

Entwicklung einer In-Vitro-Methode zur Beurteilung des photosensibilisierenden Potentials von Arzneistoffen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Thomas Schulze
aus Greifswald

Juli 2013

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von 2009 bis 2013 am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin. Die Dissertation wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Peter Surmann angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Surmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Maria Kristina Parr

Disputation am 02.10.2013

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Surmann für die Überlassung des interessanten und vielfältigen Themas, der ständigen Diskussionsbereitschaft und die mir gewährte Freiheit bei der Bearbeitung dieser Dissertation.

Bei meinen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises Parr/Surmann bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft und Diskussionsfreude, im Besonderen aber bei Herrn Dr. Peter Witte, der mir immer eine große Unterstützung bei Problemen mit dem HPLC-System war.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Dr. Andreas Springer und Herrn Dipl.-Ing. Fabian Klautzsch bedanken, die mir die MS-Messungen in der Core-Facility ermöglichten,

bei Herrn Dr. Werner Herrmann für die Unterstützung bei den ESR-Messungen und

bei Pascal Blümmel, vom Institut für Physik der Freien Universität Berlin, für die spektrometrische Analyse der von mir eingesetzten Niederdruckstrahler.

Einen großen Dank an meine Familie und meine Freundin, für die liebevolle Unterstützung bis zum heutigen Tage.

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
2	EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG	1
3	PLANUNG	3
4	THEORETISCHER TEIL	5
4.1	PHOTOSENSITIVITÄT	5
4.1.1	Einführung Photosensitivität	5
4.1.2	Phototoxische und photoallergische Reaktionen.....	5
4.2	PHOTOSENSITIZER	7
4.2.1	Einführung Photosensitizer	7
4.2.2	Wirkungsmechanismus der Photosensitizer	7
4.3	PHOTOCHEMISCHE REAKTIONEN VON ARZNEISTOFFEN	9
4.3.1	Chlorpromazin.....	9
4.3.2	Benzophenone	10
4.3.3	Furosemid.....	16
4.3.4	Naproxen	17
4.4	REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES	18
4.5	ELEKTRONENSPINRESONANZ SPEKTROSKOPIE	20
4.5.1	Einführung in die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie	20
4.5.2	Grundlagen der ESR.....	20
4.6	AUFBAU DES ANALYTISCHEN SYSTEMS	22
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	25
5.1	QUALIFIZIERUNG DER LICHTQUELLEN	25
5.1.1	Spektrum der eingesetzten Strahlungsquellen.....	25
5.1.2	Bestimmung der Strahlungsintensität.....	26
5.2	UNTERSUCHUNG DER PHOTOSTABILITÄT	34
5.2.1	Einführung.....	34
5.2.2	Untersuchung von Ketoprofen hinsichtlich seiner Photostabilität.....	34
5.2.3	Untersuchung von Naproxen hinsichtlich seiner Photostabilität	39
5.2.4	Untersuchung von Amiodaron hinsichtlich seiner Photostabilität	42
5.2.5	Untersuchung von Diclofenac hinsichtlich seiner Photostabilität.....	44

5.2.6	Untersuchung von Hydrochlorothiazid hinsichtlich seiner Photostabilität.....	48
5.2.7	Untersuchung von Furosemid hinsichtlich seiner Photostabilität	50
5.2.8	Untersuchung von Doxycyclin hinsichtlich seiner Photostabilität	52
5.2.9	Untersuchung von Simvastatin hinsichtlich seiner Photostabilität	55
5.2.10	Untersuchung von H1-Antihistaminika hinsichtlich seiner Photostabilität	60
5.2.11	Untersuchung von Allopurinol hinsichtlich seiner Photostabilität.....	62
5.2.12	Zusammenfassung der Untersuchung der verschiedenen Photostabilitäten	65
5.3	UNTERSUCHUNG DER PHOTOCHEMISCHEN STABILITÄT MIT HILFE DER LC-MS.....	66
5.3.1	Einführung.....	66
5.3.2	Untersuchungsbedingungen	66
5.3.3	Untersuchung der Photostabilität von Ketoprofen mittels MS	67
5.3.4	Untersuchung der Photostabilität von Naproxen mittels MS.....	68
5.3.5	Untersuchung der Photostabilität von Amiodaron mittels MS.....	69
5.3.6	Untersuchung der Photostabilität von Diclofenac mittels MS.....	71
5.3.7	Untersuchung der Photostabilität von Furosemid mittels MS	72
5.3.8	Untersuchung der Photostabilität von Nifedipin mittels MS	73
5.3.9	Untersuchung der Photostabilität von Chlorpromazin mittels MS	76
5.3.10	Zusammenfassung der Untersuchungen der photochemischen Stabilität mit Hilfe der LC-MS.....	78
5.4	UNTERSUCHUNG ZUR PHOTOCHEMISCHEN STABILITÄT MIT HILFE DER ESR	79
5.4.1	Einführung.....	79
5.4.2	Untersuchung der paramagnetischen Eigenschaften von Allopurinol	80
5.4.3	Untersuchung der paramagnetischen Eigenschaften von Chlorpromazin.....	81
5.4.4	Untersuchung der paramagnetischen Eigenschaften von Nifedipin	84
5.4.5	Untersuchung der paramagnetischen Eigenschaften von Amiodaron.....	85
5.4.6	Untersuchung der paramagnetischen Eigenschaften von Doxycyclin, Furosemid und Simvastatin	87
5.4.7	Zusammenfassung	88
5.5	UNTERSUCHUNG ZUR BILDUNG VON REAKTIVEN SAUERSTOFFSPEZIES DURCH ARZNEISTOFFE	89
5.5.1	Einführung.....	89
5.5.2	Nachweis von Singulett-Sauerstoff	89
5.5.3	Chromatographische Bedingungen zur Untersuchung der Bildung von $^1\text{O}_2$	91
5.5.4	Untersuchung von Ketoprofen hinsichtlich der Bildung von $^1\text{O}_2$	91

5.5.5	Untersuchung von Naproxen hinsichtlich der Bildung von $^1\text{O}_2$	92
5.5.6	Untersuchung von Amiodaron hinsichtlich der Bildung von $^1\text{O}_2$	94
5.5.7	Untersuchung von Diclofenac hinsichtlich der Bildung von $^1\text{O}_2$	95
5.5.8	Untersuchung von Hydrochlorothiazid hinsichtlich der Bildung von $^1\text{O}_2$	96
5.5.9	Untersuchung von Furosemid hinsichtlich der Bildung von $^1\text{O}_2$	97
5.5.10	Untersuchung von Doxycyclin hinsichtlich der Bildung von $^1\text{O}_2$	99
5.5.11	Untersuchung von Simvastatin hinsichtlich der Bildung von $^1\text{O}_2$	99
5.5.12	Untersuchung von Nifedipin hinsichtlich der Bildung von $^1\text{O}_2$	100
5.5.13	Untersuchung von Lercarnidipin hinsichtlich der Bildung von $^1\text{O}_2$	102
5.5.14	Alternativer Nachweis für Singulett-Sauerstoff mit Hilfe von FFA	105
5.5.15	Nachweis von Superoxid Anionenradikalen	110
5.5.16	Auswahl der Arzneistoffe sowie chromatographische Bedingungen bei deren Test auf $\text{O}_2^{\cdot -}$	111
5.5.17	Zusammenfassung der Untersuchungen zur Bildung von ROS von Arzneistoffen unter Lichteinfluss	117
5.6	UNTERSUCHUNG DES PHOTOCHEMISCHEN EINFLUSSES VON PHOTOSENSITIZER AUF BIOMOLEKÜLE	119
5.6.1	Einführung.....	119
5.6.2	Calcitonin als Beispiel-Biomolekül	119
5.6.3	Photostabilität von Calcitonin	119
5.6.4	Bestrahlung von Ketoprofen in Anwesenheit von Calcitonin	121
5.6.5	Bestrahlung von Naproxen in Anwesenheit von Calcitonin	121
5.6.6	Bestrahlung von Diclofenac in Anwesenheit von Calcitonin.....	122
5.6.7	Bestrahlung von Nifedipin in Anwesenheit von Calcitonin.....	123
5.6.8	Bestrahlung von Doxycyclin in Anwesenheit von Calcitonin	124
5.6.9	Bestrahlung von HCT in Anwesenheit von Calcitonin	124
5.6.10	Zusammenfassung der Untersuchungen des photochemischen Einflusses von Photosensitzern auf Biomoleküle	126
6	ZUSAMMENFASSUNG	127
7	SUMMARY	129
8	EXPERIMENTELLER TEIL	131
8.1	CHEMIKALIEN	131
8.2	CHROMATOGRAPHISCHE SYSTEME.....	132

8.2.1	Ein-Säulen-System	132
8.2.2	Zwei-Säulen-System	132
8.2.3	Säulenschaltung.....	132
8.2.4	LC-MS-System.....	132
8.3	CHROMATOGRAPHISCHE SÄULEN.....	132
8.4	PHOTOREAKTOR.....	133
8.5	WEITER GERÄTE	134
8.6	DARSTELLUNG DER PROBELÖSUNGEN	134
8.6.1	Bestimmung der Strahlungsintensität.....	134
8.6.2	Untersuchung der Photostabilität	135
8.6.3	Untersuchung der photochemischen Stabilität mit Hilfe der LC-MS	136
8.6.4	Untersuchung zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies mit Hilfe von RNO 136	
8.6.5	Nachweis von Superoxid Anionenradikalen	138
8.6.6	Alternativer Nachweis für Singulett-Sauerstoff mit Hilfe von FFA	139
8.6.7	Untersuchung des photochemischen Einflusses von Photosensitizer auf Biomoleküle.....	139
8.7	PHOSPHATPUFFER.....	140
9	LEBENS LAUF.....	141
10	ANHANG	142
11	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	143
12	LITERATURVERZEICHNIS.....	148

1 Abkürzungsverzeichnis

$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
3T3 NRU PT	3T3 neutral red uptake phototoxicity test
ACN	Acetonitri
AM	Amiodaron
BP	Benzophenon
Calci	Calcitonin
Ceti	Cetirizin
	Cosmetic, Toiletry and Parfumery Association
COLPIA	
DAD	Diodenarraydetektor
DMPO	Dimethylpyrrolidin-N-oxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
Doxy	Doxycyclin
E	Energie
EEC	European Economic Community
EMEA	European Medicines Agency
Es	Einstein
ESR	Elektronenspinresonanz
ETFE	Ethylen-Tetrafluorethylen
FDA	Food and Drug Administration
FFA	Furfurylalkohol
Furo	Furosemid
HCT	Hydrochlorothiazid
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HPLC	high performance liquid chromatography
ISC	Intersystem Crossing
KPF	Ketoprofen
LC	Flüssigchromatographie
MS	Massenspektrometrie
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NMR	Kernspinresonanz
NPX	Naproxen
NSAID	nichtsteroidales Antirheumatikum
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Superoxidanionen-Radikal
PMLE	Polymorphe Lichtdermatose
PTFE	Polytetrafluorethylen
RNO	p-Nitrosodimethylanilin
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
t	Zeit
TOF	time of flight Detektor
UV	ultraviolett

2 Einleitung und Zielstellung

Untersuchungen zu den photochemischen Eigenschaften von Arzneistoffen und den damit verbundenen phototoxischen Eigenschaften werden immer wichtiger in der Arzneimittelentwicklung, denn durch die Wechselwirkung von Arzneistoffen mit Licht kann es zur Photodegradation des Arzneistoffes kommen, wodurch sich die Wirksamkeit des Arzneistoffes vermindern kann oder es können toxische Produkte entstehen. Diese sogenannten Phototoxine haben das Potential Kontaktdermatitis, DNA-Schäden, Peroxidation von Fettsäuren, Reaktionen mit Proteinen oder Zellschäden zu verursachen (Epstein 1983).

