

5 Experimenteller Teil

5.1 Materialien und Geräte

5.2 Chemikalien

Aceton	Fluka
Acetonitril	Sigma-Aldrich, Steinheim
Alanyltryptophan	Fluka
DNA	Iba
Eosin	Fluka
Ethanol	Fluka
Guanin	Fluka
Guanosine 5`-monophosphate Disodium salt	Fluka
Chlorpromazinhydrochlorid	RodlebenPharma
Etodolac	Cilag
Hydrochlorothiazid	Fagron
Kaliumchlorid-Lösung 3M	Fluka, Buchs (Schweiz)
Kaliumhydrogensulfat	Merck
Natriumhydroxid	Fluka
Nifedipin	Bayer
Mefloquinhydrochlorid	Hoffmann-LaRoche
Ofloxacin	Hoechst Marion Roussel
Phosphorsäure 85%	Fluka
Pufferlösung pH 2,00	Mettler Toledo, Steinbach
Pufferlösung pH 4,00	Mettler Toledo, Steinbach
Pufferlösung pH 7,00	Mettler Toledo, Steinbach
Propansulfonsäure Natriumsalz Monohydrat	Fluka
Promazinhydrochlorid	Sigma
Promethazinhydrochlorid	Caelo
Protoporphyrin (IX)	Fluka
Salzsäure 32%	Merck, Darmstadt
Tryptophan	Fluka
Wasserstoffperoxid 35%	Fluka

Reinstwasser:

Das Reinstwasser stammte aus der hauseigenen Reinstwasseranlage und diente der Herstellung des HPLC-Fließmittels.

5.3 Chromatographisches SystemHPLC Anlage A von Merck/ Hitachi

Interface: D-6000 Interface (Merck/Hitachi)
Pumpe 1: HPLC-Pumpe Bischoff
[isokratische Pumpe]
Pumpe 2: L-6200A Intelligent Pump (Merck/ Hitachi)
[Niederdruckgradientenpumpe]
Detektor: L-4250 UV-VIS-Detektor (Merck/ Hitachi)
Durchflusszelle: 11,3 μ l, 5 mm, $\lambda=254$ nm

HPLC Anlage B von Merck/ Hitachi

Interface: D-7000 Interface (Merck/ Hitachi)
Pumpe 1: HPLC-Pumpe Bischoff
[isokratische Pumpe]
Pumpe 2: L-6200A Intelligent Pump (Merck/ Hitachi)
[Niederdruckgradientenpumpe]
Detektor: L-4500 Diode-Array Detektor

Elektrochemischer Detektor

ESA Coulochem II: Control Module (Model 5200A)

High Sensitivity Analytical Cell (Model 5011). Die Durchflusszelle besteht aus zwei Arbeitselektroden aus porösem Graphit.

5.4 Chromatographische Säulen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei C₁₈ Aqua Säulen der Firma Phenomenex eingesetzt.

Aqua™, RP₁₈, 30 x 4,6 mm, 5µm

Aqua™, RP₁₈, 100 x 4,6 mm, 5µm mit Security Guard Cartridge C₁₈

5.5 Säulenschaltung

Die Säulenschaltung besteht aus zwei elektronisch steuerbaren 230 V, 10 Port Schaltventilen (Modell E36-230, VICI AG Valco International). Das Umschalten der beiden Ventile von der Load oder Injekt Position erfolgt über die Software und das Interface der HPLC-Anlage. In der Säulenschaltung ist außerdem ein Jet Stream II Plus Säulenofen integriert.

5.6 Photoreaktor

Der Photoreaktor wurde aus folgenden Einzelteilen zusammengebaut.

