukte sind mit der alleinigen Bestrahlung von Etodolac in Abbildung 87 vergleichbar.

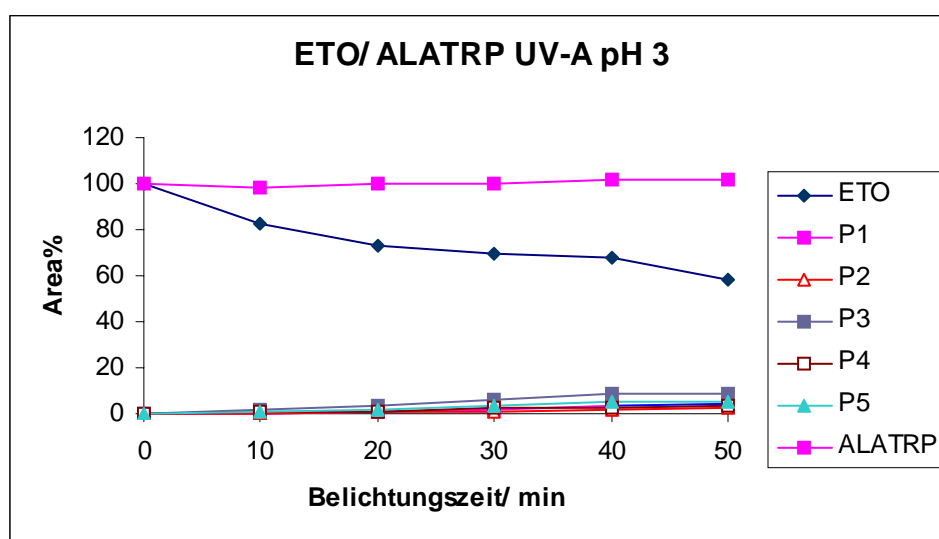


Abb. 97: Photozersetzung von ETO/ ALATRP bei pH 3 und UV-A Belichtung

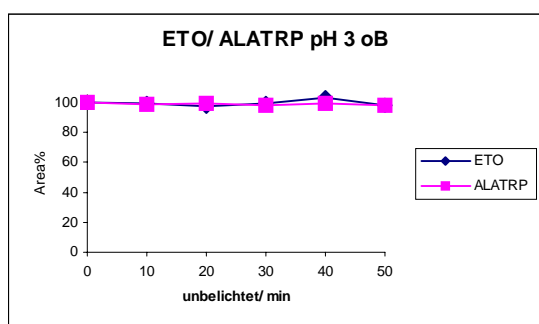


Abb. 98: ETO/ ALATRP bei pH 3 unbelichtet

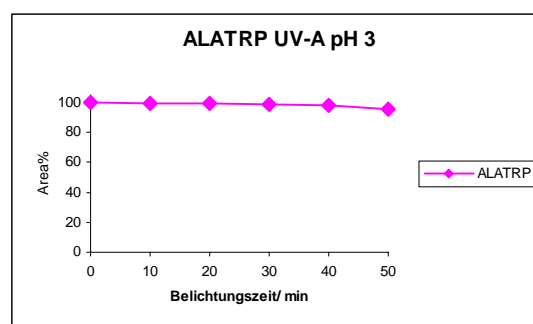


Abb. 99: ALATRP bei pH 3 und UV-A Belichtung

In der Abbildung 98 wurde Etodolac in Gegenwart von Alanyltryptophan unter den gleichen Bedingungen nochmals untersucht, diesmal aber ohne Bestrahlung. Der Kurvenverlauf weist einen waagerechten geradlinigen Verlauf auf. In der Abbildung 99 ist die alleinige Bestrahlung von Alanyltryptophan zu erkennen. Mit zunehmender Belichtungszeit wurde das Alanyltryptophan im geringem Maße photochemisch degradiert.

Die statistische Auswertung über die Regressionsgerade der Alanyltryptophan-Kurve in Abbildung 97 ist nicht möglich, da ein Photoprodukt des Etodolacs unter dem Alanyltryptophan-Peak liegt. Die Alanyltryptophan-Kurve weist deshalb einen steigenden Kurvenverlauf auf.

In Abbildung 100 sind vier Chromatogramme dieser Studie zu sehen. In Chromatogramm 1 ist die unbelichtete Probe von Etodolac mit Alanyltryptophan chromatographiert worden. Das Alanyltryptophan wurde nach einer Retentionszeit von 12,1 min eluiert, das Etodolac nach 25 min. Außer dem Signal, das durch die Ventilschaltung verursacht wurde, sind keine weiteren Peaks im Chromatogramm zu identifizieren. Bei der alleinigen 50 min Belichtung von Alanyltryptophan, abgebildet in Chromatogramm 2, sind nur sehr schwach weitere Peaks zu erkennen.

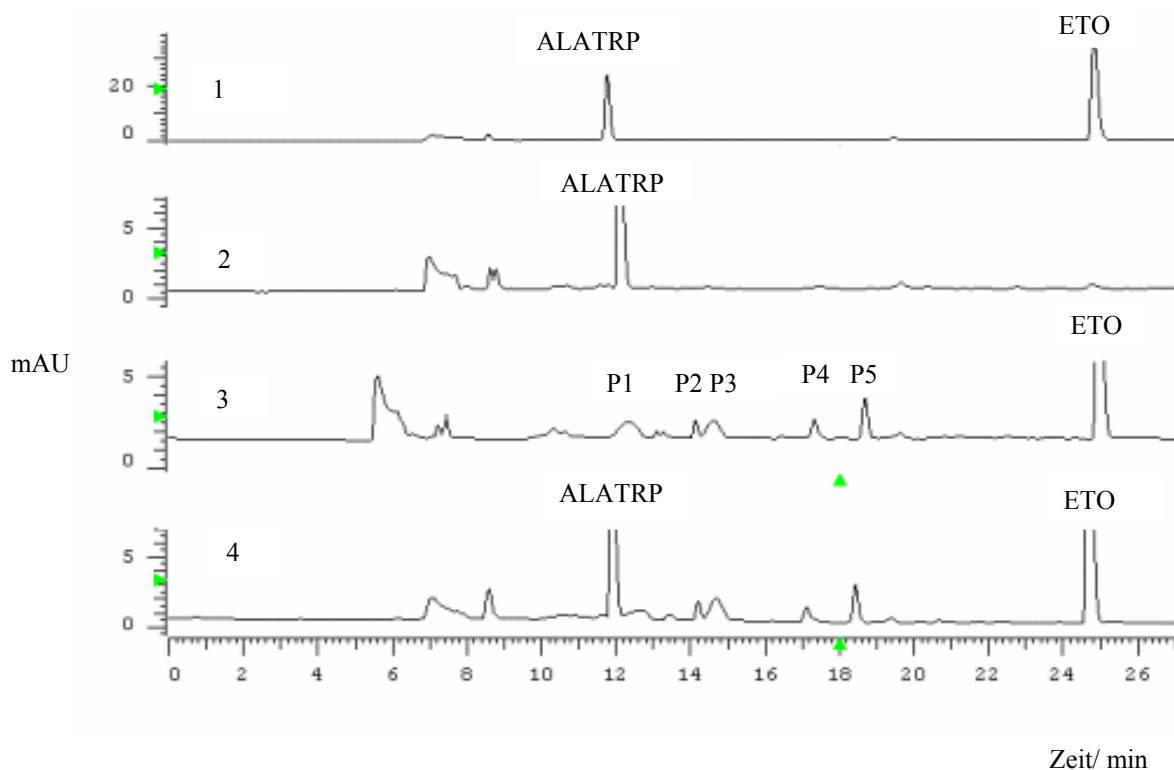


Abb. 100: (1) Etodolac mit Alanyltryptophan bei pH 3 unbelichtet
(2) Etodolac mit Alanyltryptophan 50 min bei pH 3 mit UV-A belichtet
(3) Etodolac 50 min bei pH 3 mit UV-A belichtet
(4) Alanyltryptophan 50 min bei pH 3 mit UV-A belichtet

In Chromatogramm 4 ist die 50 min lange UV-A Belichtung von Etodolac mit Alanyltryptophan zu sehen.

Vergleicht man das Spektrum der Peaks mit der alleinigen 50 min langen Bestrahlung von Etodolac, so ist festzustellen, dass die resultierenden Photoprodukte in beiden Chromatogrammen gleich sind. Folglich sind aus den primären Photoprodukten des Etodolacs keine weiteren sekundären Produkte durch das aktivierte Dipeptid entstanden.

Bei der Untersuchung von Etodolac mit Alanyltryptophan bei Bestrahlung in der wässrig phosphatgepufferten Lösung bei pH 3 wurden keine Wechselwirkungen zwischen dem Arzneistoff und dem Dipeptid festgestellt. Da die Reaktionen zwischen dem Arzneistoff und dem Dipeptid pH abhängig sein könnten, wurde die Untersuchung bei pH 7 wiederholt. Auch unter dieser Bedingung wurde keine Reaktion zwischen Etodolac und Alanyltryptophan bei Belichtung nachgewiesen.

3.6.7 Zusammenfassung

Bei Belichtung von Etodolac mit UV-A Licht in Gegenwart von GMP bei pH 3 und pH 7 konnte keine Wechselwirkung zwischen den Molekülen festgestellt werden. In der Untersuchung von Etodolac mit der Aminosäure Tryptophan konnte in geringen Mengen ein neues Photoprodukt nachgewiesen werden, dabei wurde das Tryptophan selber kaum photodegradiert. In den darauf folgenden Versuchen mit dem Dipeptid Alanyltryptophan konnte hingegen keine Wechselwirkung zwischen dem Arzneistoff und dem Biomolekül festgestellt werden. Es wurden keine zusätzlichen Photoprodukte nachgewiesen. Auch die Variation des pH-Wertes brachte keine neuen Erkenntnisse. Anhand der Untersuchungsergebnisse kann auf kein phototoxisches Potential von Etodolac zurückgeschlossen werden. Da das untersuchte Dipeptid in Gegenwart von Etodolac nicht durch das photochemisch aktivierte Etodolac zu Photoprodukten degradiert wurde und bei der Untersuchung mit Tryptophan nur eine schwache Wechselwirkung beobachtet wurde, kann dieses Ergebnis nur auf ein geringes photoallergenes Potential hindeuten.

3.7 Untersuchungen zur photochemischen Stabilität von Nifedipin und dessen photochemischer Reaktivität gegenüber Biomolekülen

3.7.1 Einführung

Nifedipin gehört zur Arzneistoffgruppe der Calcium-Antagonisten und wird in der Bluthochdrucktherapie eingesetzt. Nifedipin wird unter Lichteinwirkung in das therapeutisch unwirksame 4-(2-Nitrosophenyl)-pyridin-Derivat umgewandelt (Schlossmann, 1972). Dabei findet unter Wasserabspaltung eine intramolekulare Redoxreaktion statt. Es gilt als wahrscheinlich, dass nach Anregung der Nitrogruppe das γ -Wasserstoffatom (4-H) auf das radikalische Sauerstoffatom der Nitrogruppe übertragen wird (Görlitzer et al., 1996). Das gebildete Diradikal kann zum N-Hydroxy-isoxazolin cyclisiert und anschließend zur γ -Hydroxy-nitrosophenyl-Verbindung aufgespalten werden, die sich unter Wassereliminierung zum Pyridin stabilisiert (Abbildung 101). Bei der Bestrahlung von Nifedipin mit UV-Licht kann auch in geringen Mengen das Hydroxylamin-Derivat gebildet werden, das wiederum intramolekular Methanol zu Pyrido[3,4-c]-chinolin abspalten kann.

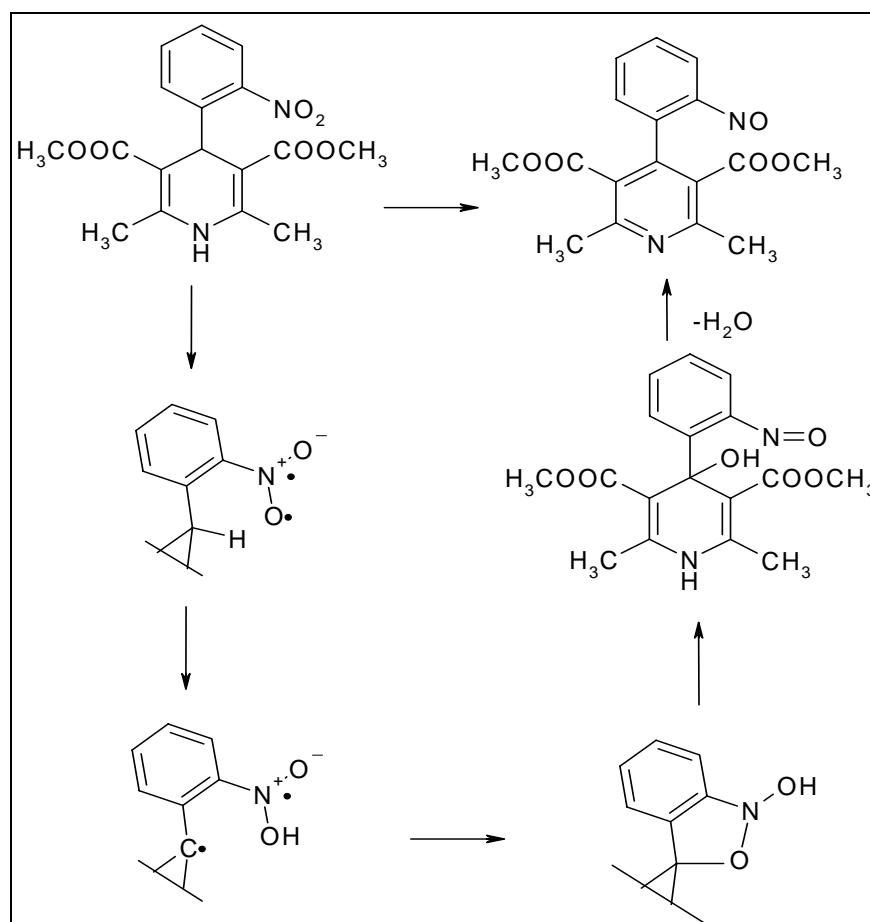


Abb. 101: Photochemischer Abbau von Nifedipin

Es besteht kein Unterschied zwischen UV-A und Tageslicht hinsichtlich der kinetischen Entstehung der Photoprodukte (Henk et al., 1995).