Phototoxische Reaktionen können sowohl von systemisch als auch von topisch angewendeten Arzneistoffen verursacht werden. Außerdem treten sie bei verschiedenen Stoffklassen auf. Darunter befinden sich Arzneistoffe, die zu nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAIDs), Antibiotika, Antikonvulsiva, trizyklischen Antidepressiva, Antihypertensiva und Diuretika gehören (Martin Jr, Colina et al. 1987; Becker, Eberlein-König et al. 1996; Vargas, Martinez Volkmar et al. 1998; Canudas and Contreras 2002). Das Interesse an der durch Arzneistoffe induzierten Lichtempfindlichkeit hat in den letzten 20 Jahren zugenommen und wurde durch eine Mehrzahl von publizierten Studien reflektiert (Cosa, Lukeman et al. 2009). Leitlinien, wie die „Note for Guidance on Photosafety Testing“ wurden durch die EMA und FDA in den Jahren 2002 und 2003 veröffentlicht. In diesen Leitlinien werden Testmethoden zur Untersuchung von Arzneistoffen auf Phototoxizität, Photoallergenität, Photogenotoxizität und Photokarzinogenität beschrieben. Es gibt auf der einen Seite In-Vivo-Modelle, wie z.B. den Occluded Patch Test (Buehler 1985), die Meerschweinchen oder Mäuse verwenden, um das phototoxische Potential von Arzneistoffen zu untersuchen und zu beschreiben (Magnusson 1980; Wagai and Tawara 1991; Mayne, Johnson et al. 1997; Shimoda, Ikeda et al. 2000). Jedoch soll im Sinne der Leitlinie 86/609/EEC möglichst auf Tierversuche verzichtet werden und auf In-Vitro-Tests zurückgegriffen werden. So gibt es auf der anderen Seite In-Vitro-Methoden. Ein Beispiel ist hier der „3T3 neutral red uptake phototoxicity test“ (3T3 NRU PT), aber auch die In-Vitro-Methoden haben ihre Schwächen. Der 3T3 NRU PT zeigt z.B. oft ein falsch positives Ergebnis an, außerdem gibt er keinen Rückschluss auf die zu Grunde liegende Photochemie (Onoue, Seto et al. 2009; Matsumoto, Akimoto et al. 2010).

Ziel dieser Arbeit ist es, durch den Einsatz verschiedener Detektionstechniken und die Kopplung eines Photoreaktors mit der HPLC, das photochemische Verhalten von Arzneistoffen zu beschreiben, um ein photosensibilisierendes/phototoxisches Potential zu ermitteln und zwischen einer photosensitiven Typ-I- und einer Typ-II- Reaktion zu unterscheiden. Außerdem

soll es möglich sein kurzlebige und reaktive Photoprodukte zu erkennen und zu identifizieren. Um neben den photochemischen Eigenschaften der Arzneistoffe auch Aussagen zu der Reaktivität gegenüber Biomolekülen zu machen, sollen sie in Gegenwart von Peptiden mit Licht bestrahlt werden. Die entwickelte Methode soll an verschiedenen sinnvoll ausgesuchten Arzneistoffen auf ihre Eignung getestet werden. Hierfür wurde eine bestehende In-Vitro-Screening Methode von Schröder weiterentwickelt (Schröder 2007), die das photosensibilisierende Potential eines Arzneistoffes vorhersagen kann.

3 Planung

Um eine geeignete Screening Methode zur Untersuchung auf mögliche induzierte Photosensitivität durch Arzneistoffe zu entwickeln, muss man zunächst die denkbaren Reaktionswege, die zur lichtempfindlichen Hautreaktion führen, genauer betrachten.

Der primäre Prozess, eine photochemische oder photobiologische Reaktion auszulösen, ist die Absorption von Sonnenlicht, das sich aus einem breiten Strahlenspektrum zusammensetzt. Es beinhaltet das sichtbare Licht, ultraviolette Strahlung und Infrarotstrahlung. Die ultraviolette Strahlung kann in drei Bereiche aufgeteilt werden, „nahes UV“ UVA 320-400nm, „mittleres UV“ UVB 290-320 nm und „fernere UV“ UVC 180-290 nm. Während UVC von der Ozonschicht zurückgehalten wird, erreichen UVA und UVB die Erde. Nur UVA und UVB sind an photosensitiven Reaktionen beteiligt (Svensson, Cowen et al. 2001). UVB-Strahlung kann nur in die Epidermis und papilläre Dermis eindringen, während UVA-Strahlung bis in die retikuläre Dermis eindringen kann. Generell variiert die Absorption des Lichtes durch die Haut in einem Wellenlängenbereich von 290-700nm, während Licht im roten Bereich sogar bis in die Subcutis eindringen kann, kommen nur bis zu 10% des Lichtes mit einer Wellenlänge <300 nm durch die Epidermis (Epstein, Photomedicine et al. 1989). Wenn man dieses Penetrations- und Absorptionsvermögen von Licht mit dem Grotthus-Draper Gesetz, nachdem nur absorbiertes Licht photochemische und photobiologische Reaktionen auslösen kann, in Einklang bringt, erscheint es sinnvoll, Strahlungsquellen im UVA- und UVB-Bereich einzusetzen. Die getesteten Arzneistoffe müssen in diesem Bereich absorbieren.

Ein Stoff geht nach der Absorption von Licht vom Grundzustand in den angeregten Singulett-Zustand über. Ausgehend von diesem Zustand gibt es mehrere mögliche Prozesse, die ablaufen können, zum Beispiel kann es zum strahlungslosen Übergang auf den Grundzustand, Fluoreszenz, Radikalbildung, Energietransfer zu molekularem Sauerstoff (Bildung von Singulett-Sauerstoff) oder anderen photochemischen Reaktionen kommen.

Von Interesse sind vor allem die Radikalbildung und die Bildung von Singulett-Sauerstoff, deshalb müssen Methoden und Detektionsmöglichkeiten ausgewählt werden, die es ermöglichen, diese exakt zu untersuchen.

Zur Untersuchung der Radikalbildung eignet sich insbesondere die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie, die sich durch hohe Selektivität und durch sehr geringe Nachweisgrenzen auszeichnet. Es bietet sich daher an, eine ESR-Methode zu entwickeln, mit der die lichtinduzierte Radikalbildung möglichst direkt bestimmt werden kann.

Um Zerfallsprodukte nachzuweisen, muss man sie vorher möglichst auftrennen. Dafür bietet sich die HPLC als Methode an. In den Arbeiten von Palar (Parlar 2000) und Schröder (Schröder 2007) wurde eine HPLC Methode entwickelt, die einen Photoreaktor mit einem HPLC-System verbindet und es ermöglicht, Stoffe im rein wässrigen Milieu online zu bestrahlen. Dies hat den Vorteil auch kurzlebige Zwischenprodukte detektieren zu können. Neben der UV/VIS Detektion soll auch eine HPLC-MS-Methode entwickelt werden, um Zwischenprodukte zu identifizieren und schon bekannte Reaktionswege zu bestätigen.

Die Auswahl der untersuchten Arzneistoffe erfolgt nach folgenden Kriterien:

- 1) Die Substanzen müssen im Wellenlängenbereich des auf der Erde vorhandenen Sonnenlichtes absorbieren.
- 2) Die Molmassen sollten im Bereich von 300-500 g/mol liegen, denn dies ist ein typischer Molmassenbereich für Photosensitizer (González and González 1996).
- 3) Das photochemische und photobiologische Verhalten einiger Arzneistoffe sollte, zwecks Validierung der Methode, bekannt sein.
- 4) Die ausgewählten Arzneistoffe sollen verschiedene Indikationen haben und in der aktuellen Therapie eine Rolle spielen.

Wirkstoff	Gesamtverordnungen	Wirkstoff	Gesamtverordnungen
Allopurinol	6112500	Ibuprofen	18962100
Cetirizin	695000	Ketoprofen	66700
Diclofenac	14939300	Naproxen	395400
Doxycylin	3072300	Nifedipin	1319500
Furosemid	4444200	Paracetamol	4755800
Hydrochlorthiazid	3072300	Simvastatin	13369800

Tabelle 1: Übersicht zur Anzahl der Verordnungen in Deutschland 2009 der ausgewählten Arzneistoffe (Schwabe 2010)

4 Theoretischer Teil

4.1 Photosensitivität

4.1.1 Einführung Photosensitivität

Photosensitive Reaktionen des Organismus sind schon seit tausenden von Jahren bekannt. Schon die Ägypter, Griechen und Inder nutzten Psoralen enthaltende Pflanzen zusammen mit Sonnenlicht um Hautkrankheiten zu behandeln (Drugge R 2003). Nicht nur Pflanzen oder Pflanzeninhaltsstoffe, sondern auch oral und topisch angewendete Arzneistoffe können photosensitive Reaktionen in der Haut hervorrufen und zu Erkrankungen führen. Sie machen ca. 8% der unerwünschten Arzneimittelwirkungen aus (Selvaag 1997).

Im Allgemeinen kann man photosensitive Erkrankungen in drei große Gruppen einteilen: idiopathische Photodermatosen; Photodermatosen assoziiert mit einem endogenen Photosensitizer und Photodermatosen assoziiert mit einem exogenen Photosensitizer. Zu den idiopathischen Photodermatosen gehören die Polymorphe Lichtdermatose (PMLE), die Lichturtikaria und die chronisch aktinische Dermatitis.

4.1.2 Phototoxische und photoallergische Reaktionen

Photosensitive Reaktionen, die durch Arzneimittel verursacht werden, können in zwei verschiedene Subtypen unterteilt werden, in photoallergische und phototoxische Reaktionen.

Bei der Photoallergie handelt es sich um eine immunologische Reaktion, die nicht bei der ersten Behandlung mit einem Photosensitizer und Lichtaussetzung auftritt, sondern sich erst ein bis zwei Wochen nach einer Induktionszeit bei einer wiederholten Gabe des Photosensitizers mit einhergehender Lichtexposition zeigt.

Im Gegensatz dazu ist die phototoxische Reaktion eine akute Antwort auf die erste Exposition mit einem systemisch oder dermal verabreichten Photosensitizer und anschließender Exposition mit UV/Vis-Licht. Die Photoirritation ist eine bestimmte Art der Photoxizität und beschreibt solche phototoxische Reaktionen der Haut, die in den ersten 72 Stunden nach Exposition von Licht und Photosensitizer auftreten (Spielmann, Müller et al. 2000).

Photoallergische und phototoxische Reaktionen besitzen ein ähnliches klinisches und histologisches Erscheinungsbild und lassen sich nur schwer unterscheiden, gerade auch weil viele Photosensitizer beide Reaktionen hervorrufen können.