Aluminiumröhre: Länge 50 cm, Durchmesser 12 cm,
2 Kunststoffaufsätze gewinkelt

Heizlüfter: ewt Clima 341 S

Temperaturfühler: Conrad Elektronik

Reaktionsschleife: Tefzel, 10 m x 0,254 mm

Lampen: Osram L 8W/12-950 Lumilux de Luxe Daylight
Philips TL 8W/05 UV-A

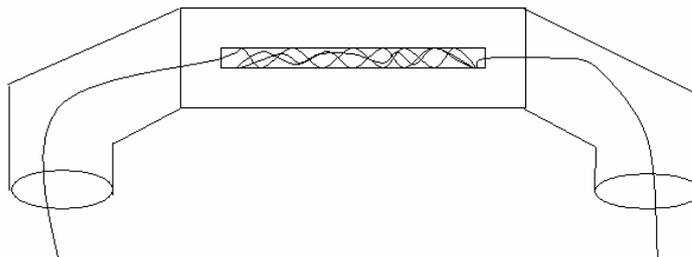


Abb. 136:

Skizze des Photoreaktors

5.7 Weitere Geräte und Verbrauchsmaterialien

Analysenwaage Satorius BP 221 S	Sartorius
Eppendorf Research Kolbenhubpipette 0,5 µl-10 µl	Eppendorf-Netheler-Hinz
Eppendorf Research Kolbenhubpipette 200 µl-1000 µl	Eppendorf-Netheler-Hinz
Eppendorf Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz
Digital pH Meter pH 525	WTW
pH-Einstabmesskette Typ-Nr. N 6280	Schott Geräte

5.8 Synthese des Chlorpromazinsulfoxids

Für die Synthese von dem Chlorpromazinsulfoxid wurden 20,0 mg Chlorpromazinhydrochlorid in 10,0 ml Wasser gelöst. Zu der Lösung wurde 0,2 ml konzentrierte Wasserstoffperoxidlösung 35% hinzugegeben. Diese Lösung wurde 2 Stunden bei 80 °C in einem Wasserbad temperiert.