Während der Einnahme von Nifedipin wurde häufig von unerwünschten Nebenwirkungen berichtet, wie z. B. Photodermatitis (Zenarola et al., 1991). Im Rahmen von in vitro Untersuchungen mit Mikroorganismen und in Zellversuchen stellte sich Nifedipin als phototoxisch heraus. Dabei ist aber zu beachten, dass die eingesetzten Konzentrationen höher waren als therapeutische Dosen (Guarrera et al., 1990; Gibbs et al., 1992). Die hohe Reaktivität der Nitroso-Gruppe des Photozwischenproduktes könnte für Reaktionen mit Biomolekülen ausschlaggebend sein.

3.7.2 Chromatographische Bedingungen der Nifedipin Untersuchungen

Das GMP und das Alanyltryptophan wurde mit pH 7 phosphatgepufferter wässriger mobiler Phase direkt über die Säule 1 chromatographiert, Nifedipin wurde in dieser Zeit auf der Säule 1 angereichert. Die Säulenschaltung wurde bei der Untersuchung zu GMP nach 7,5 min von Load auf Injekt umgeschaltet (s. Tab. 8). Aufgrund der längeren Retentionszeit von Alanyltryptophan wurde bei den Untersuchungen zum Dipeptid erst nach 14,5 min in die Injekt Position umgeschaltet (s. Tab. 9). Zur chromatographischen Trennung des Nifedipins und seiner Photoprodukte über die Säule 2 wurde unter isokratischen Bedingungen gearbeitet. Als Puffer des Acetonitril/ Puffergemisches wurde der gleiche wässrige Phosphatpuffer eingesetzt, der für die Pumpe 1 und die Bestrahlung verwendet wurde. Die Fließgeschwindigkeit der beiden Pumpen wurde auf 1ml/ min eingestellt.

	Zeit (min)	0	7.5	30.0
Pumpe 1	Puffer%	100	100	100
Pumpe 2	Puffer%	65	65	65
	Acetonitril%	35	35	35

Tab. 8: Gradientenprofil und Schaltplan der beiden Pumpen für die Nifedipin/ GMP Untersuchung

	Zeit (min)	0	14.5	30.0
Pumpe 1	Puffer%	100	100	100
Pumpe 2	Puffer%	65	65	65
	Acetonitril%	35	35	35

Tab. 9: Gradientenprofil und Schaltplan der beiden Pumpen für die Nifedipin/ ALATRP Untersuchung

3.7.3 Ergebnisse der Photostabilitätsuntersuchungen von Nifedipin

Die photochemische Untersuchung wurde in pH 7 phosphatgepufferter wässriger Lösung durchgeführt. Aufgrund der hohen Lichtempfindlichkeit von Nifedipin wurde die Belichtungszeit mit dem UV-A-Strahler bei der längsten Bestrahlung mit 10 min festgelegt. Die injizierten Probelösungen wurden 0, 2, 4, 6, 8 und 10 min im Photoreaktor bestrahlt. In der Abbildung 102 ist die Belichtung von Nifedipin und die Entstehung der Photozerfallsprodukte als prozentuale Peakfläche in Abhängigkeit von der Belichtungszeit graphisch dargestellt. Nach der 2 min Belichtung mit UV-A Licht sind 7% des Nifedipins noch nicht photochemisch zerfallen. Insgesamt wurden 4 der entstandenen Photoprodukte graphisch ausgewertet.

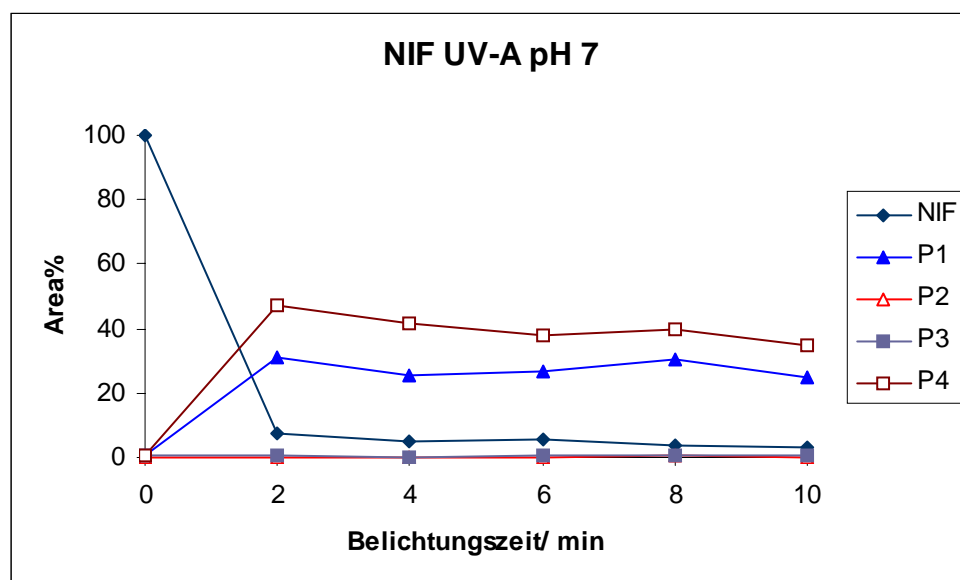


Abb. 102: Photozersetzung einer wässrigen phosphatgepufferten Nifedipinlösung bei pH 7 mit der UV-A Lampe

3.7.4 Photochemische Umsetzung von Nifedipin mit 5-Guanosinmonophosphat

Bezüglich möglicher Wechselwirkungen zwischen den entstehenden Photoprodukten des Nifedipins mit der DNA wurde die Belichtungsstudie von Nifedipin mit der DNA-Base GMP durchgeführt. Nifedipin wurde dabei in An- und Abwesenheit von GMP mit und ohne Belichtung mit UV-A Licht untersucht. Außerdem wurde GMP alleine unter den gleichen Bedingungen behandelt. In Abbildung 103 ist der Verlauf der Bestrahlung von Nifedipin in

Anwesenheit von GMP zu sehen. Die Abbaurrate des Nifedipins und die resultierenden Photoprodukte sind anhand des Kurvenverlaufes mit der alleinigen Bestrahlung von Nifedipin (s. Abbildung 102) vergleichbar. Der Kurvenverlauf des GMP ist jedoch stark schwankend.

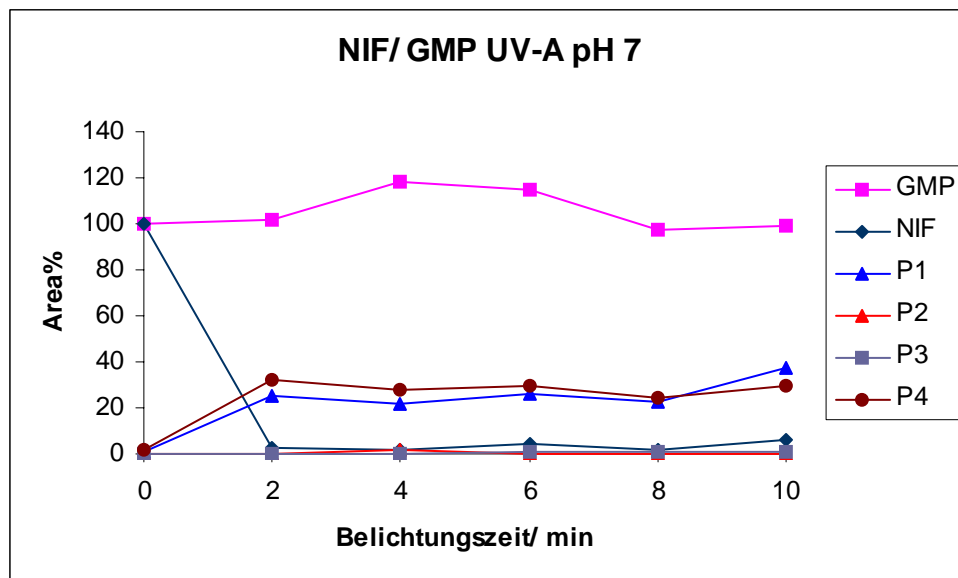


Abb. 103: Photozersetzung von NIF/ GMP bei pH 7 und UV-A Belichtung

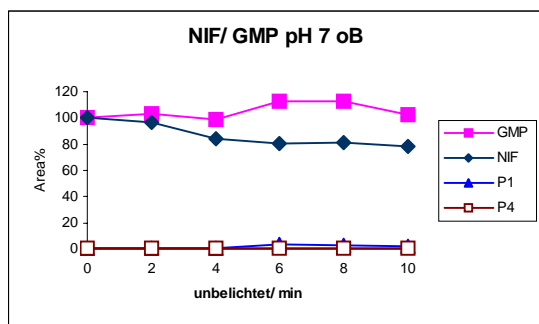


Abb. 104: NIF/ GMP bei pH 7 unbelichtet

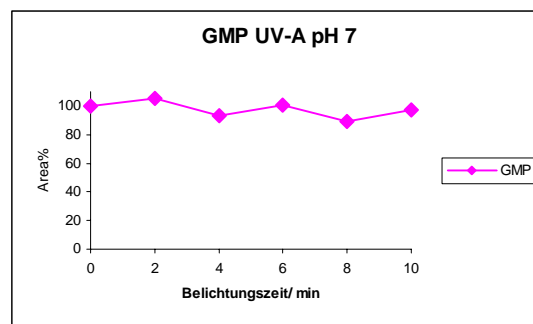


Abb. 105: GMP bei pH 7 mit UV-A belichtet

In der Abbildung 104 ist die Kinetik der unbelichteten Untersuchung von Nifedipin mit GMP abgebildet. Nifedipin wurde auch ohne Belichtung relativ schnell in die Produkte 1 und 4 abgebaut. Der Kurvenverlauf von dem GMP ist vergleichbar mit der Abbildung 103.

Die statistische Auswertung (beschrieben in Kap. 3.1.8) über die Regressionsgerade der GMP-Kurve in Abbildung 103 ergibt, dass die Steigung der Regressionsgeraden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ gleich Null ist. Die Steigung der Regressionsgeraden

des unbelichteten GMPs in Abbildung 104 ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0,1$ gleich Null. Vergleicht man die Steigung der Regressionsgeraden des GMPs in Abbildung 103 mit der Steigung der Regressionsgeraden des unbelichteten GMPs in Abbildung 104, so unterscheiden sich die beiden Steigungen nicht signifikant. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung lassen darauf schließen, dass das GMP bei Bestrahlung in Anwesenheit von Nifedipin nicht abgebaut wurde, da sich die Steigungen der Geraden nicht signifikant unterscheiden.

In der Abbildung 106 sind vier Chromatogramme exemplarisch dargestellt.