Eigenschaft	Photoallergenität	Phototoxizität
relatives Vorkommen	niedrig	hoch
Dosisabhängigkeit	nein	ja
Beginn nach Exposition mit Licht und Photosensitizer	24h+	Minuten bis Stunden
relative benötigte Menge des Arzneistoffs	niedrig	hoch
Distribution	exponierte Haut	exponierte Haut; teilweise nicht exponierte Haut
Pigmentveränderungen	selten	häufig
Histopathologie	Epidermale Spongiose; Hautentzündung	Epidermale Nekrose
Kreuzreaktionen mit ähnlichen Stoffen	ja	nein
Entwicklung einer persistierenden Lichtempfindlichkeit	ja	nein
Kovalente Bindung an Proteine	ja	nein

Tabelle 2 : Eigenschaften von Photoallergenität und Phototoxizität (Gould, Mercurio et al. 1995)

Trotz ihrer Ähnlichkeiten haben Photoallergenität und –toxizität mehrere Unterschiede in ihren Eigenschaften (Tabelle 2). Während photoallergische Reaktionen relativ selten vorkommen, treten phototoxische Reaktionen häufiger auf und können bei jedem sofort auftreten. Dafür sind die erforderlichen Mengen an Photosensitizer für eine photoallergische Reaktion gering, während für eine phototoxische Reaktion relativ hohe Konzentrationen benötigt werden. Ebenso ist das Einsetzen der Symptome nach der Exposition unterschiedlich. Die häufigste klinische Manifestation der Phototoxizität ist ein verstärkter Sonnenbrand, der an den der Sonne ausgesetzten Bereichen auftritt. Wenn dieser Sonnenbrand verschwindet, kommt es

häufig zu einer lokalisierten Hyperpigmentierung durch Stimulierung der Melaninsynthese. Andere auftretende klinische Erscheinungsbilder der Phototoxizität sind urtikarielle Reaktionen, die sofort oder verzögert einsetzen, eine verzögerte Reaktion mit Erythem und Blasenbildung sowie die Pseudoporphyrie.

Photoallergische Reaktionen treten erst nach der ersten Sensibilisierung auf und selbst dann ist die klinische Manifestation der Symptome noch bis zu 72 Stunden verzögert. Während Pigmentveränderungen selten sind, treten vor allem Symptome ähnlich der allergischen Kontaktdermatitis auf. Neben den lichtexponierten Hautarealen können auch nichtexponierte Bereiche betroffen sein. Morphologisch zeigen sich Erytheme, dermale Infiltrate, Schuppungen und Papulovesikel, die mit starkem Juckreiz verbunden sind.

4.2 Photosensitizer

4.2.1 Einführung Photosensitizer

Photosensitizer (Photosensibilisatoren) sind in der Lage, durch Absorption einer normalerweise unschädlichen Strahlendosis in der Haut eine photochemische und photobiologische Reaktionen auszulösen, die dann zu phototoxischen und photoallergischen Reaktionen führen. Ein Photosensitizer kann dabei sowohl exogen aufgenommen werden als auch endogen, z.B. durch Stoffwechselerkrankungen wie den Porphyrinen entstehen.

4.2.2 Wirkungsmechanismus der Photosensitizer

Verschiedene Substanzen können als Photosensitizer wirken. Neben pflanzlichen Inhaltsstoffen (Goskowicz, Friedlander et al. 1994; Schempp, Schöpf et al. 2002) können auch viele

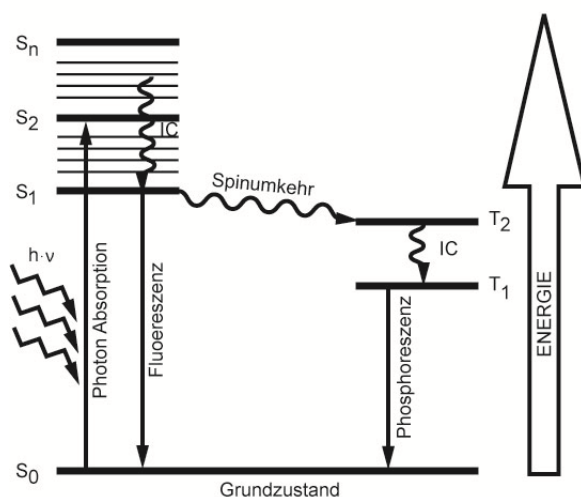


Abbildung 1 : Jablonski Schemata

Arzneistoffe photosensitive Reaktionen auslösen. Die Abbildung 2 gibt einen Überblick über die unterschiedlichen Reaktionswege hin zur Photosensitivität.

Der erste Schritt ist immer die Absorption von Strahlung durch das chromophore System des Photosensitizers. Diese Strahlung liegt im Bereich von 290-750 nm, bedingt durch das Zurückhalten von kürzer-welligem Licht durch die Ozonschicht. Wenn der

Photosensitizer die Energie des Photons absorbiert, geht er vom Grundzustand (S_0) in einen kurzlebigen ($1\text{ns} - 1\mu\text{s}$) Singulett-Zustand ($S_1; S_2$) über. Durch Spinumkehr kann der Photosensitizer dann in den längerlebigen und etwas energieärmeren Triplett-Zustand übergehen. Um von den angeregten Zuständen ($S_1, S_2; T_1; T_2$) wieder auf den Grundzustand (S_0) zu kommen (Vergleiche Abbildung 1), muss das Molekül Energie abgeben. Dies geschieht in

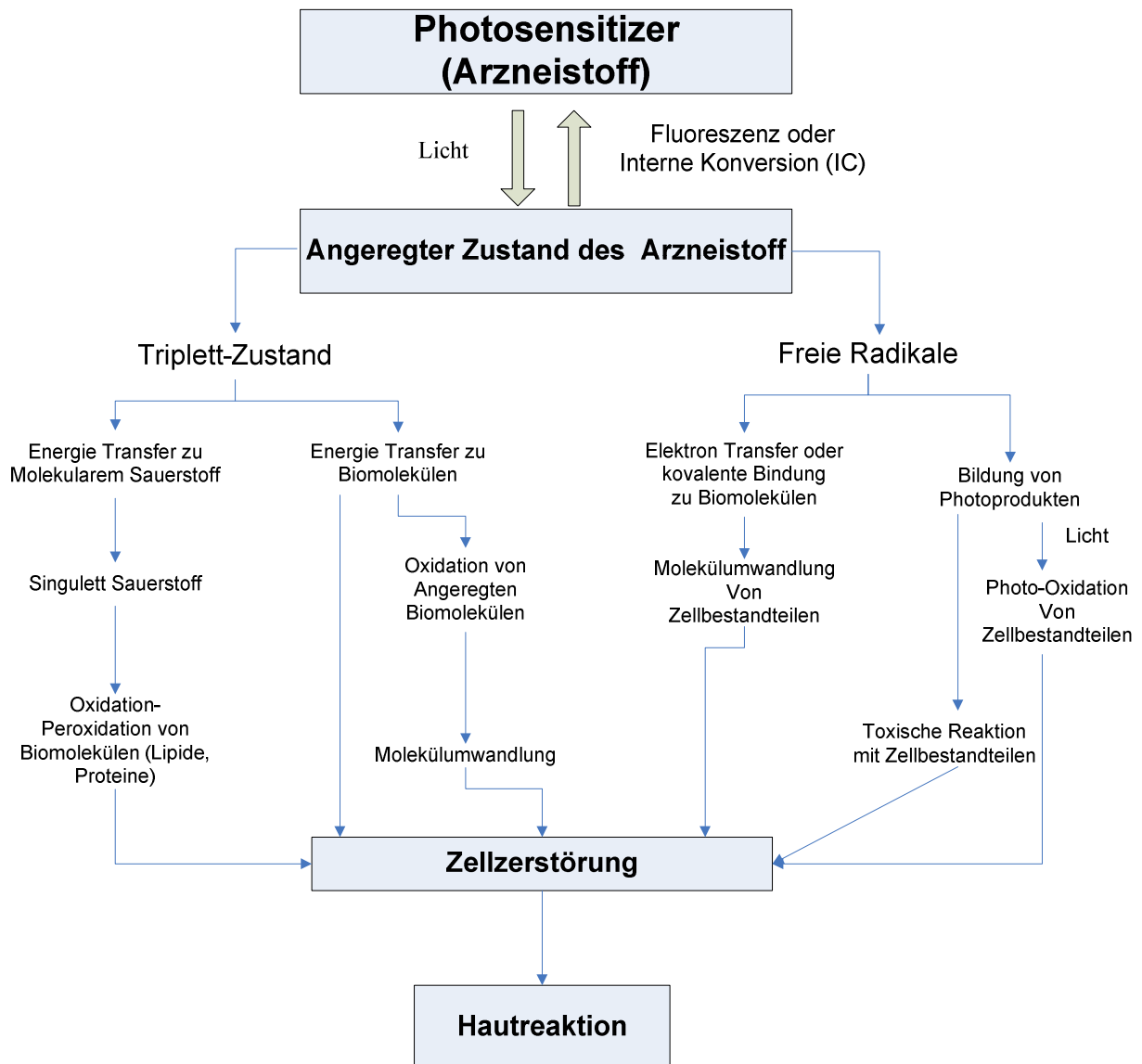


Abbildung 2: Schematische Darstellung über die möglichen Reaktionswege hin zur Photosensitivität (Moore 2002)

Form von Innerer Umwandlung (Internal Conversion), Fluoreszenz, Phosphoreszenz oder durch chemische Reaktionen. Diese chemischen Reaktionen können nach Foote (Foote 1991) in zwei Typen aufgeteilt werden. Bei der Typ-I Reaktion können bei An- und Abwesenheit von Sauerstoff durch Elektron- oder Wasserstofftransfer freie Radikale gebildet werden, welche direkt kovalent mit Biomolekülen reagieren können, oder in Anwesenheit von Sauerstoff

Peroxid- oder Hydroxylradikale bilden, die oxidativ mit anderen Biomolekülen oder DNS reagieren können (Wood and Redmond 1996). Bei der Typ-II Reaktion wird die Energie direkt auf ein Sauerstoffmolekül übertragen und es kommt zur Bildung von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), welcher Lipid und Proteinmembranen oxidieren oder DNS-Schäden induzieren kann. Die $^1\text{O}_2$ -Bildung findet aber nur statt, wenn der Triplett-Zustand des Photosensitizers energiereicher ist als der Singulett-Sauerstoff.

4.3 Photochemische Reaktionen von Arzneistoffen

4.3.1 Chlorpromazin

Chlorpromazin gehört zur Arzneistoffklasse der Phenothiazide, welche seit den 1950igern im Einsatz sind. Es findet als Neuroleptikum seine Anwendung und wird vor allem zur Behandlung von Psychosen wie Schizophrenie und Manie eingesetzt. Zu den unerwünschten Wirkungen gehören neben extrapyramidal-motorische Störungen und Hypotonie auch phototoxische und photosensitive Reaktionen (Fitzpatrick, Pathak et al. 1963; Zelickson and Zeller 1964; Ljunggren and Bojs 1991).

Wie alle in der Medizin eingesetzten Phenothiazide unterliegt Chlorpromazin einer starken Photolabilität. Der photochemische Abbau von Chlorpromazin erweist sich als relativ komplex, denn in Abhängigkeit von der Wellenlänge des absorbierten Lichtes kommt es zu unterschiedlichen Photoprodukten (Motten, Buettner et al. 1985; Oppenländer 1988).

Wie in Abbildung 3 dargestellt, kommt es bei Bestrahlung mit kurzwelligem Licht zur Photoionisation. Das so gebildete Radikal ist mesomeristabilisiert und konnte mit Hilfe der ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden (Motten, Buettner et al. 1985). Im Wässrigen reagiert es weiter zu einem Sulfoxid, im sauren Milieu lässt sich die Reaktion sogar umkehren und es bildet sich wieder Chlorpromazin (Cheng, Sackett et al. 1978). Allerdings kommt Licht im UVC-Bereich nicht nativ auf unserer Erde vor, da es von der Erdatmosphäre zurück gehalten wird. Auf Grund dessen ist der Reaktionsweg bei 330 nm direkt über einen angeregten Triplettzustand des Chlorpromazins in Hinsicht auf eine induzierte Photosensitivität relevanter. Hier kann es wieder zur Sulfoxidbildung kommen, jedoch biologisch bedeutsamer ist die Bildung des Promazylnradikal durch Dechlorierung. Es wurde für das Promazylnradikal nachgewiesen, dass es mit Guanosinmonophosphat kovalent reagieren kann (Ciulla, Epling et al. 1986) und dementsprechend unter UV-Bestrahlung auch mit DNS reagiert. Desweiteren kann es zur Bildung von Promazin und Promazinpolymeren kommen.