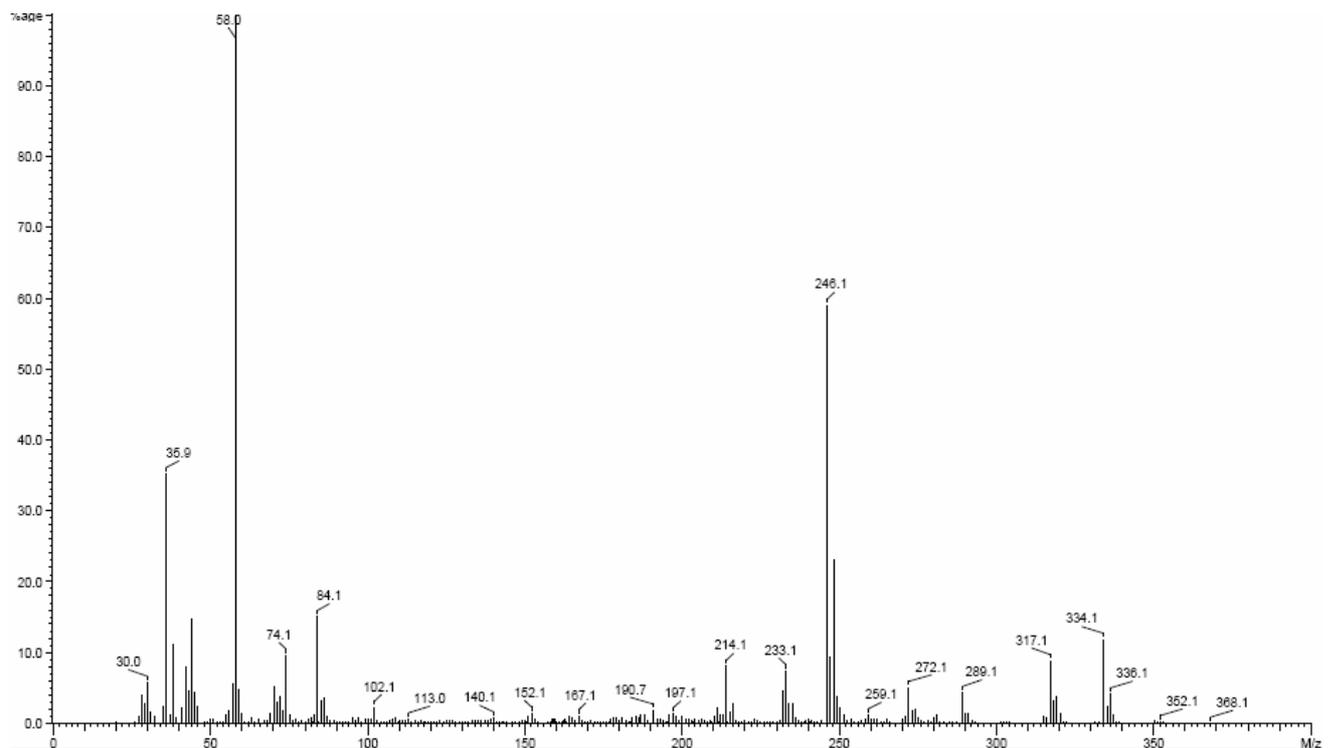


Abb. 135: Massenspektrum des synthetisierten Chlorpromazinsulfoxid

5.9 Analytische Probelösungen und Puffer

Die Probelösungen der zu untersuchenden Arzneistoffe wurden fast alle in äquimolaren Konzentrationen hergestellt. Die Nifedipin Probelösung musste wegen der schlechten

Löslichkeit in einer geringeren Konzentration hergestellt werden. Die Konzentration der Tryptophan-, Alanyltryptophan- und Guanosinmonophosphat-Lösung wurden ebenfalls im äquimolaren Verhältnis zu den Arzneistoffen hergestellt. Alleine bei den Untersuchungen mit den DNA-Einzelsträngen wurde eine andere Konzentration eingesetzt.

Phosphatpuffer pH 3 (5 mmol/ l⁻¹):

Zur Herstellung des Phosphatpuffers wurden 0,245g konzentrierte Phosphorsäure 85% zu 450 ml Wasser hinzugegeben. Unter Verwendung von 0,5 mol/ l⁻¹ Natriumhydroxid-Lösung wurde der pH-Wert mittels Glaselektrode auf pH 3 eingestellt und auf 500 ml mit Wasser aufgefüllt.

Phosphatpuffer pH 7 (5 mmol/ l⁻¹):

Zur Herstellung des Phosphatpuffers wurden 0,245g konzentrierte Phosphorsäure 85% zu 450 ml Wasser hinzugegeben. Unter Verwendung von 0,5 mol/ l⁻¹ Natriumhydroxid-Lösung wurde der pH-Wert mittels Glaselektrode auf pH 7 eingestellt und auf 500 ml mit Wasser aufgefüllt.

Mobile Phase für die Chromatographie der Phenothiazine:

Mobile Phase A: 100 ml einer Mischung von Acetonitril/ Wasser 90/ 10 (v/v) wurden mit einer wässrigen Lösung von Kaliumhydrogensulfat auf pH 3 oder 7 eingestellt, außerdem wurden 0,0165 mg Propansulfonat hinzugesetzt

Mobile Phase B: 100 ml einer Mischung von Wasser/ Acetonitril 90/ 10 (v/v) wurden mit einer wässrigen Lösung von Kaliumhydrogensulfat auf pH 3 oder 7 eingestellt, außerdem wurden 0,0165 mg Propansulfonat hinzugesetzt

5.10 Darstellung der Probelösungen

Chlorpromazinhydrochlorid: 40 µg/ ml wässriger Phosphatpuffer 5 mmol
pH 3, pH 5, pH 7 oder nur Wasser

Promethazinhydrochlorid: 36 µg/ ml wässriger Phosphatpuffer 5 mmol
pH 3 und pH 7 oder nur wässrig