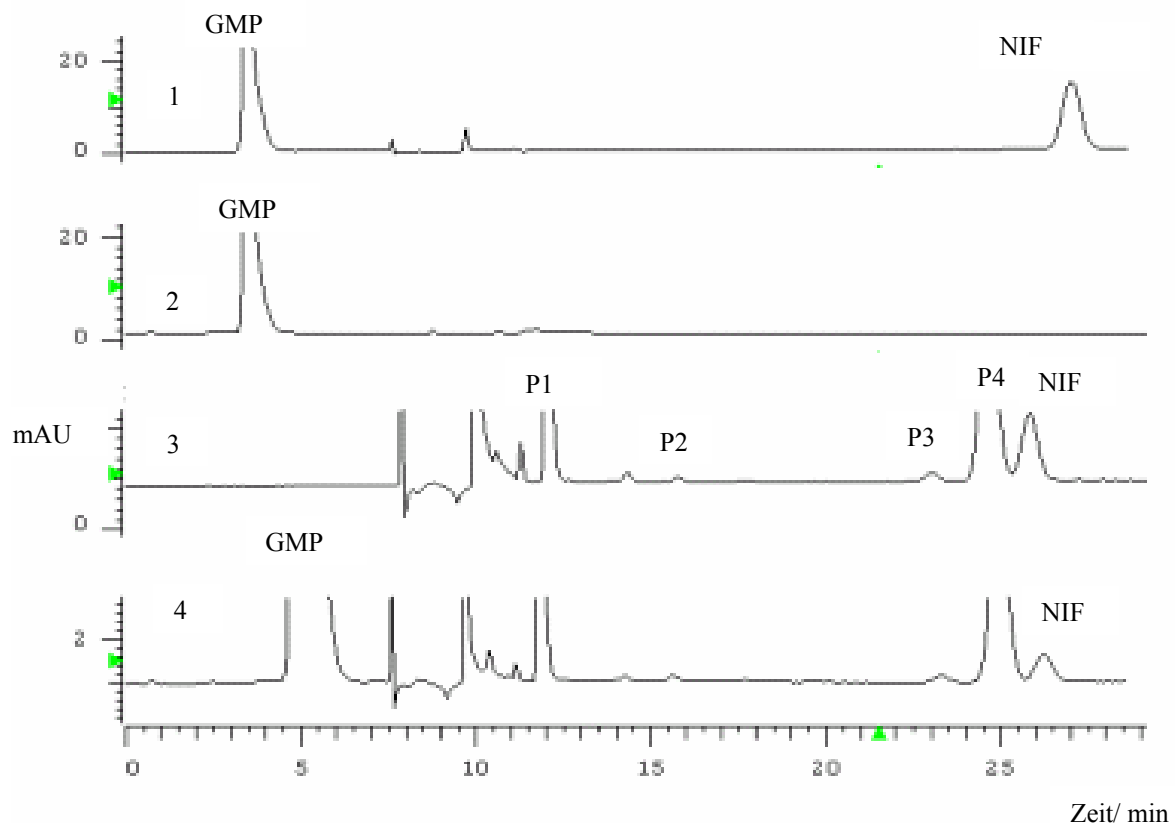


Abb. 106: (1) Nifedipin und GMP ohne UV-A Belichtung
(2) GMP 6 min mit UV-A Licht belichtet
(3) Nifedipin 6 min mit UV-A belichtet
(4) Nifedipin mit GMP 6 min mit UV-A belichtet

Die Chromatogramme sind stark vergrößert, um das entstehen möglicher neuer Photoprodukte zwischen GMP und aktivierten Photoprodukten von Nifedipin sichtbar zu machen. Bei der Untersuchung zu Chromatogramm 1 wurde die Probelösung bestehend aus GMP und Nifedipin unbelichtet chromatographiert. Das GMP, das über die Säule 1 eluiert wurde, ist im vorderen Teil des Chromatogramms zu sehen. Das Nifedipin wurde nach umschalten über die Säule 2 nach 26 min eluiert. In Chromatogramm 2 ist die 6 min Belichtung von GMP zu beobachten, in dem aber außer dem Systempeak keine weiteren Photoprodukte zu sehen sind.

In Chromatogramm 4 ist die 6 min Bestrahlung von Nifedipin in Anwesenheit von GMP abgebildet. Die resultierenden Peaks der Photoprodukte sind mit der alleinigen Belichtung von Nifedipin in Chromatogramm 3 vergleichbar. Folglich ist kein neues Photoprodukt aus GMP und den aktiven Photoprodukten des Nifedipins entstanden.

3.7.5 Ergebnisse zur photochemischen Umsetzung von Nifedipin mit Alanyltryptophan

Das photoallergische Potential von Nifedipin sollte mit dem Modell-Dipeptid Alanyltryptophan untersucht werden. Nifedipin wurde dabei in An- und Abwesenheit von Alanyltryptophan 0, 2, 4, 6, 8 und 10 min mit UV-A Licht bestrahlt. Die Untersuchungsergebnisse wurden in gewohnter Form graphisch dargestellt. In Abbildung 107 ist die Belichtung von Nifedipin in Anwesenheit von Alanyltryptophan dargestellt. Beim Vergleichen der Kurvenverläufe des Nifedipins und der Entwicklung der Photoprodukte mit der Abbildung 102 fällt auf, dass das Photoprodukt 1 einen höheren prozentualen Anteil in Gegenwart von Alanyltryptophan aufweist. Die prozentuale Peakfläche des Alanyltryptophans ist mit zunehmender Belichtungszeit leicht abnehmend und erreicht nach 10 min einen Wert von 78%. Bei der alleinigen Belichtung von Alanyltryptophan (Abbildung 109) wurde nach der 10 min Bestrahlung ein prozentualer Wert von 95% detektiert.

Die statistische Auswertung (beschrieben in Kap. 3.1.8) über die Regressionsgerade der Alanyltryptophan-Kurve in Abbildung 107 ergibt, dass die Steigung der Regressionsgeraden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ gleich Null ist. Die Steigung der Regressionsgeraden des unbelichteten Alanyltryptophans in Abbildung 108 ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ gleich Null. Vergleicht man die Steigung der Regressionsgeraden des Alanyltryptophans in Abbildung 107 mit der Steigung der Regressionsgeraden des unbelichteten Alanyltryptophans in Abbildung 108, so unterscheiden sich die beiden Steigungen nicht signifikant. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung lassen darauf schließen, dass Alanyltryptophan bei Bestrahlung in Anwesenheit von Nifedipin nicht abgebaut wurde, da die Steigung der Regressionsgeraden gleich Null ist.

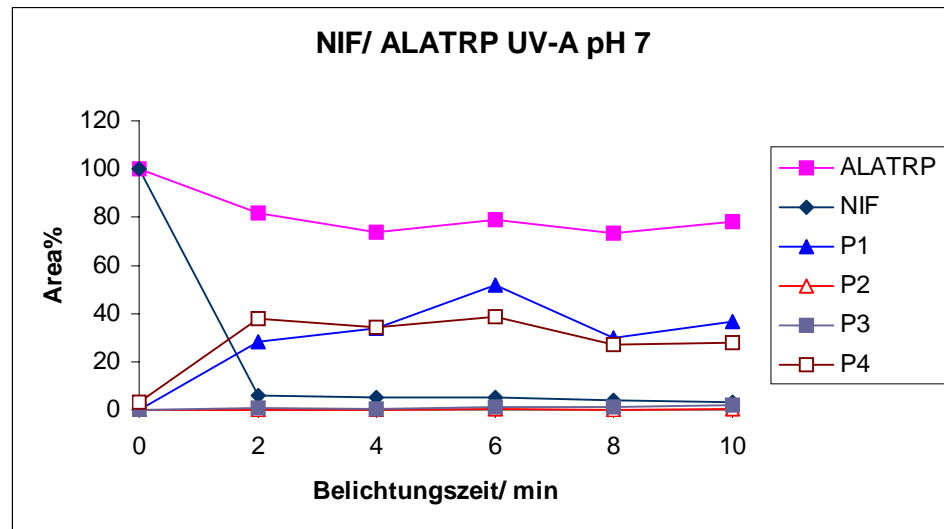


Abb. 107: Photozersetzung von NIF/ ALATRP bei pH 7 und UV-A Belichtung

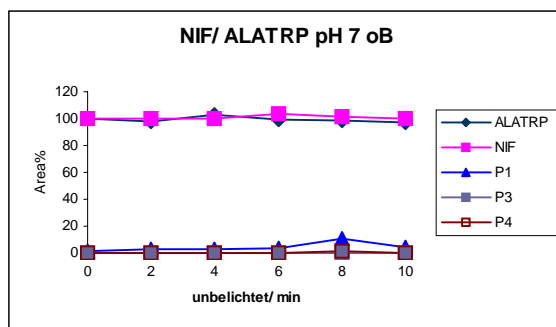


Abb. 108: NIF/ ALATRP bei pH 7 unbelichtet

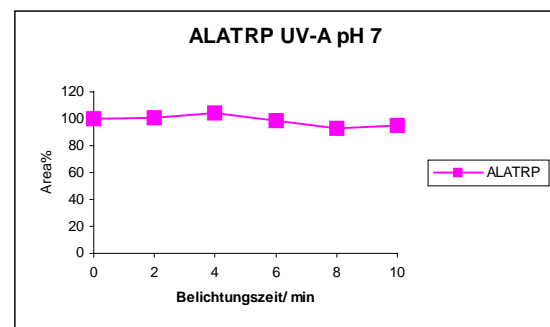


Abb. 109: ALATRP mit UV-A belichtet

In Abbildung 110 sind vier Chromatogramme dieser Untersuchung dargestellt. In Chromatogramm 1 wurde die Probe bestehend aus Alanyltryptophan und Nifedipin ohne Belichtung chromatographiert. Das Alanyltryptophan wurde nach 12,4 min eluiert, kurz darauf wurde die Säulenschaltung in die Injekt Position umgeschaltet und das Nifedipin wurde nach 32,5 min eluiert. Im vorderen Bereich bei 5,3 min ist außerdem in allen vier Chromatogrammen der Peak des Acetons zu sehen, der zum Anlösen des Nifedipins in geringen Mengen eingesetzt wurde.

In Chromatogramm 4 ist die 6 min Bestrahlung von Nifedipin in Anwesenheit von Alanyltryptophan abgebildet. Vergleicht man hier wieder das Spektrum der Photoprodukte mit der alleinigen 6 min Belichtung von Nifedipin in Chromatogramm 3, so sind keine neuen weiteren Peaks möglicher Photoprodukte zu erkennen.

Möglicherweise hat das Photoprodukt 1 mit dem photodegradierten Alanyltryptophan reagiert, so wäre der ansteigende Kurvenverlauf des P1 und der abfallende Kurvenverlauf von Alanyltryptophan in Gegenwart von Alanyltryptophan zu erklären.

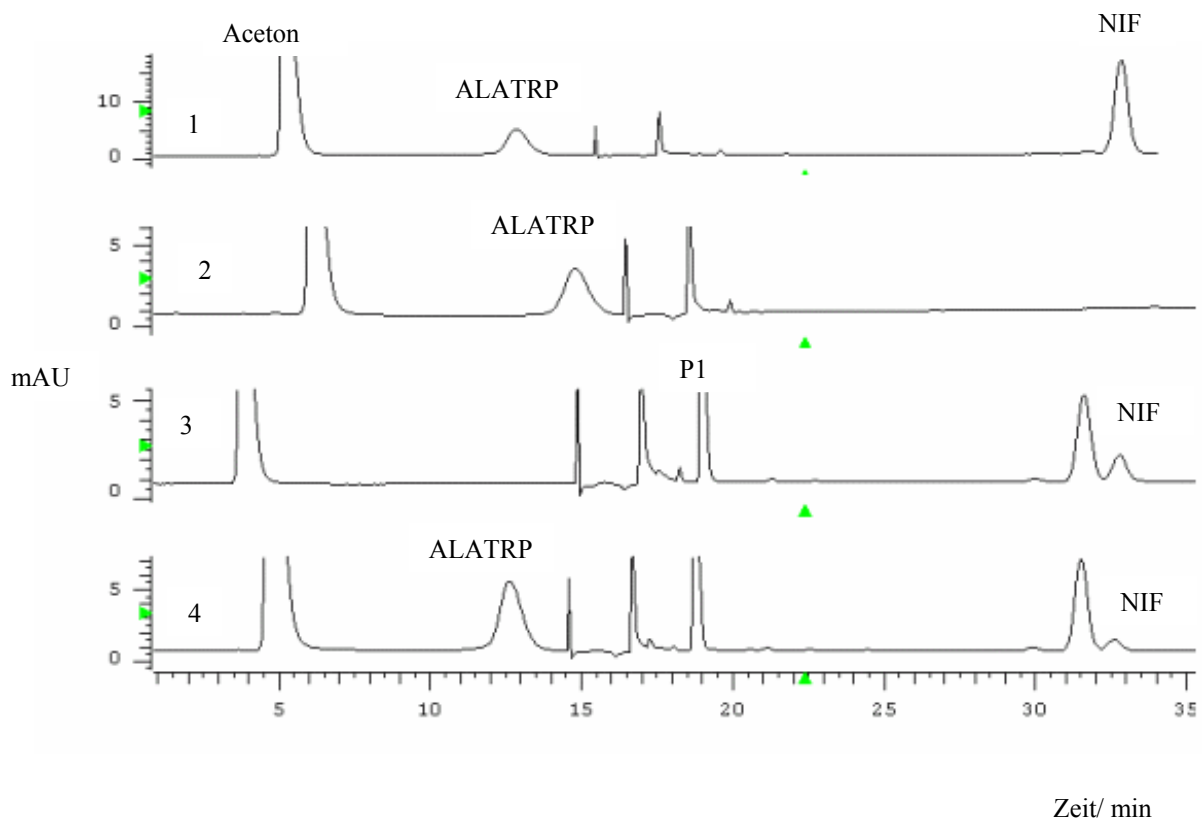


Abb. 110: (1) Nifedipin und Alanyltryptophan ohne UV-A Belichtung
(2) Alanyltryptophan 6 min mit UV-A belichtet
(3) Nifedipin 6 min mit UV-A belichtet
(4) Nifedipin mit Alanyltryptophan 6 min mit UV-A belichtet

3.7.6 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde der photochemische Abbau von Nifedipin untersucht. Darüber hinaus wurde Nifedipin mit dem Dipeptid Alanyltryptophan und der DNA-Base GMP photochemisch untersucht. In der Untersuchung zu Nifedipin und Alanyltryptophan konnten keine neuen Photoprodukte im Chromatogramm identifiziert werden, aber es wurde bei

zunehmender Belichtungsdauer ein beschleunigter Abbau des Dipeptids beobachtet. Dazu wurde ebenfalls ein gleichzeitiger Anstieg der prozentualen Peakfläche von dem Photoprodukt 1 des Nifedipins festgestellt. Möglicherweise ist dieses Photoprodukt mit einem Photoprodukt des Alanyltryptophans eine Reaktion eingegangen. Das phototoxische Potential von Nifedipin konnte mit der Modellsubstanz GMP nicht nachgewiesen werden, da bei der Bestrahlung von Nifedipin mit GMP keine Photoprodukte gefunden wurden und keine Wechselwirkungen beobachtet wurden, die aus den beiden Edukten hervorgegangen sein könnten. Durch den beschleunigten Abbau von dem Dipeptid ist möglicherweise von einem photoallergischen Potential auszugehen.