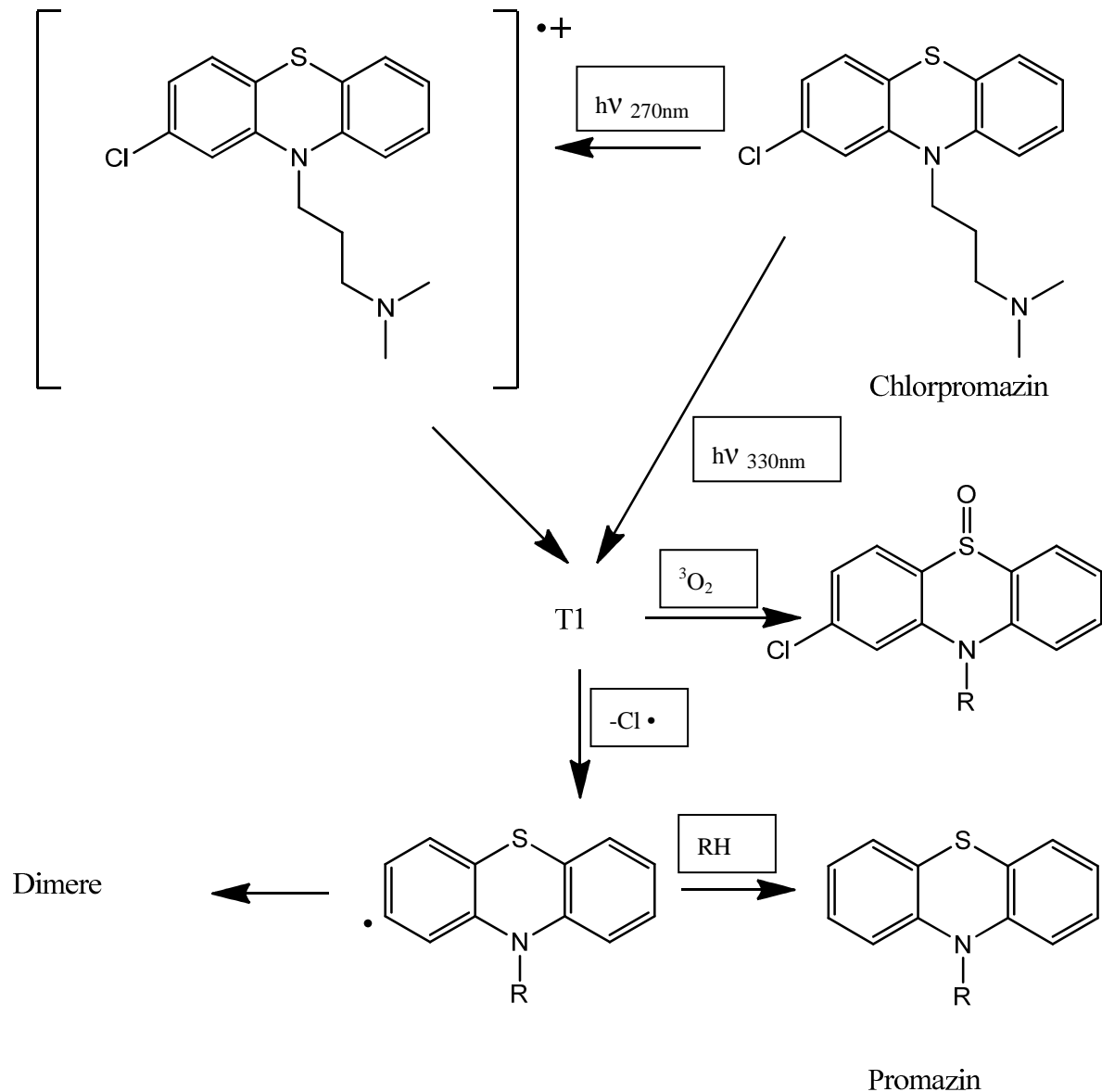


Abbildung 3: Photochemischer Abbau von Chlorpromazin (Gocke 1996)

4.3.2 Benzophenone

Zu den vom Benzophenon (BP) abgeleiteten Arzneistoffen gehören nichtsteroidale Antirheumatika (NSAID) wie Ketoprofen, Tolmetin und Tiaprofensäure, aber auch das Antiarrhythmikum Amiodaron und der Lipidsenker Fenofibrat. All diese Arzneistoffe verursachen als unerwünschte Wirkung eine photosensitive Hautreaktion (Boscá and Miranda 1998).

4.3.2.1 Photochemische Reaktionen von Benzophenon

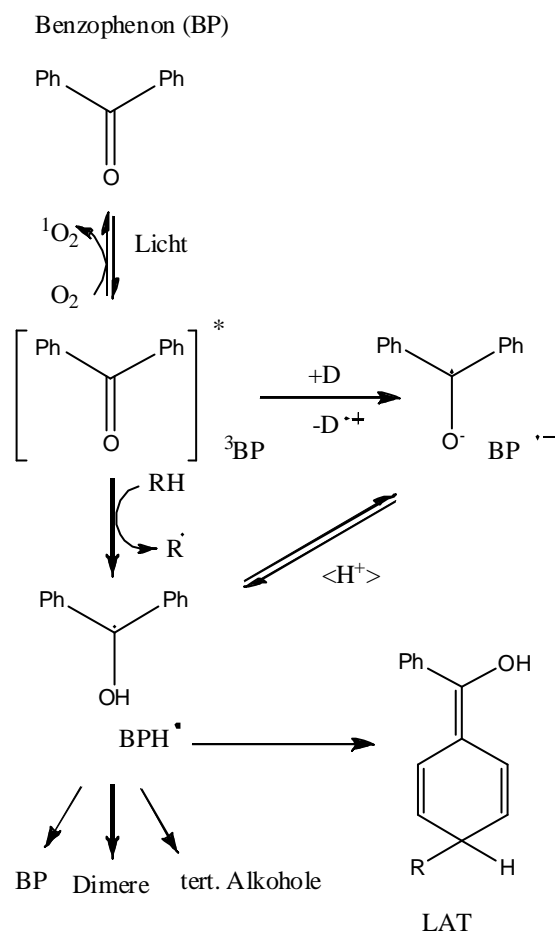


Abbildung 4: Photochemische Reaktionen von Benzophenonen

die Reaktion zwischen zwei BPH^{\bullet} -Radikalen (Filipescu and Minn 1968). Die gebildeten LAT-Moleküle zeichnen sich dadurch aus, dass sie selbst wieder längerwelliges Licht absorbieren können und langlebig unter Bestrahlung sind. Sie können unter Sauerstoff zurück zu BP reagieren oder wieder zu BPH^{\bullet} -Radikale zerfallen.

Das Benzophenonchromophor ist in der Lage, Photonen im UVA und UVB Bereich zu absorbieren. Die photochemischen Reaktionen von Benzophenon werden in Abbildung 4 dargestellt. Wenn BP durch Licht angeregt wird, geht ein Elektron aus dem nichtbindenden Orbital am Sauerstoffatom in das antibindende Orbital (π^*) über. Dieses angeregte Sauerstoffatom ist in der Lage, mit schwachen C-H Bindungen zu interagieren und durch elektrophilen Angriff das Wasserstoff zu binden und dadurch ein Radikal (BPH^{\bullet}) zu bilden. Das BPH^{\bullet} -Radikal ist in der Lage das Wasserstoffatom wieder abzugeben und zu BP zurück zu reagieren. Außerdem kann das gebildete BPH^{\bullet} -Radikal Dimere bilden oder sich mit Alkylradikalen kombinieren und tertiäre Alkohole bilden. Weitere normalerweise vorkommende Photoprodukte sind die sogenannten „Light Absorbing Transients“ (LAT), sie entstehen durch Reaktionen mit Alkylradikalen oder durch

4.3.2.2 Ketoprofen

Ketoprofen gehört zu den NSAIDs und wird häufig therapeutisch in dermalen Zubereitungen verwendet. Von Ketoprofen ist bekannt, dass es als Photosensitizer wirken kann, dies wurde sowohl in vitro als auch in vivo nachgewiesen (Costanzo, Guidi et al. 1989; Condorelli, De Guidi et al. 1993).

Es gibt zwei mögliche photochemische Reaktionswege für Ketoprofen, welche in Abbildung 5 schematisch dargestellt sind. Auf der einen Seite ist eine Photoionisation möglich und auf der anderen Seite kommt es zu einer Photodegeneration. Durch einen intramolekularen Elektronentransfer, die von Budac und Wan postuliert wurde (Budac and Wan 1992). Bei beiden Reaktionswegen kommt es zu einer Decarboxylierung, wobei erst das deprotonierte Ketoprofen in der Lage ist, CO_2 abzuspalten. Dies geschieht beim von Budac und Wan postulierten Reaktionsweg über mehrere ionische Zwischenprodukte. Zuerst kommt es ausgehend vom Triplett-Zustand des Ketoprofens (^3KPF) zu einem intramolekularem Elektronen-Transfer, wobei das Elektron von der Carboxylgruppe zum Akzeptor, der Carbonylgruppe, wandert. Dadurch bildet sich ein Biradikal (KPF 2), welches sich ebenfalls im Triplett-Zustand befindet. Durch Decarboxylierung wird das kurzlebige Zwischenprodukt KPF 3 gebildet. Dieses reagiert dann durch Wasserstoffaufnahme und Intersystem Crossing (ISC) zu (3-Benzoylphenyl)ethan, welches als Endprodukt anzusehen ist. KPF 3 kann aber auch erst durch Wasserstoffaufnahme zu dem langlebigeren Biradikal (KPF 4) reagieren, welches wiederum durch einen H-Shift und ISC zu dem Endprodukt (3-Benzoylphenyl)ethan reagiert.

Die mögliche Photoionisation startet ebenfalls bei dem unter Licht gebildeten ^3KPF . Es kommt zur Photoionisation und es bildet sich das Ketoprofenradikal KPF^\bullet . Dieses Ketoprofenradikal ist ebenfalls in der Lage CO_2 abzuspalten und so ein Benzylradikal (KPF5) zu bilden. Dieses Benzylradikal kann wiederum über einen Radikal-Radikal Rekombinationsprozess 2. Ordnung zu Dimeren-Produkten führen (Boscá, Miranda et al. 1994).

In einer Studie von Cosa et al (Cosa, Lukeman et al. 2009) wird postuliert, dass die Photodegradation von Ketoprofen nicht über den Triplett-Zustand, sondern über einen Singulett-Zustand stattfindet. Doch auch Cosa findet die Decarboxylierung zum Benzylradikal (KPF 4), außerdem ist das (3-Benzoylphenyl)ethan das Endprodukt seiner postulierten Photodegeneration, so dass der Hauptunterschied in der Ausgangslage Triplett oder Singulett-Zustand liegt. Desweiteren wurde gezeigt, dass das Photoprodukt KPF^\bullet das höchste phototoxische Potential besitzt (González and González 1996).

Durch die Radikalbildung ist Ketoprofen in der Lage, zur Photoperoxidation von Lipiden zu führen, die Membranschäden erklären würde (Boscá, Miranda et al. 1994). Desweiteren kann Ketoprofen unter Einfluss von Licht DNA-Stränge brechen. Dies geschieht entweder ebenfalls über einen radikalischen Mechanismus oder über Elektronen Transfer (Artuso, Bernadou et al. 1991).