Promazinhydrochlorid:	36 µg/ ml wässriger Phosphatpuffer 5 mmol pH 3 und pH 7, oder nur wässrig
Chlorpromazinhydrochlorid/ Guanosinmonophosphatdinatriumsatz:	40 µg/ ml CPZ und 45,82 µg/ ml GMP wässriger Phosphatpuffer pH 3 und pH 7
Promethazinhydrochlorid/ Alanyltryptophan:	36 µg/ ml PMZ und 30,96 µg/ ml ALATRP wässriger Phosphatpuffer pH 3 und pH 7
Hydrochlorothiazid:	33,4 µg/ ml wässriger Phosphatpuffer 5 mmol pH 3 und pH 7
Hydrochlorothiazid/ Guanosinmonophosphat:	33,4 µg/ ml HC und 45,82 µg/ ml GMP wässriger Phosphatpuffer 5 mmol pH 3 und pH 7
Hydrochlorothiazid/ Tryptophan:	33,4 µg/ ml und 22,9 µg/ ml TRP wässriger Phosphatpuffer 5 mmol pH 3 und pH 7
Hydrochlorothiazid/ Alanyltryptophan:	33,4 µg/ ml HC und 30,96 µg/ ml ALATRP wässriger Phosphatpuffer 5 mmol pH 3 und pH 7
Hydrochlorothiazid/ DNAa:	33,4 µg/ ml HC wässriger Phosphatpuffer pH 7, 249 µl dieser Lösung mit 1,5 µl DNAa (0,1 nmol/ µl) versetzt
Hydrochlorothiazid/ DNAs:	33,4 µg/ ml HC wässriger Phosphatpuffer pH 7, 249 µl dieser Lösung mit 1,5 µl DNAs (0,1 nmol/ µl) versetzt
Ofloxacin:	40,8 µg/ ml wässriger Phosphatpuffer 5 mmol pH 3 und pH 7
Ofloxacin/ Guanosinmonophosphat:	40,8 µg/ ml OFL und 45,82 µg/ ml GMP wässriger Phosphatpuffer 5 mmol pH 3 und pH 7

Ofloxacin/ Alanyltryptophan:	40,8 µg/ ml OFL und 30,96 µg/ ml ALATRP wässriger Phosphatpuffer 5 mmol pH 3 und pH 7
Tetracyclinhydrochlorid:	54,2 µg/ ml wässriger Phosphatpuffer 5 mmol pH 3
Tetracyclinhydrochlorid/ Guanosinmonophosphat	54,2 µg/ ml TETRA und 45,82 µg/ ml GMP wässriger Phosphatpuffer 5 mmol pH 3
Tetracyclinhydrochlorid/ Alanyltryptophan	54,2 µg/ ml TETRA und 30,96 µg/ ml ALATRP wässriger Phosphatpuffer 5 mmol pH 3
Etodolac	32,1 µg/ ml wässriger Phosphatpuffer 5 mmol pH 3 und pH 7
Etodolac/ Guanosinmonophosphat	32,1 µg/ ml ETO und 45,82 µg/ ml GMP wässriger Phosphatpuffer 5 mmol pH 3 und pH 7,
Etodolac/ Tryptophan	32,1 µg/ ml ETO und 22,9 µg/ ml TRP wässriger Phosphatpuffer 5 mmol pH 3 und pH 7
Etodolac/ Alanyltryptophan	32,1 µg/ ml ETO und 30,96 µg/ ml ALATRP wässriger Phosphatpuffer 5 mmol pH 3 und pH 7
Nifedipin	30 µg/ ml NIF wässriger Phosphatpuffer 5 mmol pH 7, in 1ml Ethanol angelöst
Nifedipin/ Guanosinmonophosphat	30 µg/ ml NIF und 35,3 µg/ ml GMP wässriger Phosphatpuffer 5 mmol pH 7, in 1ml Ethanol angelöst
Nifedipin/ Alanyltryptophan	30 µg/ ml NIF und 24 µg/ ml ALATRP wässriger Phosphatpuffer 5 mmol pH 7, in 0,1 ml Aceton angelöst

Eosin	77,6 µg/ ml Eosin wässriger Phosphatpuffer 5 mmol pH 7
Eosin/ DNAa	77,6 µg/ ml Eosin wässriger Phosphatpuffer pH 7, 249 µl dieser Lösung mit 1,5 µl DNAa (0,1 nmol/ µl) versetzt
Eosin/ DNAs	77,6 µg/ ml Eosin wässriger Phosphatpuffer pH 7, 249 µl dieser Lösung mit 1,5 µl DNAs (0,1 nmol/ µl) versetzt
Protoporphyrin	63,12 µg/ ml POR wässriger Phosphatpuffer 5 mmol pH 7
Protoporphyrin/ DNAa	63,12 µg/ ml POR wässriger Phosphatpuffer pH 7, 249 µl dieser Lösung mit 1,5 µl DNAa (0,1 nmol/ µl) versetzt
Protoporphyrin/ DNAs	63,12 µg/ ml POR wässriger Phosphatpuffer pH 7, 249 µl dieser Lösung mit 1,5 µl DNAs (0,1 nmol/ µl) versetzt