3.8 Einsatz von Protoporphyrinen in der Photodynamischen Therapie

3.8.1 Einführung

Schon im frühen 19. Jahrhundert beschrieb von Tappeiner in der Münchner medizinischen Wochenschrift (von Tappeiner und Jesionek 1900), dass sich fluoreszierende Stoffe zu Diagnostik und Therapie in der Dermatologie einsetzen lassen. Hausmann sensibilisierte schon 1911 Mäuse subkutan mit Hämatoporphyrin und exponierte sie dem Sonnenlicht. An den Versuchstieren zeigten sich Reizungen, Rötungen, Schwellungen der Haut (Hausmann, 1911). Heute findet die Photodynamische Therapie bei Hauterkrankungen wie Psoriasis und Hauttumoren Anwendung (Dougherty et al., 1978). Als weitere Einsatzmöglichkeiten kommen die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) und Frühkarzinome der Lunge in Frage (Balchum et al., 1984). Durch die vielseitigen Indikationsmöglichkeiten werden mögliche Behandlungsmöglichkeiten bei Gallenwegskarzinomen, Blasen- und Prostatakarzinomen, Restenosisierung (Waksman et al., 2006), und im kosmetischen Bereich bei der Cellulite erprobt.

Das Prinzip der Photodynamischen Therapie basiert auf der Applikation eines nicht toxischen Photosensitizers und der gezielten Bestrahlung von malignen Stellen mit Licht einer definierten Wellenlänge. Dabei werden Photosensibilisatoren eingesetzt, die unter Lichteinwirkung ROS freisetzen und so die DNA oxidativ schädigen (Kawanishi et al., 1986) und zum Untergang der Zelle führen. Man spricht auch von „photodynamischer Aktivität“ (Cadet et al., 1990).

Metalloporphyrine sind in der Lage mit der DNA auch ohne Einwirkung von Licht Komplexe auszubilden (Lipscomb et al., 1996).

Wichtige Photosensibilisatoren in der Photodynamischen Therapie sind die Porphyrine. Strukturell bestehen Porphyrine aus vier Pyrrolringen, die über Methinbrücken zu einem Tetrapyrrolysystem verbunden sind. Die Porphyrine zeigen ein spezifisches Absorptionsverhalten gegenüber sichtbarer und ultravioletter Strahlung. Bei etwa 400 nm zeigen diese Verbindungen meist die höchste Lichtabsorption. Da sich die Porphyrine bevorzugt im neoplastischen Gewebe anreichern und bei Bestrahlung mit UV-Licht nur im neoplastischen Gewebe fluoreszieren, wird diese Eigenschaft zur Photodynamischen Diagnostik eingesetzt.

Die Porphyrine sind farbige Verbindungen und sind bei vielen Lebewesen und Pflanzen ubiquitär vorhanden. Die Biosynthese der Porphyrine läuft in den Mitochondrien und im Cytosol ab. Ausgehend vom Succinyl-CoA wird durch Kondensation mit Glycin die 5-

Aminolävulinsäure im Mitochondrium gebildet. Nach der Übertragung in das Cytosol kondensieren zwei Moleküle 5-ALA zu Porphobilinogen der Pyrrolvorstufe der Porphyrine. Anschließend kondensieren drei Porphobilinogenmoleküle unter Abspaltung von Ammoniak zum Tetrapyrrol und dieses wird zum Uroporphyrinogen (III) zyklisiert. Danach werden die Acetatgruppen aller 4 Ringe zu Methylgruppen decarboxyliert und das Koproporphyrinogen (III) entsteht und geht wieder in das Mitochondrium über.

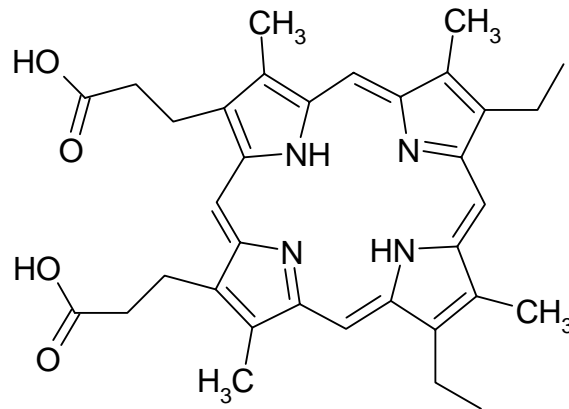


Abb.111: Struktur von Protoporphyrin (IX)

Durch Einführungen von Doppelbindungen in den Porphyrinring und die Umwandlung von zwei Propionatseitenketten in Vinylgruppen wird das Protoporphyrin (IX) gebildet. Das Protoporphyrin (IX) wird durch Fe^{2+} Einlagerung zum Häm Molekül.

Das Tetrapyrrolysystem kann mit verschiedenen Seitenketten substituiert werden. Damit kann die Anreicherung im Gewebe und die photodynamische Wirkung beeinflusst werden.

3.8.2 Chromatographische Bedingungen der Protoporphyrin Untersuchungen

Für die chromatographischen Untersuchungen zu Protoporphyrin und den DNA-Einzelsträngen wurde das Gradientenprofil der Methode von Hydrochlorothiazid und den DNA-Einzelsträngen als Vorlage benutzt. Da das Protoporphyrin aber sehr lipophil ist, wurde der Acetonitrilanteil in der letzten Stufe auf 70% erhöht. Als mobile Phase der Pumpe 1 wurde eine wässrige phosphatgepufferte auf pH 7 eingestellte Phase eingesetzt. Dieser Puffer wurde ebenfalls bei dem Acetonitril/ Puffergradienten der Pumpe 2 eingesetzt (s. Tab. 10). Die gesamte Probe, bestehend aus den Ausgangsstoffen und den resultierenden Photoprodukten wurde nach der UV-A Belichtung kurz auf der Säule 1 angereichert und dann über die Säule 2 chromatographiert. Der Fluss der beiden Pumpen betrug 1 ml/ min.

	Zeit (min)	0	3.0	10.0	26.0	40.0
Pumpe 1	Puffer%	100	100	100	100	100
Pumpe 2	Puffer%	99	99	99	75	30
	Acetonitril%	1	1	1	25	70

Tab. 10: Gradientenprofil und Schaltplan der beiden Pumpen für die Protoporphyrin/ DNA Untersuchung

3.8.3 Ergebnisse der Photostabilitätsuntersuchungen von Protoporphyrin (IX)

Mit der entwickelten HPLC online Methode wurden die photodynamischen Untersuchungen zu Protoporphyrin (IX) in phosphatgepufferter wässriger Lösung durchgeführt. Der pH-Wert der Untersuchungslösungen wurde auf pH 7 eingestellt, damit auf physiologische Zusammenhänge zurückgeschlossen werden konnte. Zuerst wurde eine Lösung von Protoporphyrin (IX) mit der Tageslichtlampe 0, 10, 20, 30, 40 und 50 min bestrahlt und zum Vergleich die gleiche Untersuchungsreihe mit dem UV-A Strahler wiederholt.

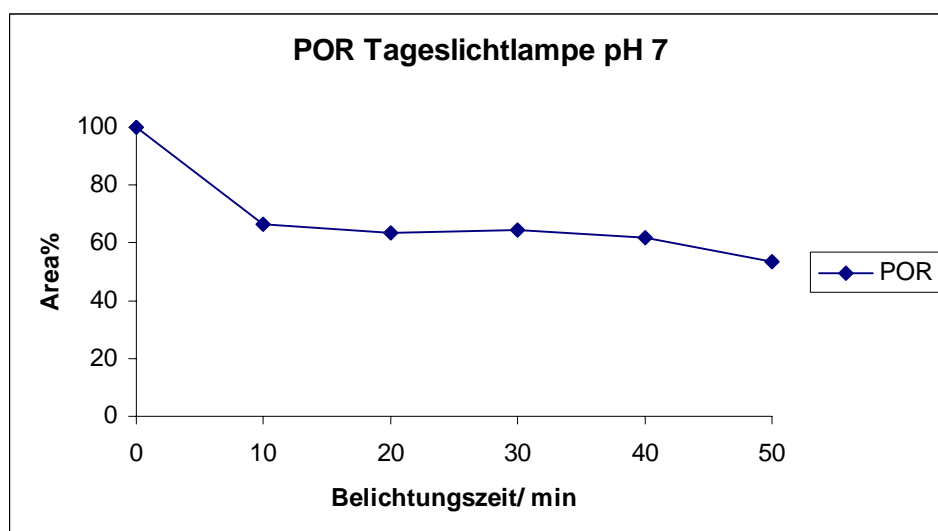


Abb. 112: Photozersetzung einer wässrigen phosphatgepufferten Protoporphyrinlösung bei Belichtung mit der Tageslichtlampe

Insgesamt nimmt die prozentuale Peakfläche des Protoporphyrins bei zunehmender Belichtungszeit ab. Der photochemische Abbau erfolgt dabei aber nicht linear. Nach einer Belichtungszeit von 10 min wurden 66% des Protoporphyrins noch nicht photochemisch umgesetzt. Bei 50 min Belichtung sinkt der Protoporphyrinanteil auf 53%. Zwischen 10 und 50 min wurde das Protoporphyrin langsamer photolytisch abgebaut als bei einer Bestrahlungsdauer von 10 min (Abbildung 112).

Nach dem Einbau der UV-A Lampe in den Photoreaktor wurde die Untersuchungsreihe mit einer frischen Probenlösung bei sonst gleichbleibenden Parametern wiederholt. Die Kinetik bei der UV-A Bestrahlung zeigt einen ähnlichen Verlauf im Vergleich zu der Kinetik mit der Tageslichtlampe. Bei der 10 min Belichtung mit UV-A Licht sind 55% des Protoporphyrins noch nicht photochemisch umgesetzt worden, nach der 50 min Belichtung beträgt der Gehalt des detektierten Protoporphyrins noch 46% (Abbildung 113). Aus dem Chromatogramm in Abbildung 114 wird ersichtlich, dass nur geringe Mengen an Photoprodukten bei einer Detektionswellenlänge von 254 nm ersichtlich werden.

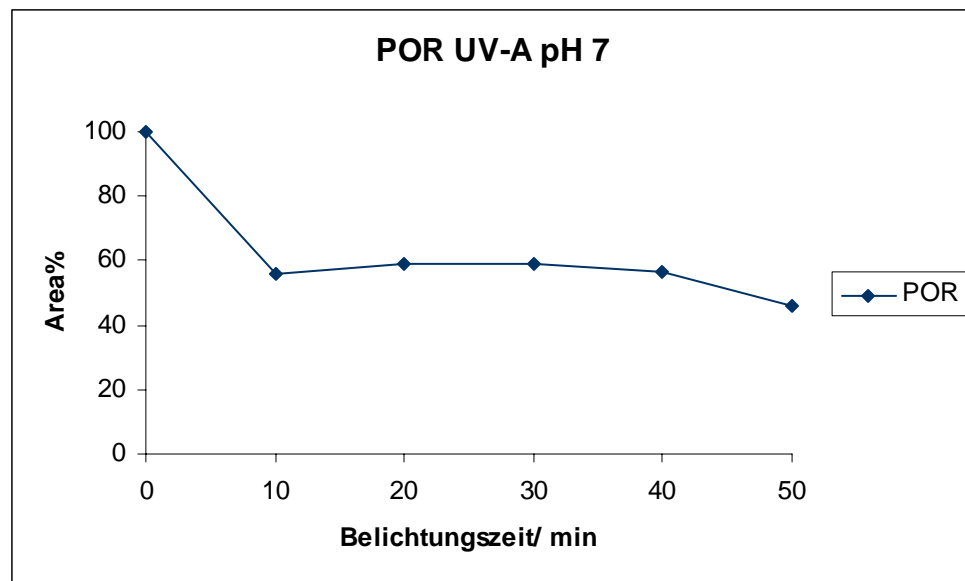


Abb. 113: Photozersetzung einer wässrigen phosphatgepufferten Protoporphyrinlösung bei Belichtung mit der UV-A Lampe