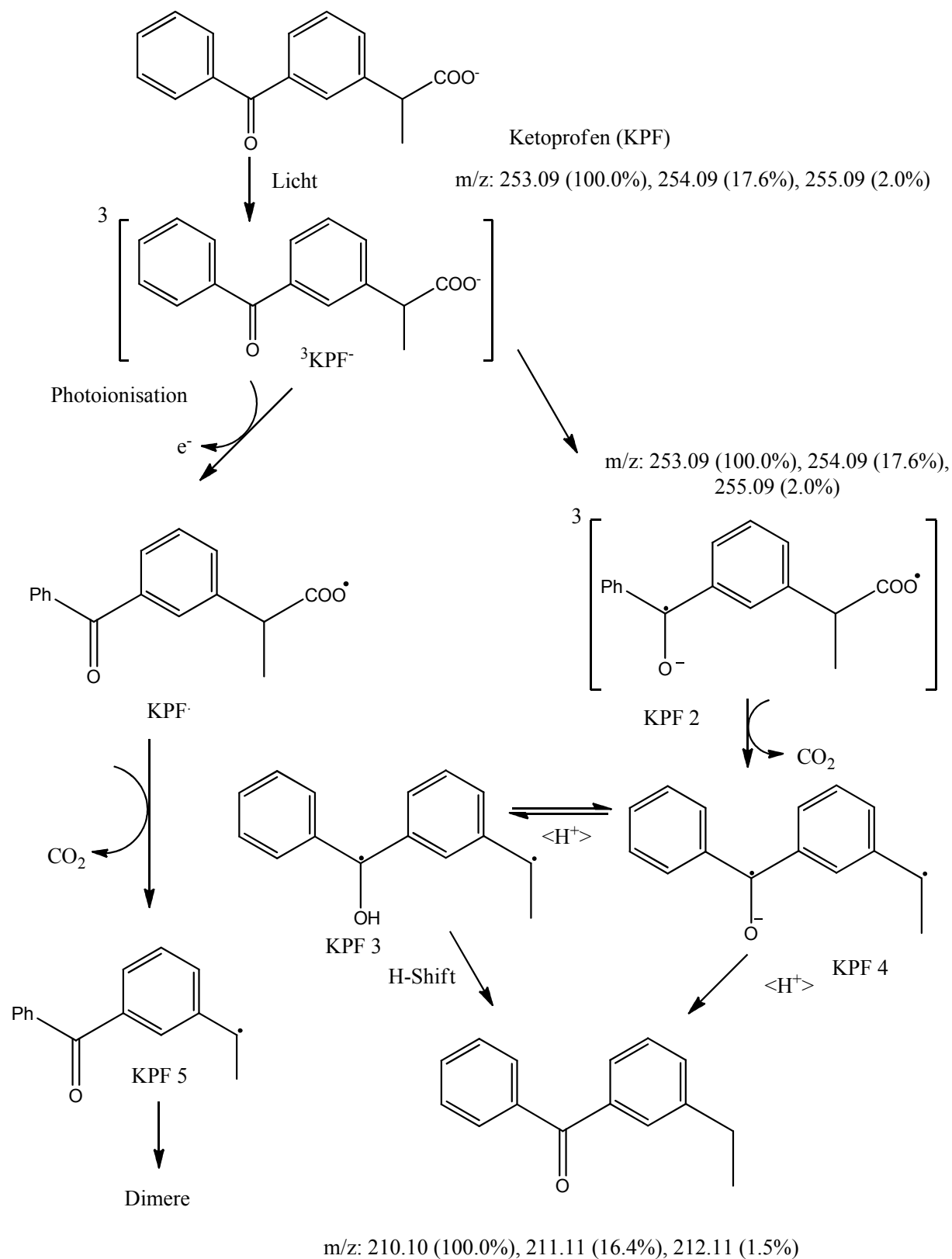


Abbildung 5: Photodegradation von Ketoprofen

4.3.2.3 Amiodaron

Amiodaron gehört zu den Antiarrhythmika und besitzt zusätzlich vasodilatorische Eigenschaften und wird häufig bei tachykarden Herzrhythmusstörungen eingesetzt. Neben seiner guten Wirksamkeit bei Herzrhythmusstörungen besitzt es aber auch viele unerwünschte Wirkungen, wie z.B.: Schilddrüsenfunktionsstörungen, Pneumonitis, Vortexkeratopathie und photosensitive Hautreaktionen (Raeder,

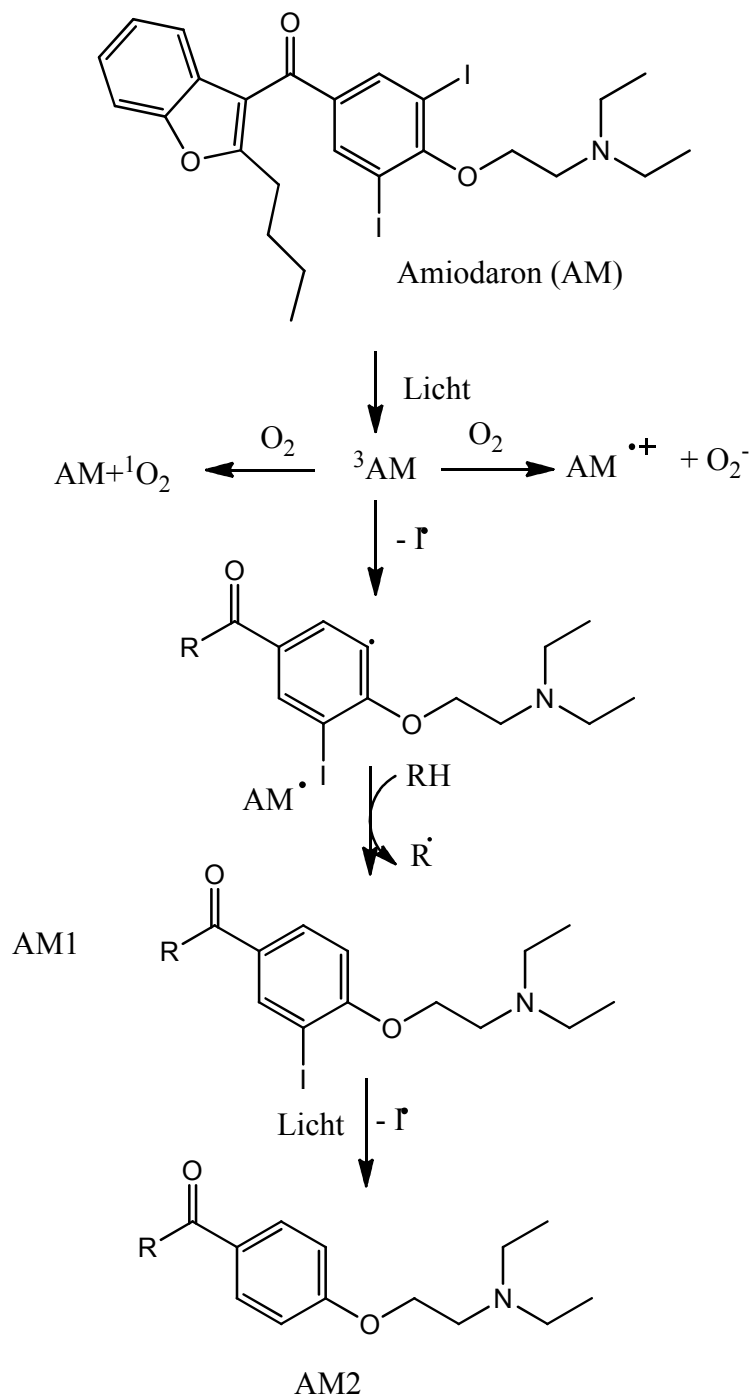


Abbildung 6: Photodegradation von Amiodaron

ve Hautreaktionen (Raeder, Podrid et al. 1985). Die photosensitiven Hautreaktionen traten bei Studien bei mehr als 50% der Patienten auf (Blackshear and Randle 1991) und äußerten sich meist in Form eines verstärkten Sonnenbrandes. Das phototoxische Potential von Amiodaron wurde von Ljunggren und Möller an der Maus gezeigt und später von Hasan et al. auch in vitro an Blutzellen gezeigt (Ljunggren and Möller 1978; HASAN, E Kochevar et al. 1984).

Bei der Bestrahlung von Amiodaron mit Licht kommt es laut Literatur zu drei Hauptphotoprodukten (Abbildung 6: Photodegradation von Amiodaron), wobei die Photodegradation vom angeregten Triplett-Zustand des Amiodarons (^3AM) ausgeht. Dieses ^3AM ist in der Lage mit Sauerstoff zu reagieren und reaktive Sauerstoffspezies zu produzieren (Li and Chignell 1987).

Der entscheidende Schritt der

Photodegradation ist aber die initiale homolytische Spaltung der C-I Bindung, der zum

Arylradikal AM^{\bullet} führt. Über Addition eines Wasserstoffes reagiert das Arylradikal weiter zu $AM1$. Hier kommt es wieder zur Dehalogenierung und es entsteht $AM2$ (Paillous and Verrier 1988).

Was die Photoreaktivität von Amiodaron gegenüber Biomolekülen angeht, so wurde bereits gezeigt, dass Amiodaron unter Anwesenheit von Sauerstoff Phospholipide oxidieren kann (Sautereau, Tournaire et al. 1992). Wobei das Arylradikal (AM^{\bullet}) ein Wasserstoffatom von den Lipiden aufnimmt und es so zu einer oxidativen Radikalkettenreaktion kommen kann. Von Hasan et al. wurde postuliert, dass die phototoxischen Reaktionen ebenfalls mit der Radikalbildung bzw. der Wasserstoff-Abstraktion zu tun haben und es so zur Membranschädigung kommt (HASAN, E Kochevar et al. 1984).

4.3.3 Furosemid

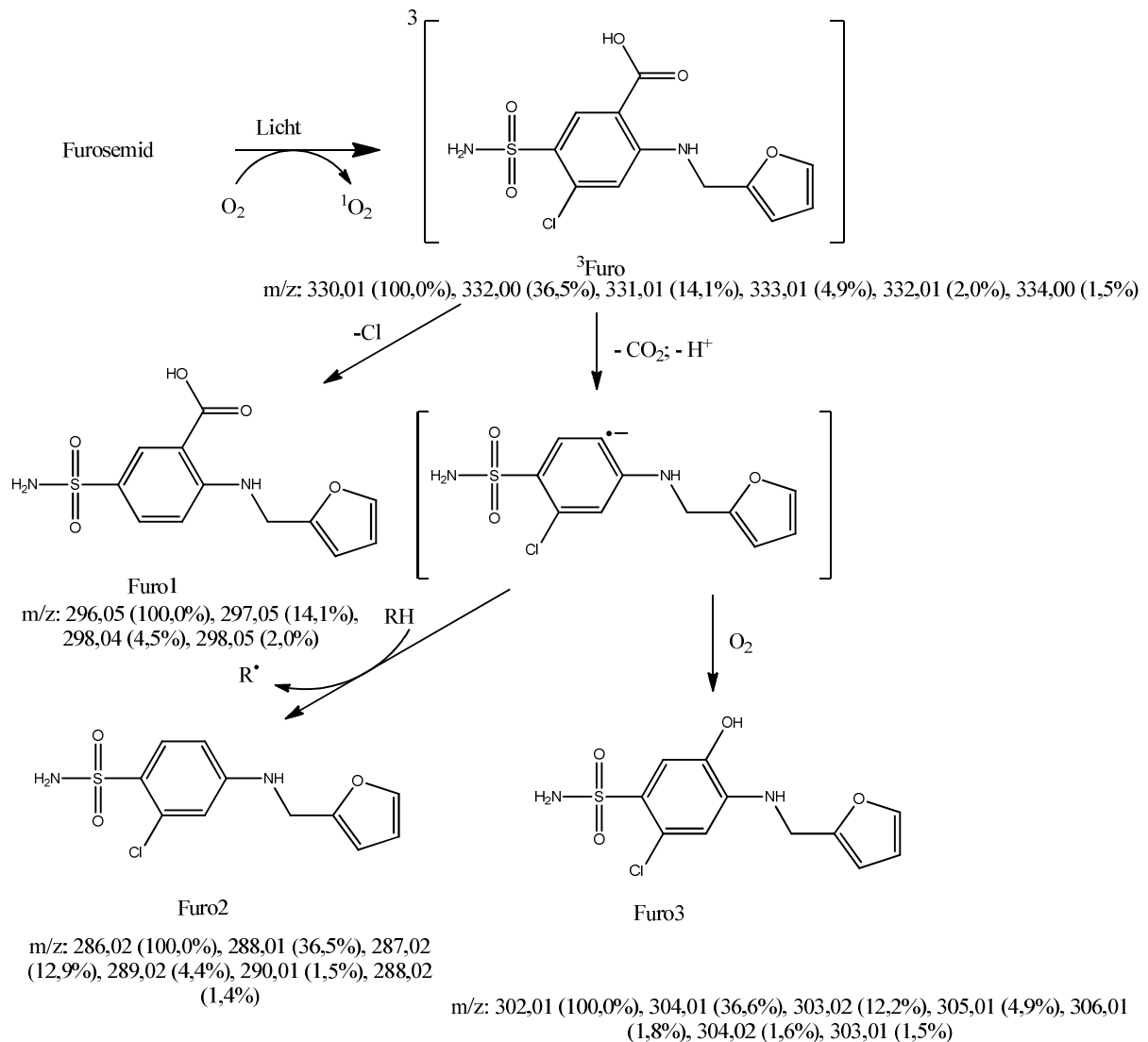


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Photodegradation von Furosemid