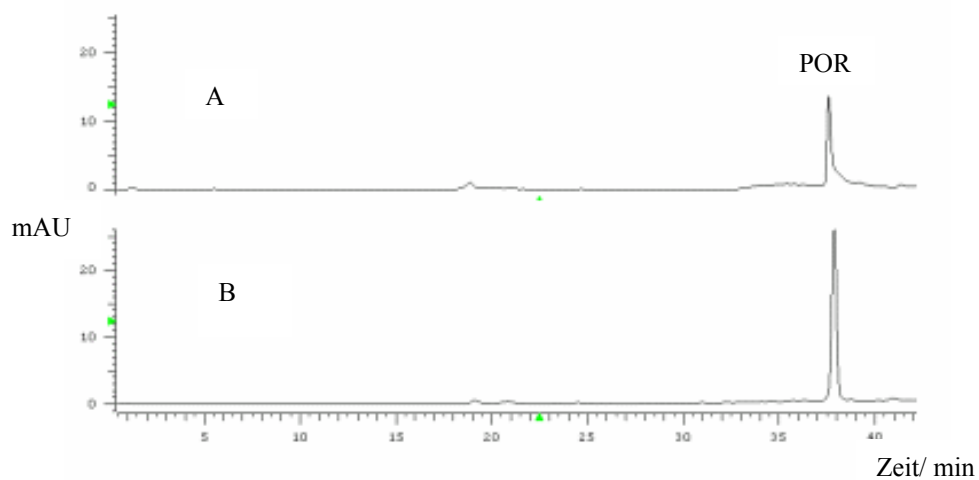


Abb. 114: (A) Protoporphyrin 50 min mit der UV-A Lampe belichtet
(B) Protoporphyrin 50 min mit der Tageslichtlampe belichtet

3.8.4 Ergebnisse der photochemischen Umsetzung von Protoporphyrin (IX) mit DNA-Einzelsträngen

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollen die Wechselwirkungen von Protoporphyrin (IX) mit Oligonukleotiden in An- und Abwesenheit von UV-A Licht untersucht werden. Die DNA-Einzelstränge wurden jeweils einzeln und in Anwesenheit von Protoporphyrin mit UV-A Licht bestrahlt und anschließend die resultierenden Produkte chromatographiert.

In den dargestellten Diagrammen wurde die prozentuale Peakfläche gegen die Belichtungszeit aufgetragen.

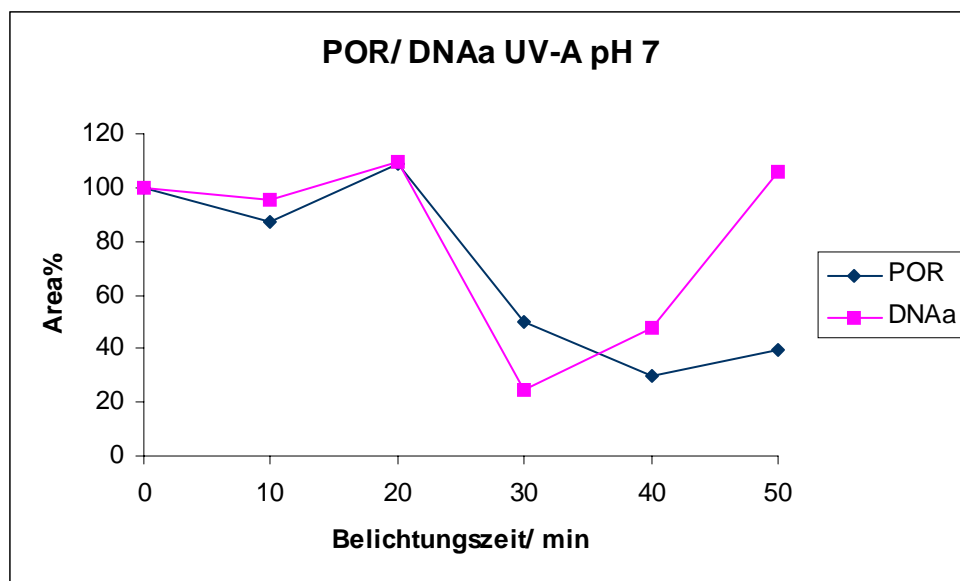


Abb. 115: Kinetischer Verlauf von POR und DNAa bei pH 7 und UV-A Belichtung

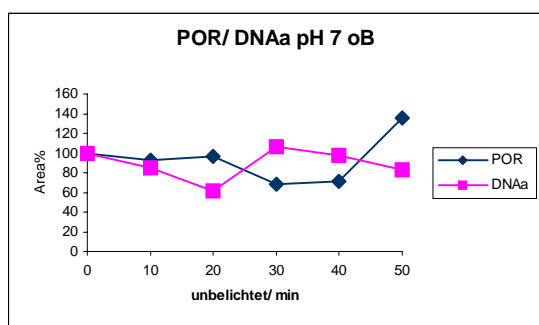


Abb. 116: POR und DNAa bei pH 7 unbelichtet

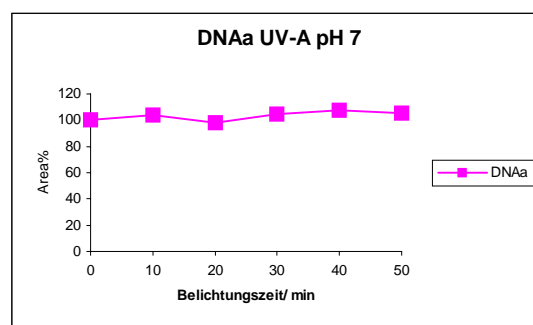


Abb.117: DNAa bei pH 7 und UV-A Belichtung

Aus der Abbildung 115 wird deutlich, dass die Belichtung von Protoporphyrin in Anwesenheit des DNAa-Stranges zu Wechselwirkungen führt. Die detektierte prozentuale Peakfläche des Protoporphyrins nimmt mit zunehmender Bestrahlung ab. Die geringste Peakfläche von dem Protoporphyrin wurde nach 40 min Belichtung mit der UV-A Lampe gemessen. Nach 50 min Belichtung ist die detektierte Peakfläche wieder auf 39% angestiegen. Der prozentuale Anteil der DNAa-Peakfläche nimmt in Gegenwart des Protoporphyrins mit zunehmender Bestrahlungsdauer vorerst ab. Bei der 50 min Belichtung steigt die detektierte Fläche jedoch auf 109% an. Zur Kontrolle wurde die gesamte Untersuchung ohne Belichtung wiederholt. Anhand des Kurvenverlaufes der Untersuchung, der in Abbildung 116 dargestellt ist, kann auch auf Wechselwirkungen zwischen dem Protoporphyrin und dem DNAa-Strang zurückgeschlossen werden. Eine statistische Auswertung der Kurven ist durch die große Streuung der Messwerte nicht möglich. Die alleinige Belichtung des DNAa-Stanges führt zu keinem photochemischen Abbau und zu keinen neuen Photoprodukten (Abbildung 117). Aus den abgebildeten Chromatogrammen in Abbildung 118, bei einer 0, 10, 40, 50 min langen Belichtungszeit mit UV-A Licht, wird der photochemische Abbau von dem Protoporphyrin in Anwesenheit von dem DNAa-Strang ersichtlich.

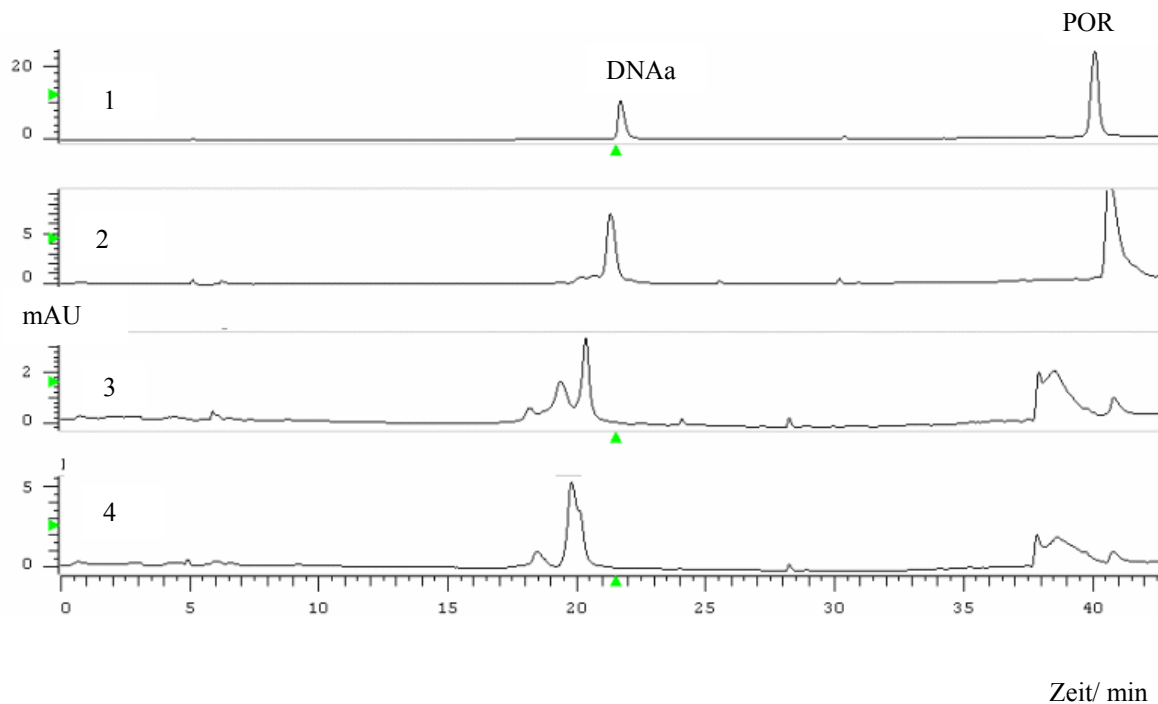


Abb. 118:(1) Protoporphyrin und DNAa ohne UV-A Belichtung
(2) Protoporphyrin und DNAa 10 min bei pH 7 mit UV-A belichtet
(3) Protoporphyrin und DNAa 40 min bei pH 7 mit UV-A belichtet
(4) Protoporphyrin und DNAa 50 min bei pH 7 mit UV-A belichtet

Im Chromatogramm 1, das ohne Belichtung mit der UV-A Lampe aufgenommen wurde sind die beiden Peaks des DNAa-Stranges und des Protoporphyrins zu sehen. Anhand der scharf aufgetrennten Peaks ist zuerkennen, dass noch keine Reaktion zwischen den beiden Edukten stattgefunden hat. Nach 10 min UV-A Bestrahlung, abgebildet in Chromatogramm 2, sind dem DNAa-Peak schon vereinzelte weitere Peaks unbekannter Verbindungen vorgelagert. Der Protoporphyrinpeak nimmt in der Peakbreite zu. Bereits nach 40 min Belichtung ist der DNAa-Peak in zwei weitere Peaks umgewandelt worden. Chromatogramm 4 zeigt die Untersuchung mit 50 min langer UV-A Belichtung. Hier hat sich die Peakform des DNAa-Stranges weiter verändert. Innerhalb und neben dem Protoporphyrin Peak sind ebenfalls neue Peaks zu beobachten, die hingegen nicht bei der alleinigen Bestrahlung des DNAa-Stranges und des Protoporphyrins in Abbildung 114 (A) ersichtlich werden. Die Überlagerung der Edukte DNAa und Protoporphyrin mit den aus der Bestrahlung resultierenden Photoprodukten erklärt den nicht linearen Verlauf der prozentualen Peakflächen, die gegen die Bestrahlungsdauer im Diagramm 115 dargestellt sind. Bei der Betrachtung der Chromatogramme der unbelichteten Untersuchungsreihen wird ersichtlich, dass es auch ohne Lichteinwirkung zu einer Reaktion zwischen dem DNAa-Einzelstrang und dem Protoporphyrin kommt (Abbildung 119).

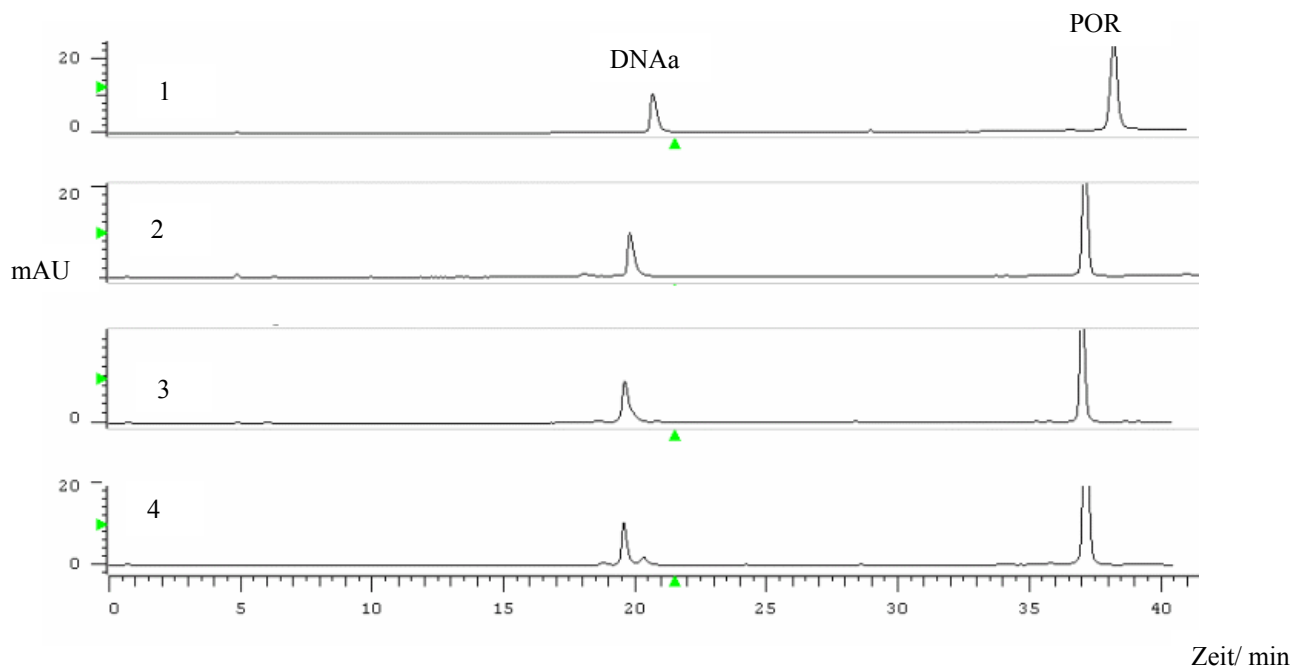


Abb. 119:(1) Protoporphyrin und DNAa ohne UV-A Belichtung

(2) Protoporphyrin und DNAa 10 min bei pH 7 ohne UV-A Belichtung

(3) Protoporphyrin und DNAa 40 min bei pH 7 ohne UV-A Belichtung

(4) Protoporphyrin und DNAa 50 min bei pH 7 ohne UV-A Belichtung

In Chromatogramm 1, 2 und 3 also bei 0, 10 und 40 min Standzeit im Photoreaktor ohne Lichteinwirkung sind um den DNAa-Peak nur bei starker Vergrößerung weitere kleinere Peaks zu beobachten. Im Chromatogramm 4 ist die 50 min Untersuchung dargestellt, hier ist deutlich zu erkennen wie der DNAa-Peak in zwei weitere Peaks umgewandelt worden ist. Dieses deutet daraufhin, das möglicherweise das Protoporphyrin zu einem Bruch des DNAa-Stranges geführt hat.

Die gesamte Untersuchungsreihe, die zu dem DNA-antisense-Strang durchgeführt wurde, wurde anschließend mit dem DNA-sense-Strang wiederholt. In Abbildung 120 ist die Belichtung des DNAs-Stranges in Gegenwart des Protoporphyrins dargestellt. Die Peakfläche des Protoporphyrins nimmt zunächst ab, steigt aber bei der 40 und 50 min Belichtung wieder an.

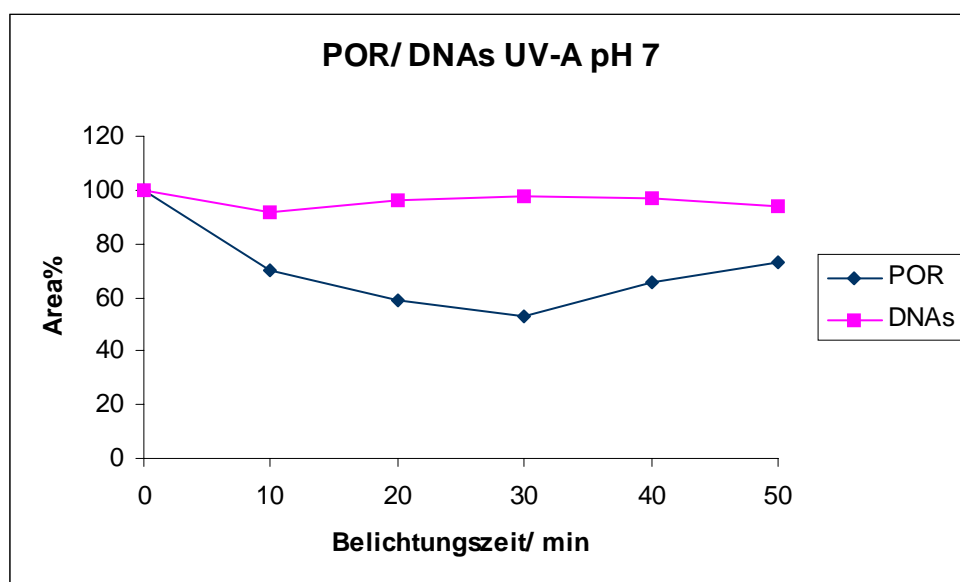


Abb. 120: Kinetischer Verlauf von POR und DNAs bei pH 7 und UV-A Belichtung

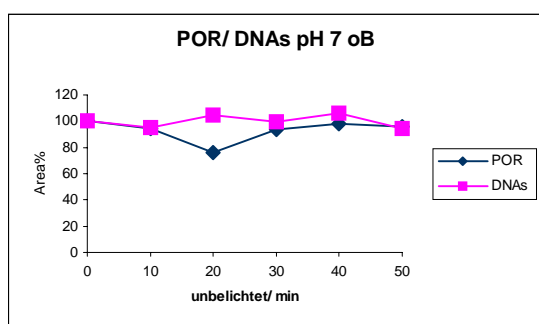


Abb. 121: POR mit DNAs bei pH 7 unbelichtet

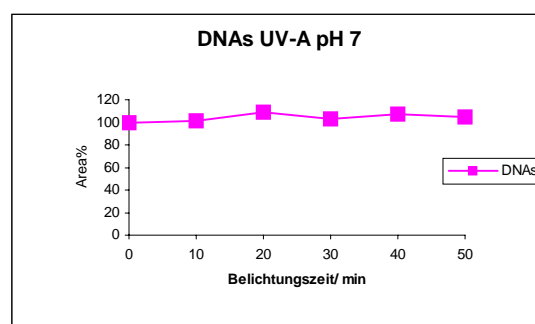


Abb. 122: DNAs bei pH 7 und UV-A Belichtung

In Abbildung 121 wurde die Studie ohne Belichtung wiederholt. Die Kurvenverläufe zeigen keinen linearen Verlauf. In Abbildung 122 ist die alleinige Belichtung von dem DNAs-Strang aufgezeichnet. Der geradläufige Verlauf der Kurve weist auf keinen photolytischen Abbau der DNA hin.

Die statistische Auswertung (beschrieben in Kap. 3.1.8) über die Regressionsgerade der DNAs-Strang Kurve in Abbildung 120 ergibt, dass die Steigung der Geraden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ gleich Null ist. Die Steigung der Regressionsgeraden der unbelichteten DNAs-Kurve in Abbildung 121 ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ gleich Null. Vergleicht man die Steigung der Regressionsgeraden des DNAs-Stranges in Abbildung 120 mit der Steigung der Regressionsgeraden des unbelichteten DNAs-Stranges in Abbildung 121, so unterscheiden sich die beiden Steigungen nicht signifikant. Beim statistischen Vergleich der Regressionsgeradensteigung des unbestrahlten DNAs-Stranges (Abbildung 121) mit der Steigung der Regressionsgeraden des bestrahlten DNAs-Stranges in Abwesenheit von Proporphyrin (Abbildung 122) unterscheiden sich die Geraden in der Steigung ebenfalls nicht signifikant. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung lassen darauf schließen, dass der DNAs-Strang bei Bestrahlung in An- und Abwesenheit von Protoporphyrin nicht abgebaut wurde, da die Steigung der Regressionsgeraden gleich Null ist. In den folgenden Chromatogrammen sind die Untersuchungen zu der DNAs und Protoporphyrin bei 0, 10, 40, und 50 min Belichtungsdauer abgebildet.

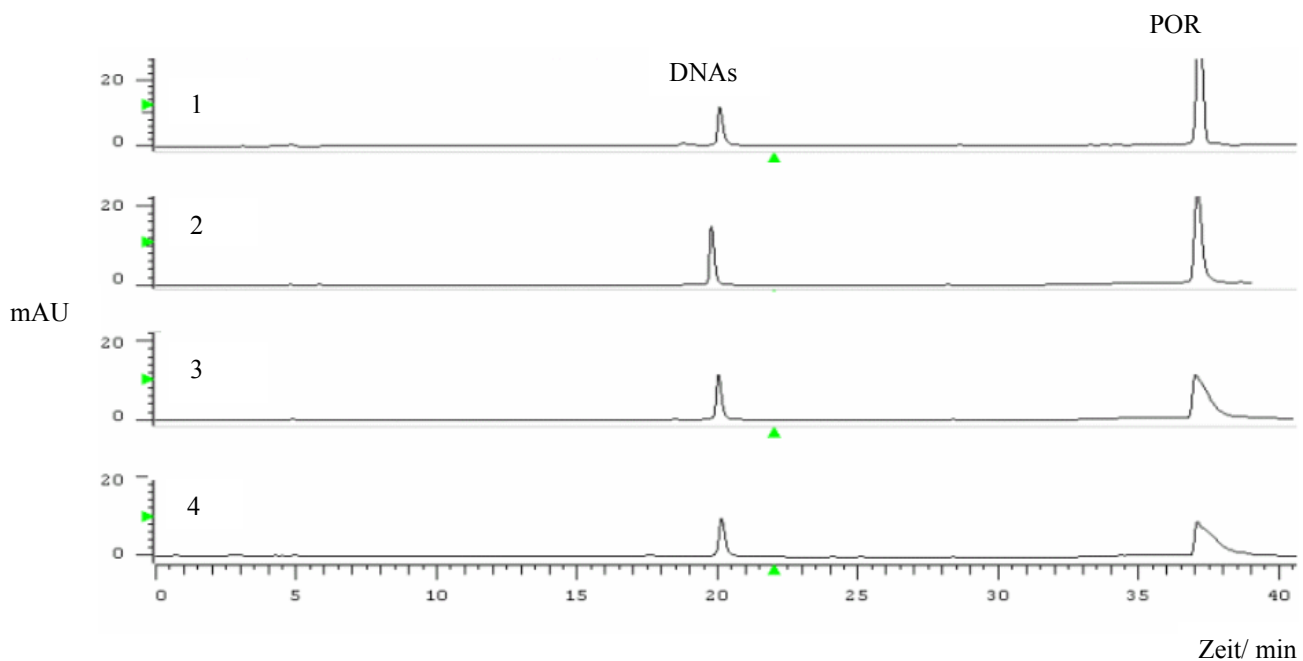


Abb. 123: (1) Protoporphyrin und DNAs ohne UV-A Belichtung

(2) Protoporphyrin und DNAs 10 min bei pH 7 mit UV-A belichtet

(3) Protoporphyrin und DNAs 40 min bei pH 7 mit UV-A belichtet

(4) Protoporphyrin und DNAs 50 min bei pH 7 mit UV-A belichtet

Der DNAs-Peak mit einer Retentionszeit von 20 min bleibt in allen vier Chromatogrammen als einzelner Peak erhalten während der Protoporphyrinpeak bei zunehmender Bestrahlungsdauer flächenmässig abnimmt. Die Peakbreite des Protoporphyrinpeaks nimmt im Vergleich zu der alleinigen Belichtung von Protoporphyrin (s. Abbildung 114 A) zu, dieses führt vermutlich zu dem ansteigenden Kurvenverlauf von dem Protoporphyrin in Abbildung 120. Im Vergleich zu der DNAs/ Protoporphyrin Belichtungsstudie sind aber keine weiteren Peaks innerhalb des Protoporphyrinpeaks zu erkennen. Außer den beiden Peaks der Edukte sind nur bei starker Vergrößerung weitere Peaks im Chromatogramm zu identifizieren, die aber auch bei der Bestrahlung von Protoporphyrin in Abwesenheit von den DNA-Einzelsträngen zu beobachten sind.

In Abbildung 124 sind zum Vergleich die Chromatogramme der unbelichteten Untersuchung zu dem DNAs-Strang und Protoporphyrin abgebildet. In den Chromatogrammen sind keine Wechselwirkungen zwischen dem Protoporphyrin und dem DNAs Strang zu erkennen.