Furosemid (4-Chloro-2-(furan-2-ylmethylamino)-5-sulfamoylbenzoesäure) gehört zu der Gruppe der Diuretika und Antihypertensiva und findet häufig in der aktuellen Medizin Anwendung (Weiner and Mudge 1990). Neben der diuretischen Hauptwirkung wurde *in vitro* auch eine phototoxische Wirkung von Furosemid nachgewiesen (Selvaag, Anholt et al. 1996), außerdem wurden photosensitive Hautreaktion bei Hochdosistherapien beobachtet (BURRY and LAWRENCE 1976; Heydenreich, Pindborg et al. 1977). Desweiteren ist für Furosemid bekannt, dass es in der Lage ist, Lipide zu autoxidieren und Photohemolyse zu verursachen. Ein entscheidender Vorgang scheint dabei die Singulett-Sauerstoffbildung zu sein. Die Photodegradation von Furosemid wurde von Vargas et al. untersucht und ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt (Vargas, Martinez Volkmar et al. 1998).

Unter aeroben Bedingungen bildet sich bei der Bestrahlung von Furosemid Singulett-Sauerstoff und Furosemid geht in einen angeregten Triplett-Zustand über ($^3\text{Furo}$). Ausgehend von diesem angeregten Zustand des Furosemids kommt es durch eine Decarboxylierung zu einem radikalischen Zwischenprodukt, welches zu verschiedenen Produkten reagieren kann. Über einer Wasserstoffabstraktion wird das Photoprodukt Furo2 gebildet. Als Konkurrenzreaktion gibt es die Dechlorierung zum Photoprodukt Furo1. Beide Reaktionen laufen sowohl im aeroben wie auch im anaeroben ab. Im Gegensatz dazu wird das Photoprodukt Furo3 unter aeroben Bedingungen gebildet. Das Hauptphotoprodukt ist aber Furo2.

4.3.4 Naproxen

Naproxen gehört wie Ketoprofen zu den NSAIDs und zeigt mit seiner 2-Arylpropionsäuresubstitution Strukturverwandtschaft. So ist es auch nicht verwunderlich, dass Naproxen ein ähnliches photochemisches Verhalten zeigt wie Ketoprofen. Der primäre Schritt bei der Photodegradation von Naproxen ist die Decarboxylierung, die mit einer Radikalbildung einhergeht. Dies geschieht über eine Photoionisation. Desweiteren ist Naproxen in der Lage, in Gegenwart von Sauerstoff Singulett-Sauerstoff zu bilden (Costanzo, De Guidi et al. 1989). Dies passiert im Zuge der Bildung weiterer Photoprodukte, wie schematisch nach Moore et al. in Abbildung 8 dargestellt. Dabei bildet sich nach der Decarboxylierung unter aeroben Bedingungen und Wasserstoffabstraktion ein intermediäres Hydroperoxid (NPX2). Welches dann zum sekundären Alkohol weiter reagiert (NPX3) und schlussendlich zum Keton (NPX4) als Endprodukt reagiert (Moore 2002).

Der photosensitive Effekt von Naproxen, der bei Patienten beobachtet werden konnte (Diffey, Daymond et al. 1983), kann also sowohl durch die Singulett-Sauerstoff-Bildung als auch durch die Radikalbildung verursacht werden. In vitro konnte sowohl Licht induzierter DNA-Strangbruch als auch Photohemolyse für Naproxen nachgewiesen werden (Artuso, Bernadou et al. 1991).

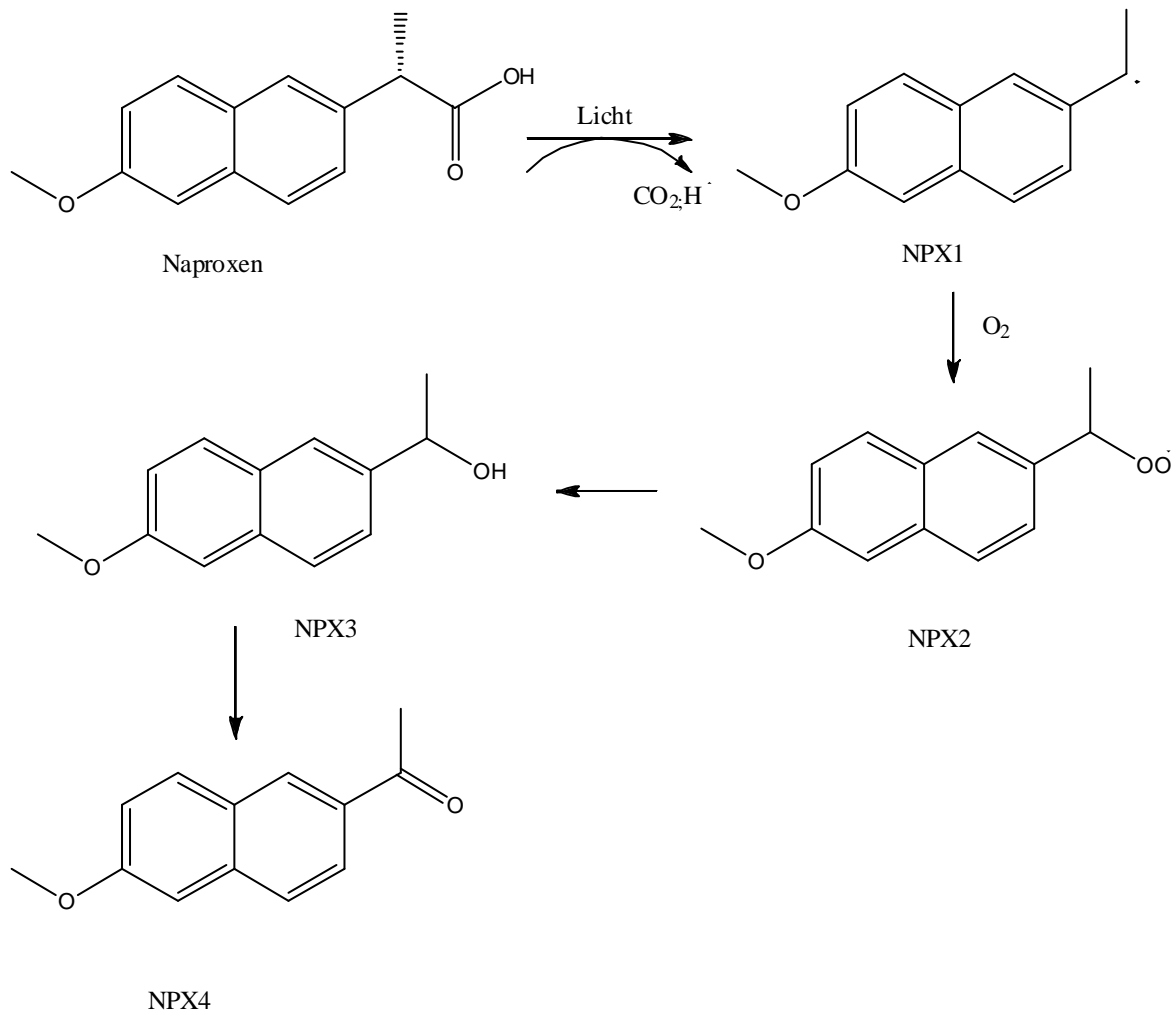


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Photodegradation von Naproxen (Moore 2002)

4.4 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gehören unter anderen zu den Nebenprodukten des aeroben Stoffwechsels und werden auch bei Entzündungsprozessen gebildet und spielen eine Rolle bei pathologisch metabolischen Prozessen (Halliwell and Gutteridge 1984). Desweiteren spielen

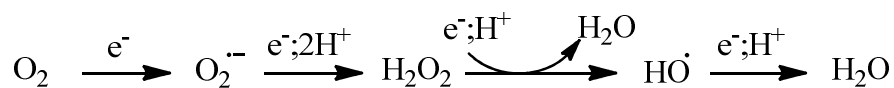


Abbildung 9: Reduktionskette von molekularem Sauerstoff

sie eine wichtige Rolle bei phototoxischen Reaktionen von Arzneistoffen in der Haut. Zu den ROS gehören neben den nicht radikalischen Formen Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) auch die radikalischen Formen: Superoxidanionen-Radikale ($\text{O}_2^{\cdot -}$), Hydroxyl-

Radikale (OH^\bullet), Peroxyl-Radikale (ROO^\bullet) und Alkoxy-Radikale (RO^\bullet). Die Bildung der verschiedenen ROS-Spezies erfolgt in mehreren Schritten über die Reduktion von molekularem Sauerstoff (Abbildung 9) (Hippeli and Elstner 1999). Dafür benötigt nur der erste Schritt eine äußere Energiezufuhr, alle folgenden Schritte sind exotherm und können entweder spontan oder katalytisch ablaufen (Dat, Vandenabeele et al. 2000).

Um eine massive zelluläre Schädigung zu verhindern, verfügen Zellen über eine Vielzahl von Schutzmechanismen. So können die enzymatischen Antioxidantien wie z.B.: Katalasen, Superoxiddismutase, Glutathion-Peroxidase u.a., als auch die nicht enzymatischen Antioxidantien wie Ascorbinsäure, Flavonoide, Tocopherole u.a. die Zelle vor ROS schützen (Bandyopadhyay, Das et al. 1999). Wenn es zu einer übermäßigen Produktion von ROS kommt, so dass das Maß des Normalen überstiegen wird und die endogenen antioxidativen Mechanismen nicht mehr ausreichen, spricht man vom „oxidativem Stress“. Beim Auftreten des „oxidativen Stresses“ kann es dann zur Schädigung biologischer Makromoleküle wie Proteine, Lipide, Kohlenhydrate und DNA kommen (Balasubramanian, Du et al. 1990; Dean, Fu et al. 1997; Marnett 2000).

Eine große Bedeutung hat das Hydroxylradikal, da es über ein starkes oxidatives Potential verfügt und in der Lage ist, unspezifisch mit fast allen Molekülen zu reagieren (Buxton, Greenstock et al. 1988). Das Hydroxylradikal kann aus H_2O_2 gebildet werden und ist in der Lage, über eine Wasserstoff- oder Elektronabstraktion mit Biomolekülen zu reagieren.

Das Superoxidradikal im Gegensatz zum Hydroxylradikal stellt ein mildes Oxidans dar und ist daher nicht in der Lage, Biomoleküle zu schädigen. Allerdings ist es fähig, Membranen zu passieren (Gomes, Cuccovia et al. 1993) und kann dann zu anderen ROS-Spezies weiterreagieren.

Singulett-Sauerstoff spielt in biologischen Systemen verschiedene und wichtige Rollen. Er ist in der Lage, Moleküle zu oxidieren, hat projektive Eigenschaften im Organismus und kann Organismen zerstören die schädigend sein können (Ogilby 2010). Dabei ist Singulett-Sauerstoff in der Lage, mit Nucleinsäuren (Cadet, Ravanat et al. 2006) und Proteinen (Davies 2004) zu reagieren, wobei die Art der Interaktion mit den Biomolekülen stark von der Lokalisation des Singulett-Sauerstoffes in der Zelle abhängig ist (Plaetzer, Kiesslich et al. 2003). Außerdem spielt Singulett-Sauerstoff eine zentrale Rolle bei dem lichtinduzierten Zelltod, dabei wird die Reaktion als Typ II Reaktion bezeichnet, wenn Singulett-Sauerstoff involviert ist.

4.5 Elektronenspinresonanz Spektroskopie

4.5.1 Einführung in die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR), auch EPR (electron paramagnetic resonance) genannt, findet sowohl in der Chemie als auch in der Physik ihren Einsatz. Die ersten Experimente, auf welche die ESR zurück gehen, wurden im Jahre 1944 vom Physiker Yevgeny Zavoisky (Zavoisky 1945) gemacht. Damals beobachtete er das erste ESR-Signal, ausgehend von einer paramagnetischen $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Probe.

Es handelt sich bei der ESR um eine Absorptionsspektroskopie, die zur Untersuchung von paramagnetischen Substanzen dient. Sie ist in ihren Prinzipien der Kernspinresonanz Spektroskopie (NMR) sehr ähnlich. Denn bei beiden spektroskopischen Methoden wird die Wechselwirkung zwischen elektromagnetischen Wellen und dem magnetischen Moment μ ausgenutzt. In der ESR wird das magnetische Moment von Elektronen gemessen, während in der NMR der magnetische Moment der Kerne gemessen wird. Daraus ergibt sich der wesentliche Unterschied in den angewendeten Frequenz-Bereichen. Während bei der ESR meist im Bereich von 9-360 GHz gearbeitet wird, werden bei der NMR vergleichbar niedrige Frequenzen bis 800 MHz genutzt. Dies ist bedingt durch die unterschiedlichen Massen von Elektronen und Kernen und den daraus resultierenden unterschiedlichen magnetischen Momenten.

4.5.2 Grundlagen der ESR

Jedes Elektron besitzt ein magnetisches Moment μ , welches durch seine Ladung und den Gesamtimpuls J , der sich aus den Spin S und den Bahndrehimpuls L ergibt, erzeugt wird.

$$\mu = -g\gamma_e J$$

4-1

$g = \text{Landé - Faktor}$

$\gamma_e = \text{gyromagnetisches Verhältnis des Elektrons}$

Wird ein Elektron in ein homogenes Magnetfeld eingebracht, so wird die Entartung des Elektrons aufgehoben und es kann sich mit seinem Spinvektor parallel oder antiparallel zum magnetischen Feld B ausrichten. Wobei die parallele Ausrichtung zu einem energetisch niedrigeren Zustand führt als die antiparallele Ausrichtung. Die beiden Energiezustände werden wie folgt beschrieben:

$$E = +\frac{1}{2} g_e \beta_e B$$

oder

$$E = -\frac{1}{2} g_e \beta_e B$$

4-2

Diese Aufspaltung in zwei oder mehrere verschiedene Energiezustände wird Zeeman Effekt genannt. Da die Energie proportional zum magnetischen Feld ist, ändert sich die Energiedifferenz der beiden Zustände in Abhängigkeit der Magnetfeldstärke. Diese Energiedifferenz ist die Grundlage für die ESR-Messungen. Denn das Elektron kann zwischen den beiden Zuständen hin und her wechseln, wenn es entweder Energie aufnimmt oder abgibt. Damit das Elektron angeregt wird und in das höhere Energieniveau wechselt, muss ein bestimmter Energiebetrag ΔE eingestrahlt und absorbiert werden. Dies passiert in der ESR mit Hilfe eines Mikrowellenfeldes, welches senkrecht zum magnetischen Feld B orientiert ist.

$$\Delta E = h\nu$$

h : Plancksches Wirkungsquantum

ν : Frequenz

4-3

Ein ESR-Spektrum kann also erhalten werden, in dem man entweder die Mikrowellenfrequenz ändert oder das magnetische Feld. In der Praxis wird die Frequenz konstant gehalten und die magnetische Feldstärke geändert. Einen Überblick über die beschriebenen Vorgänge zeigt Abbildung 10.

Dies kann man allerdings nur bei ungepaarten Elektronen messen, da nach dem Pauli-Prinzip kein Elektron in seinen Quantenzahlen übereinstimmen darf. Daraus folgt, dass ein Orbital nur zwei Elektronen enthalten darf und zum anderen die beiden Elektronen immer einen entgegengesetzten Spin haben müssen. Die daraus folgenden magnetischen Momente heben sich also gegenseitig auf, der Gesamtmoment beträgt Null. Um ein ESR-Signal zu erhalten, benötigt man also immer mindestens ein Orbital mit einem ungepaarten Elektron. Dies führt dazu, dass die ESR eine relativ hohe Selektivität hat, da diamagnetische Stoffe in der Matrix der Probe kaum stören.

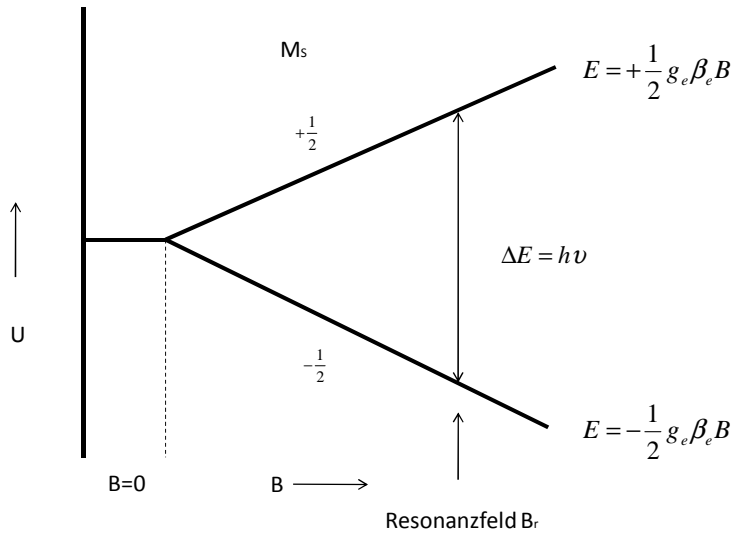


Abbildung 10: Darstellung der Energieniveaus eines ungepaarten Elektrons als Funktion des angelegten magnetischen Feld B (Weil and Bolton 2007)

4.6 Aufbau des analytischen Systems

Das analytische System besteht aus einem modifizierten HPLC System. Neben den üblichen Komponenten wie Gradientenpumpen, UV/VIS-Detektor, Injektor und Interface gehört ein Photoreaktor mit zum Aufbau.

Photoreaktoren werden schon länger mannigfaltig in der Analytik eingesetzt, meist zur Optimierung, d.h. zur Erhöhung der Empfindlichkeit und/oder Selektivität (Twitchett, Williams et al. 1978). Die Kopplung eines Photoreaktors mit einer HPLC wurde sowohl post als auch precolumn schon beschrieben (Brinkman, Welling et al. 1981; Parlar 2000). Grundlage des verwendeten Photoreaktors ist der in der Arbeitsgruppe Surmann entwickelte und konstruierte Photoreaktor von Parlar (Parlar 2000). Dieser besteht aus einem Aluminiumrohr als äußere Hülle, welches mit einer reflektierenden Folie ausgekleidet ist, damit die ausgesendete Strahlung der Lichtquelle reflektiert wird und sich die Quantenausbeute erhöht. Hindurch führt eine gehäkelte Reaktionskapillare, welche einen Niederdruckstrahler ummantelt. Durch die Verhäkelung wird einer Peakverbreiterung entgegengewirkt (Poulsen, Birks et al. 1986). Die Temperatur innerhalb des Photoreaktors wurde mit Hilfe eines Lüfters geregelt. Als Reaktionskapillare wurde eine Kunststoffkapillare aus Ethylen-Tetrafluorethylen (ETFE) verwendet. ETFE bringt die geforderten Eigenschaften mit sich, dadurch dass die Kapillaren bis zu 260

bar druckstabil sind und auch für Strahlung im benötigten Wellenlängenbereich permeabel sind.

Es gibt zwei verschiedene apparative Aufbaumöglichkeiten, welche in Abbildung 11 und Abbildung 12 dargestellt sind. Bei dem in Abbildung 11 dargestellten System handelt es sich um die von Schröder entwickelte Kopplung des Photoreaktors an eine HPLC mit Säulenschaltung

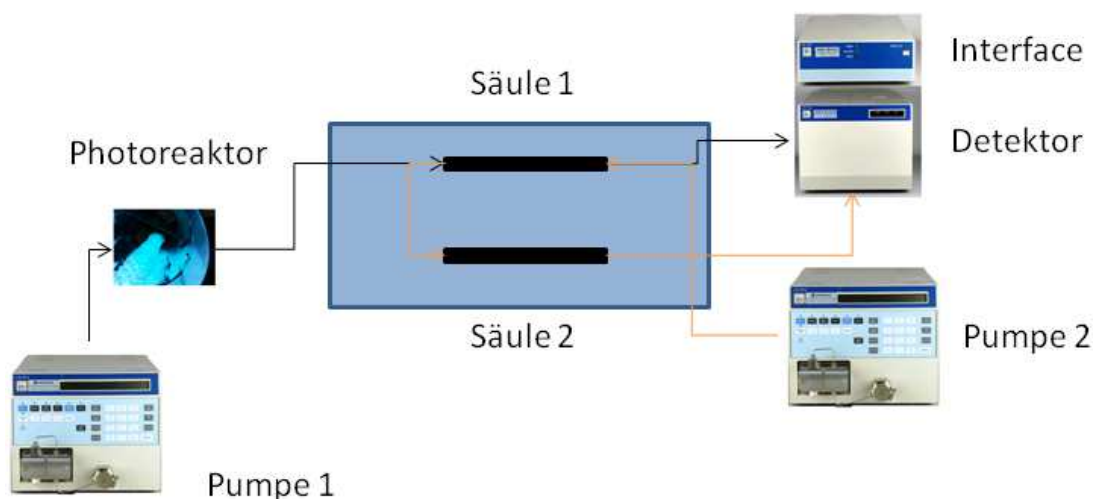


Abbildung 11: Apparativer Aufbau des HPLC online System mit Säulenschaltung

(Schröder 2007). Dabei wird im wässrigen Medium bestrahlt, und der Arzneistoff inklusive Photoprodukte soll auf der ersten Säule angereichert werden, bis es zur Umschaltung und damit zur Flussumkehr kommt und das Gemisch über eine zweite Säule mit Hilfe eines Gradienten aufgetrennt wird. Zum Einsatz kamen hier zwei Aqua Säulen der Firma Phenomenex. Diese Variante hat den Vorteil, dass die Säule 2 nicht im rein wässrigen betrieben wird und somit eine bessere Trennleistung erzielt wird und dass die Kapillaren des Photoreaktors nicht lange größerem Druck ausgeliefert sind. Auf der anderen Seite stehen die Nachteile, dass polare Substanzen schon über Säule 1 eluieren und beobachtet werden muss, ob sie im Zuge der Umschaltung nicht erfasst werden. Außerdem kommt es durch die Ventilschaltung zu Turbulenzen in der Strömung und damit zur Störung des Gleichgewichtes in der Säule 2, was zu einer Störung der Baseline führt.