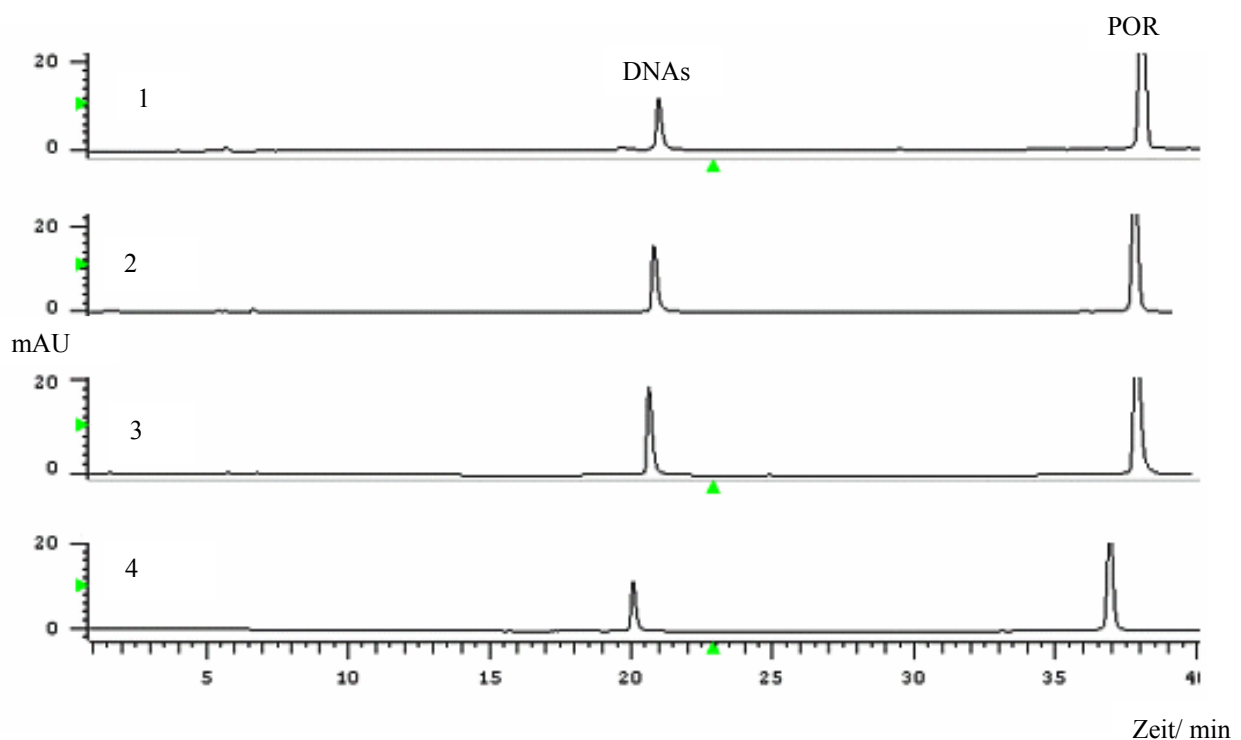


Abb.124: (1) Protoporphyrin und DNAs ohne UV-A Belichtung
(2) Protoporphyrin und DNAs 10 min bei pH 7 ohne UV-A Belichtung
(3) Protoporphyrin und DNAs 40 min bei pH 7 ohne UV-A Belichtung
(4) Protoporphyrin und DNAs 50 min bei pH 7 ohne UV-A Belichtung

3.8.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde der photolytische Abbau von Protoporphyrin (IX) untersucht. Darüber hinaus wurde das Protoporphyrin in An- und Abwesenheit von zwei DNA-Einzelsträngen mit und ohne Belichtung von UV-A Licht untersucht.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass zwischen dem DNA-antisense-Strang in Anwesenheit von Protoporphyrin eine Wechselwirkung mit und ohne Belichtung mit UV-A Licht zu beobachten ist. Dabei verläuft der photolytische Abbau des DNAa-Stranges in Anwesenheit von Protoporphyrin und in Gegenwart von UV-Strahlung viel rascher. Da innerhalb des Protoporphyrinpeaks ebenfalls weitere Peaks zu erkennen sind, könnte dieses auf eine mögliche Komplexierung von der DNAa und dem Protoporphyrin hindeuten, aber auch ein gemeinsames Reaktionsprodukt zwischen den beiden Edukten wäre denkbar.

Die Untersuchungsreihe zu dem DNA-sense-Strang in Anwesenheit von Protoporphyrin führt zu dem Ergebnis, dass der DNAs-Strang im Vergleich zu dem DNAa-Strang gegenüber Protoporphyrin mit und ohne Belichtung stabiler erscheint. Bei der Belichtung von Protoporphyrin in Anwesenheit von dem DNAs-Strang wurde der resultierende Protoporphyrinpeak breiter, dieses könnte möglicherweise auch auf eine Komplexierung von DNA und Protoporphyrin hindeuten. Deutlich geworden ist, dass eine bestimmte DNA-Sequenz für die Reaktion mit dem Protoporphyrin notwendig ist.

3.9 Untersuchung des Photosensibilisators Eosin

3.9.1 Einführung

Eosin (Abbildung 125) ist der erste Stoff, der bereits anfangs des 19. Jahrhunderts zur Photodynamischen Therapie eingesetzt wurde.

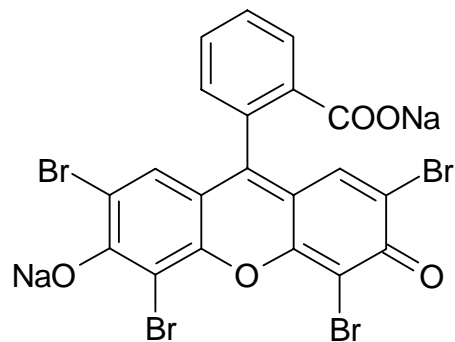


Abb. 125: Struktur von Eosin

3.9.2 Chromatographische Bedingungen der Eosin Untersuchungen

Für die photochemische Untersuchung von Eosin wurde das chromatographische Programm von der Untersuchung zu Hydrochlorothiazid in Anwesenheit der DNA-Einzelstränge übernommen (s. Tab. 3). Die online-Bestrahlung der Proben wurde in einer wässrigen phosphatgepufferten Lösung bei pH 7 mit dem UV-A Strahler durchgeführt.

3.9.3 Ergebnisse zur photochemischen Untersuchung von Eosin in Gegenwart von DNA

Zuerst wurde Eosin 0, 10, 20, 30, 40 und 50 min mit UV-A Strahlung im Photoreaktor belichtet. Das Chromatogramm des unbelichteten Eosins enthielt bereits drei Peaks, ein Hauptpeak des Eosins und zwei weitere Peaks (P2, P3), die auf mögliche Verunreinigungen hindeuten könnten. Die photochemischen Abbauraten dieser drei Peaks und die zwei daraus resultierenden Peaks von Photoprodukten wurden in der Abbildung 126 graphisch ausgewertet. Die detektierten Peakflächen des Eosins nehmen mit zunehmender Belichtungszeit ab. Nach der 50 min Belichtung erreicht die gemessene Fläche einen Wert von 61%.

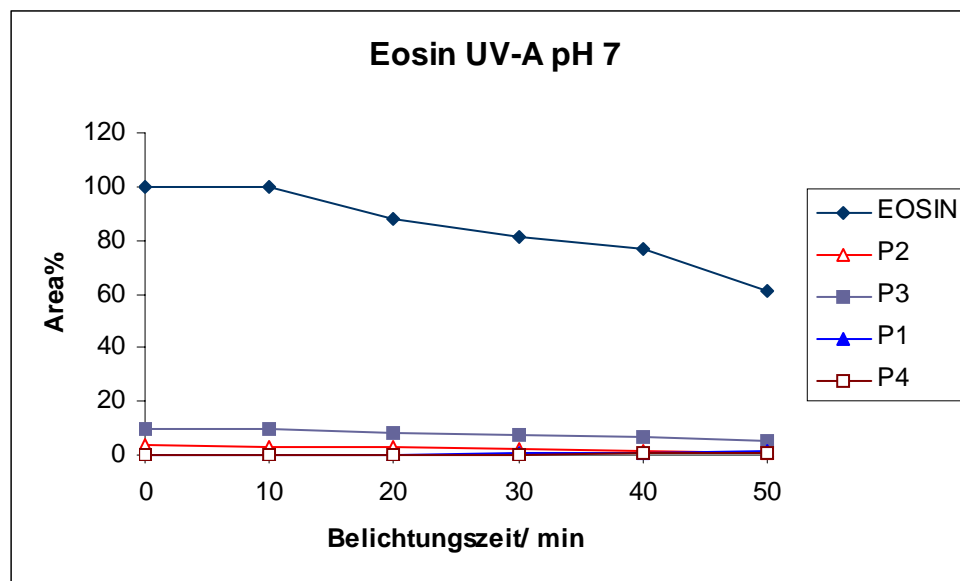


Abb. 126: Photozersetzung einer phosphatgepufferten Eosinlösung bei Belichtung mit der UV-A Lampe

3.9.4 Photochemische Umsetzung von Eosin und DNA-Einzelsträngen

Eosin wurde hinsichtlich möglicher Wechselwirkungen mit DNA-Molekülen in Gegenwart von Licht mit der entwickelten HPLC online-Methode getestet. Dabei wurde in den folgenden Untersuchungen Eosin mit jeweils einem der zwei komplementären kurzen DNA-Einzelsträngen photochemisch untersucht. Eosin wurde in An- und Abwesenheit des jeweiligen DNA-Stranges 0, 10, 20, 30, 40 und 50 min belichtet. Die DNA-Stränge wurden zum Vergleich ebenfalls mit und ohne UV-A Belichtung chromatographisch untersucht. In Abbildung 127 ist die Belichtung von Eosin in Gegenwart des DNAa-Stranges graphisch dargestellt. Die Photodegradation des Eosins ist mit der alleinigen Belichtung von Eosin in Abbildung 126 vergleichbar. Die gemessene prozentuale Peakfläche des DNAa-Stranges schwankt über die einzelnen Belichtungszeiten erheblich. Bei der unbelichteten vergleichenden Untersuchung in Abbildung 128 schwanken die detektierten Peakflächen des DNAa-Stranges ebenfalls stark. In der Abbildung 129 ist die belichtete Untersuchung des DNAa-Stranges dargestellt.

Bedingt durch die große Streuung der Messwerte, die für die Peakflächen des DNAa-Stranges ermittelt wurden, war eine statistische Auswertung nicht sinnvoll.

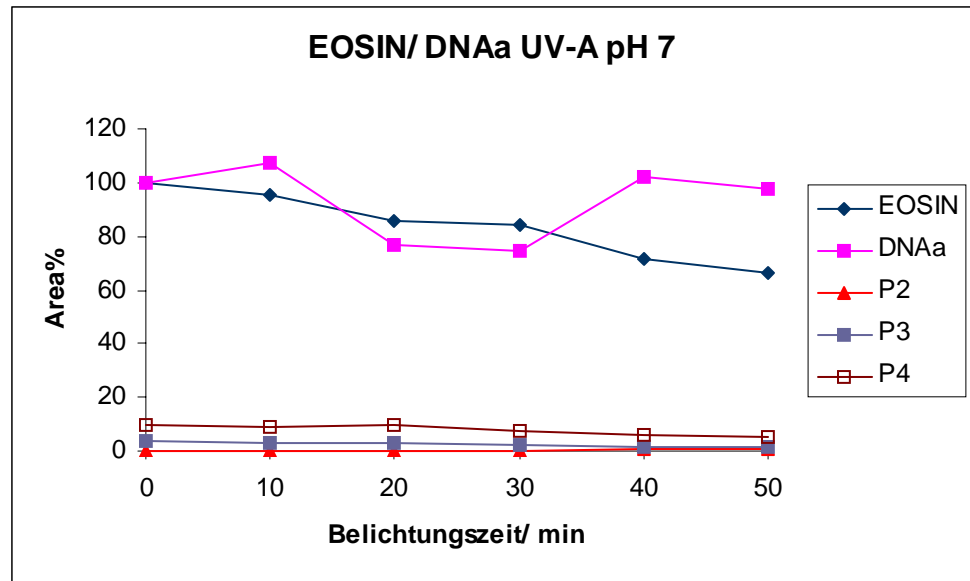


Abb. 127: Eosin und DNAa bei pH 7 und UV-A Belichtung

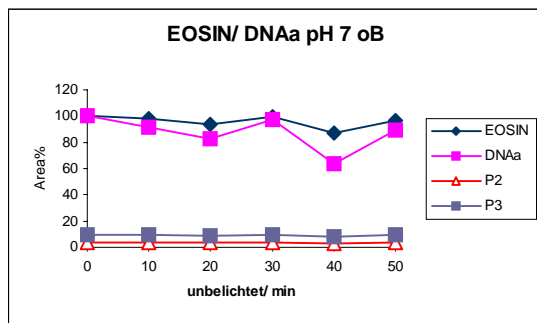


Abb. 128: Eosin und DNAa bei pH 7 unbelichtet

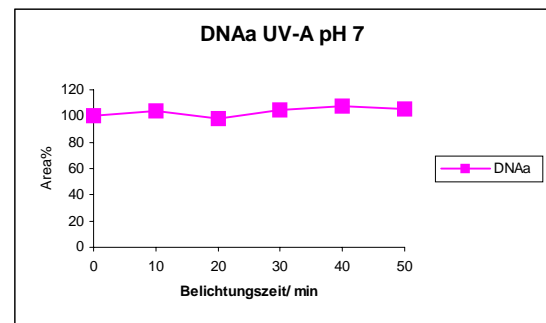


Abb.129: DNAa bei pH 7 mit UV-A belichtet

In der Abbildung 130 sind vier Chromatogramme dieser Versuche dargestellt. In Chromatogramm 1 wurde Eosin mit dem DNAa-Strang unbelichtet chromatographiert. In Chromatogramm 2 wurde der DNAa-Strang ohne Eosin 50 min mit UV-A Licht bestrahlt. Das Chromatogramm 3 zeigt die alleinige Belichtung von Eosin. In Chromatogramm 4 wurden schließlich beide Edukte zusammen 50 min lang belichtet. Bei dem Vergleich der vier Chromatogramme ist zu sehen, dass der DNAa-Strang ohne Anwesenheit von Eosin nicht in weitere Peaks zerfällt. Bei der Belichtung der DNAa in Anwesenheit von Eosin sind nach einer Retentionszeit von 4 min weitere Peaks zu erkennen, die bei der alleinigen Belichtung von Eosin und bei der alleinigen Belichtung des DNAa-Stranges nicht zu identifizieren sind.

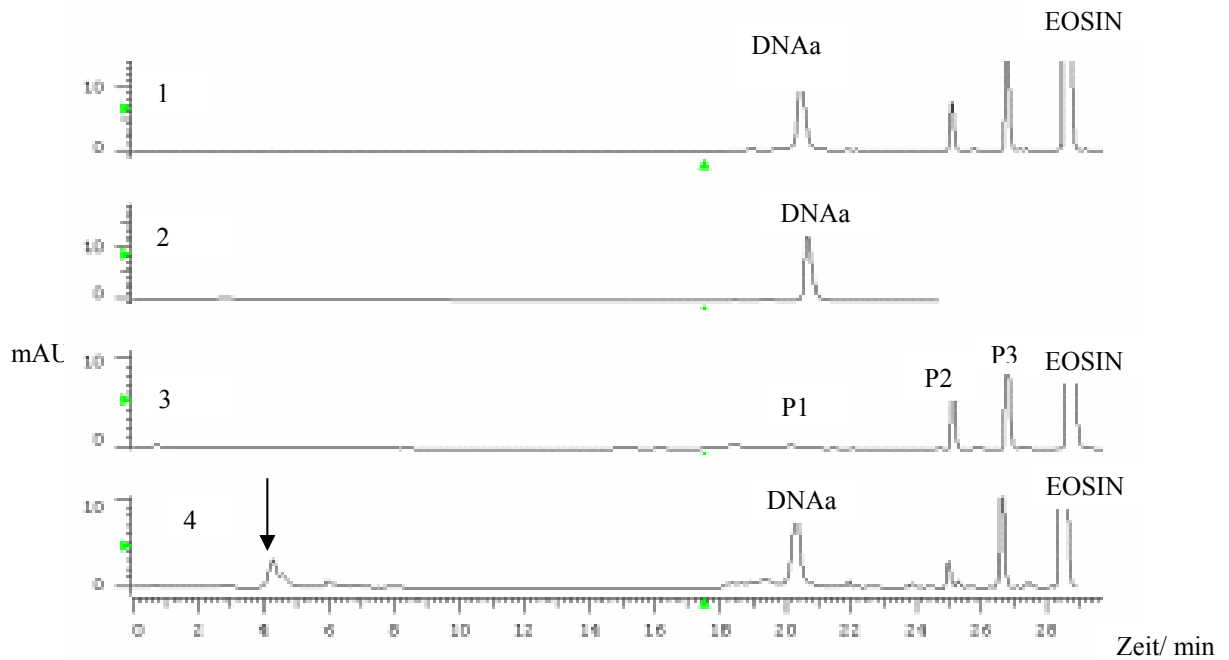


Abb.130: (1) Eosin mit DNAa 50 min ohne UV-A Belichtung
(2) DNAa 50 min bei pH 7 mit UV-A belichtet
(3) Eosin 50 min bei pH 7 mit UV-A belichtet
(4) Eosin mit DNAa 50 min bei pH 7 mit UV-A belichtet

Anschließend wurde die gesamte Untersuchung zum Vergleich mit dem komplementären DNAs-Strang durchgeführt. In der Abbildung 131 ist die Belichtung von Eosin in Anwesenheit des DNAs-Stranges graphisch dargestellt. Der photochemische Abbau von Eosin und die Entstehung der Photoprodukte ist wieder mit den vorangegangenen Untersuchungen vergleichbar. Die detektierte prozentuale Peakfläche des DNAs-Stranges bleibt bei dieser Messung nahezu konstant, ist aber leicht ansteigend. Bei der unbelichteten Vergleichsuntersuchung in Abbildung 132 ist ein ähnliches Bild zum Verlauf der DNAs-Kurve zu erkennen. Die alleinige Belichtung des DNAs-Stranges in der Abbildung 133 führt zu einem konstanten Verlauf der prozentual gemessenen Peaks.

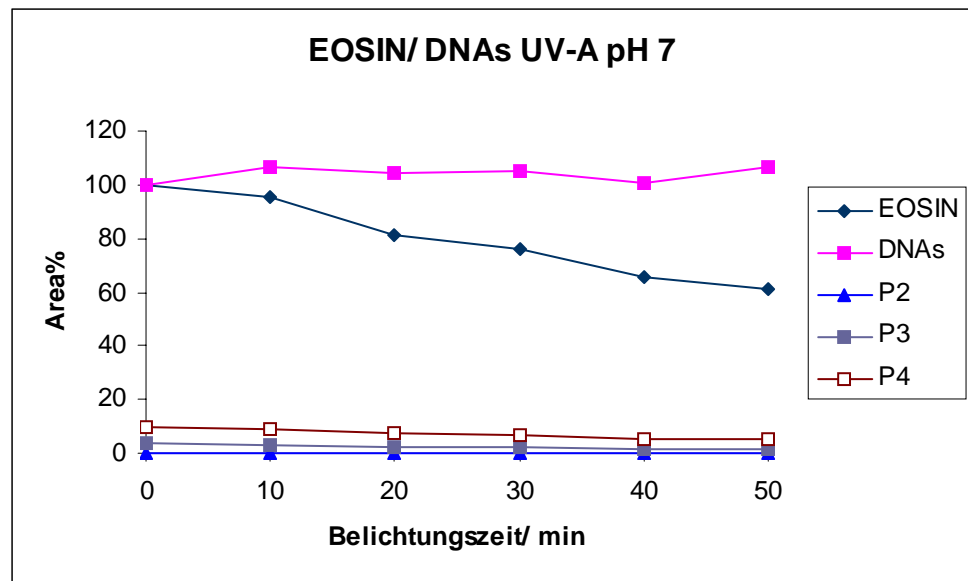


Abb.131: Eosin und DNAs bei pH 7 mit UV-A belichtet

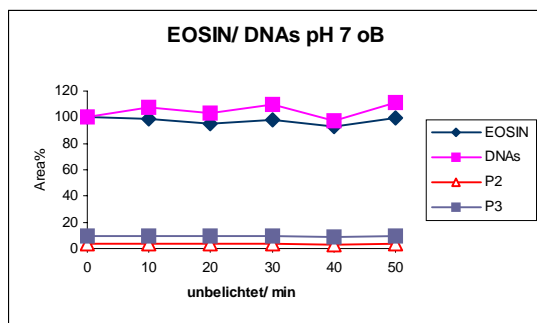


Abb.132: Eosin und DNAs bei pH 7 unbelichtet

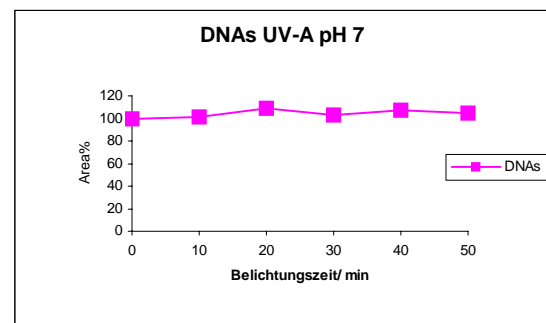


Abb.133: DNAs bei pH 7 und mit UV-A belichtet

Die statistische Auswertung (beschrieben in Kap. 3.1.8) über die Regressionsgerade der DNAs-Strang Kurve in Abbildung 131 ergibt, dass die Steigung der Geraden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ gleich Null ist. Die Steigung der Regressionsgeraden der unbelichteten DNAs-Kurve in Abbildung 132 ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1$ gleich Null. Vergleicht man die Steigung der Regressionsgeraden des DNAs-Stranges in Abbildung 131 mit der Steigung der Regressionsgeraden des unbelichteten DNAs-Stranges in Abbildung 132, so unterscheiden sich die beiden Steigungen nicht signifikant. Beim statistischen Vergleich der Regressionsgeradensteigungen des unbestrahlten DNAs-Stranges (Abbildung 132) mit der Steigung der Regressionsgeraden des bestrahlten DNAs-Stranges in Abwesenheit von Eosin (Abbildung 133) unterscheiden sich die Geraden in der Steigung ebenfalls nicht signifikant.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung lassen darauf schließen, dass der DNAs-Strang bei Bestrahlung in An- und Abwesenheit von Eosin nicht abgebaut wurde, da die Steigung der Geraden gleich Null ist.

In der Abbildung 134 sind vier ausgewählte Chromatogramme zu beobachten. In dem ersten Chromatogramm wurde Eosin 50 min mit dem DNAs-Einzelstrang ohne Bestrahlung analysiert. In Chromatogramm 2 ist die alleinige Belichtung von dem DNAs-Strang abgebildet, während Chromatogramm 3 die alleinige Belichtung von Eosin zeigt. Bei der Untersuchung zu dem Chromatogramm 4 wurde Eosin in Anwesenheit des DNAs-Stranges 50 min lang belichtet und anschließend chromatographiert. Beim Vergleich der Chromatogramme ist in Chromatogramm 4 nach 4,5 min ein Peak zu sehen, der bei der alleinigen Belichtung von Eosin und dem DNAs-Strang nicht zu erkennen ist. Dieses Ergebnis ist ein Widerspruch zu der statistischen Auswertung von der Eosin/ DNAs Untersuchung. Die statistische Auswertung spiegelte dieses Ergebnis nicht wieder.

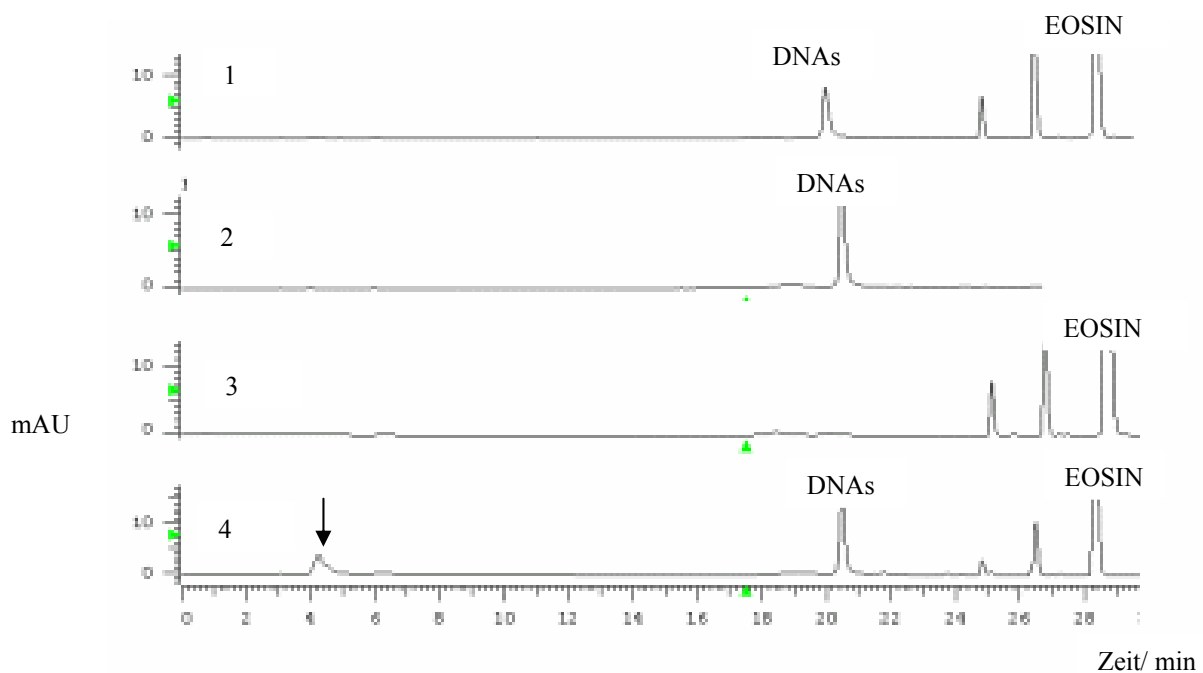


Abb.134: (1) Eosin mit DNAs 50 min ohne UV-A Belichtung
(2) DNAs 50 min bei pH 7 mit UV-A Licht belichtet
(3) Eosin 50 min bei pH 7 mit UV-A belichtet
(4) Eosin mit DNAs bei pH 7 mit UV-A belichtet

3.9.5 Zusammenfassung

Aus den Untersuchungsergebnissen geht hervor, dass Eosin in Gegenwart von DNA-Einzelsträngen und UV-A Licht schwache Wechselwirkungen eingeht. Beim Vergleich der Ergebnisse von Protoporphyrin und Eosin wird deutlich, dass Protoporphyrin gegenüber der DNA sehr viel reaktiver ist. Auch der zugrundeliegende Wirkungsmechanismus der beiden Photosensibilisatoren scheint auf unterschiedliche Reaktionen zurückzuführen sein, denn das Schädigungsprofil der DNA-Einzelstränge in den Chromatogrammen unterscheidet sich bei beiden Stoffen erheblich.