Durch den Einsatz von monolithischen Säulen war es möglich, den Gegendruck des Systems stark zu reduzieren. Dadurch konnte der Photoreaktor direkt vor die Trennsäule im Dauerbetrieb eingesetzt werden, wie in Abbildung 12 dargestellt, ohne dass es zu einer verstärkten

Materialbelastung der Reaktionsschleife kam, welche anfällig gegen erhöhte Drücke ist. Der geringe Gegendruck der monolithischen Säulen ist durch deren besondere Eigenschaften bedingt. Selbst bei höheren Flussraten ist durch die offene Porenstruktur ein geringer Gegendruck gewährleistet. Auf der einen Seite sorgen die Makroporen, die einen durchschnittlichen Durchmesser von $2\mu\text{m}$ haben, dafür, dass das Fließmittel schnell und mit geringem Gegendruck durch die Säule gelangt. Auf der anderen Seite sorgen die Mesoporen, welche einen durchschnittlichen Durchmesser von 130 \AA besitzen, für eine optimale Trennung (Tanaka, Kobayashi et al. 2001). Außerdem zeigen monolithische Säulen eine bessere Trennleistung gegenüber Biomolekülen, da in der Mesopore eine schnelle Wechselwirkung mit der stationären Phase des Monoliths gewährleistet ist und auch die Wegstrecke für den Massentransfer zwischen diesen Poren viel kürzer ist, als in herkömmlichen Polymerteilchen. Dies führt dazu, dass in einer monolithischen Säule der Massentransfer selbst bei größeren Biomolekülen durch die Konvektion geprägt ist, während in klassischen Säulen hingegen der Massentransfer durch Diffusion, die sich mit zunehmendem Molekulargewicht der Analyten verlangsamt, bestimmt ist (Svec and Tennikova 2003). Daher ist der diffusionskontrollierte Massentransfer bei monolithischen Trennsäulen minimiert, was die chromatographische Effizienz und Auflösung von Biopolymertrennungen verbessert (Rao 2008). Somit besitzen die ausgewählten monolithischen Säulen die benötigten Eigenschaften.

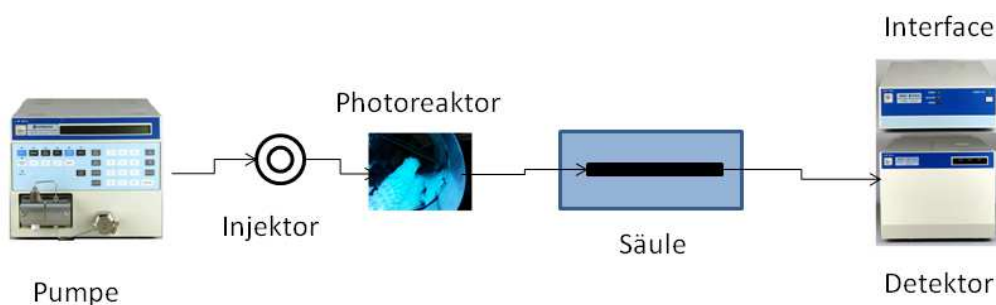


Abbildung 12: Apparativer Aufbau des HPLC online System mit einer Säule

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Qualifizierung der Lichtquellen

5.1.1 Spektrum der eingesetzten Strahlungsquellen

Wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, müssen die im System zu verwendenden Niederdruckstrahler einige Spezifikationen erfüllen. Das Wichtigste ist der Wellenlängenbereich, der das Sonnenlicht zwar nicht komplett simulieren soll, aber einzelne seiner Bereiche liefern soll. Zur Differenzierung des Wellenlängenbereichs wurden Quecksilberdampflampen der Firma Waldmann ausgewählt, die einmal im UVA- und einmal im UVB-Bereich Licht emittieren sollten. Es musste überprüft werden, ob diese Lampen wirklich nur im angegebenen Bereich Licht ausstrahlen, damit es zu keinen fehlerhaften Interpretationen kommen kann. Dafür wurden die Lampen jeweils in einen optischen Aufbau eingefügt und dass von ihnen ausgestrahlte Licht wurde über einen Spiegel zu einem Detektor umgeleitet, um die einzelnen Wellenlängen mit Hilfe eines Referenzlasers überprüfen zu können. Die ermittelten Spektren sind für die beiden Lampen in Abbildung 13 zu sehen.

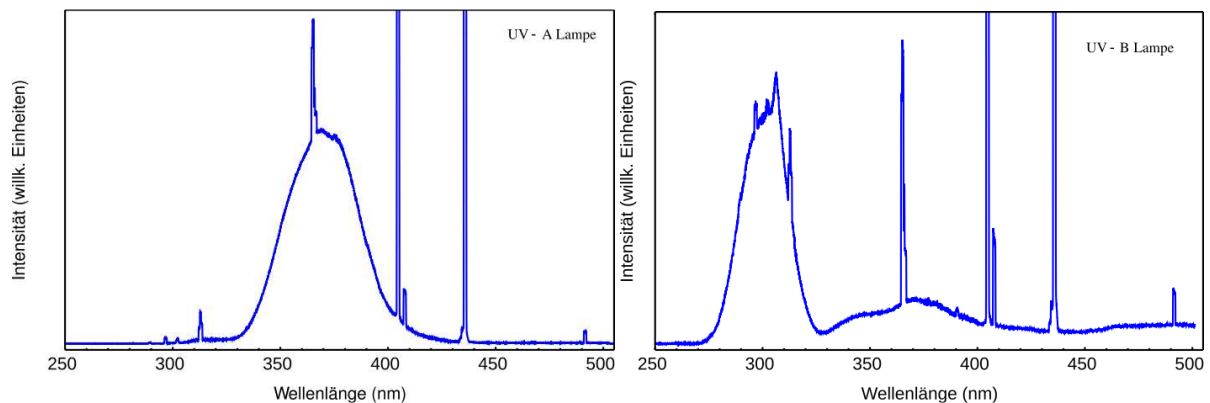


Abbildung 13: Spektren des von den eingesetzten Lampen emittierten Lichtes

Wie man erkennen kann, entsprechen die Lampen den Voraussetzungen, weil sie hauptsächlich das Licht im geforderten Spektrenbereich emittieren, auch wenn sie ebenfalls kleine Anteile an Licht außerhalb des UVA- bzw. UVB-Bereichs emittieren. Allerdings stört dies nicht, da diese Emissionen ebenfalls alle im ursprünglich geforderten Bereich liegen. Man kann auch sehr gut die typischen Hauptlinien einer Quecksilberdampflampe erkennen, wie z.B. die H-Linie bei 404,66 nm und z.B. die I-Linie bei 365,16 nm. Die Lampen sind dadurch gut geeignet, Unterschiede im Verhalten von Arzneistoffen gegenüber der jeweiligen Strahlung aufzudecken.

5.1.2 Bestimmung der Strahlungsintensität

Um die Strahlungsintensität eines Systems zu bestimmen, kann man ein Aktinometer benutzen. Ein Aktinometer ist eine Substanz mit bekannter Quantenausbeute, durch die sich die Anzahl der Photonen ermitteln lässt, die auf ein definiertes Volumen in einem definierten Zeitintervall auftreffen. Wird der gleiche Prozess unter gleichen Bedingungen an einem anderen System angewendet, kann man die Strahlungsintensität des anderen Systems bestimmen. Die Quantenausbeute (φ) gibt das Verhältnis zwischen der Anzahl umgesetzter Moleküle (n_A) und der Anzahl absorbierter Lichtquanten definierter Energie (n_q) an.

$$\varphi = \frac{n_A}{n_q}$$

5-1

Die Anzahl der Lichtquanten (n_q), die pro Zeiteinheit (Δt) von der Probe absorbiert werden, wird als Photonenfluss φ_P definiert.

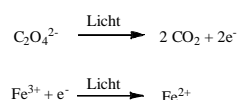
$$\varphi_P = \frac{n_q}{\Delta t}$$

5-2

Dieser Photonenfluss hängt unter Anderem von der Art der Strahlungsquelle, der ausgestrahlten Wellenlänge bzw. dem ausgestrahlten Spektrum und von der Geometrie der Messapparatur ab. Somit ist die Bestimmung der Quantenausbeute geeignet, die Strahlungsquellen zu definieren und es ist möglich, Aussagen zur Strahlungsintensität zu machen.

Da die Quantenausbeute im Durchfluss und im UV-Bereich bestimmt werden sollte, wurde die Ferrioxalat-Aktinometrie angewandt. Diese verfügt über verschiedene Spezifikationen, die von Vorteil sind. Zum Beispiel liegt der Absorptionsbereich im Wellenlängenbereich von 250-480 nm (Bowman and Demas 1976; Murov, Hug et al. 1993) und außerdem zeichnet sich die Ferrioxalat-Aktinometrie durch eine hohe Empfindlichkeit aus (Hatchard and Parker 1956). Weitere Vorteile der Ferrioxalat-Aktinometrie sind z.B. eine konstante Quantenausbeute im Temperaturbereich von 5-80°C (Nicodem and Aquilera 1983) und die Unabhängigkeit vom Sauerstoffgehalt (Hatchard and Parker 1956).

Es wurde Eisen(III)oxalat als Aktinometer verwendet. Dabei geht Eisen(III)oxalat unter Bestrahlung eine Redoxreaktion ein, wobei Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert wird und das Oxalat zu CO_2 oxidiert wird.



5-3

Die Eisen(III)oxalat-Lösung wurde in das Durchflusssystem injiziert und nach Bestrahlung anschließend in einem Maßkolben aufgefangen. Danach wurde die Fe^{2+} -Konzentration mit Hilfe von o-Phenanthrolin, welches einen farbigen Komplex mit Fe^{2+} bildet, bei 511 nm photometrisch bestimmt. Aufgrund der photochemischen Instabilität von o-Phenanthrolin und einer empfohlenen Wartezeit von 30 min (Bowman and Demas 1976) ist eine Online-Auswertung nicht zweckmäßig.

Obwohl die Quantenausbeute von der Wellenlänge abhängt und beide Strahler polychromatische Strahlung liefern, kann man von einer annähernd konstanten Quantenausbeute von 1,2 im genutzten Wellenlängenbereich ausgehen (Moore 1996). Dies bedeutet, dass für jedes absorbierte Photon 1,2 Fe^{2+} entstehen. Idealerweise könnte die Quantenausbeute sogar bei zwei liegen, da aus der photochemischen Reaktion zwei Fe^{2+} -Ionen hervorgehen (siehe 5-3).

Mit Hilfe von unterschiedlichen Bestrahlungszeiten (Δt) wurde der Abbau von Fe^{3+} zu Fe^{2+} beobachtet, wobei man die Stoffmenge an Fe^{2+} mit Hilfe des o-Phenanthrolin-Komplexes wie folgt berechnen kann:

$$n_{\text{Fe}^{2+}} = \frac{A \cdot V}{\epsilon \cdot d}$$

$n_{\text{Fe}^{2+}}$: Stoffmenge Fe^{2+}

A : Absorption des o-Phenanthrolin-
 Fe^{2+} -Komplexes

ϵ : Absorptionskoeffizient (11200
 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

V : Volumen des Maßkolbens

d : Schichtdicke

5-4

Zur Absicherung wurde der Absorptionskoeffizient mittels Kalibrierung bestimmt.

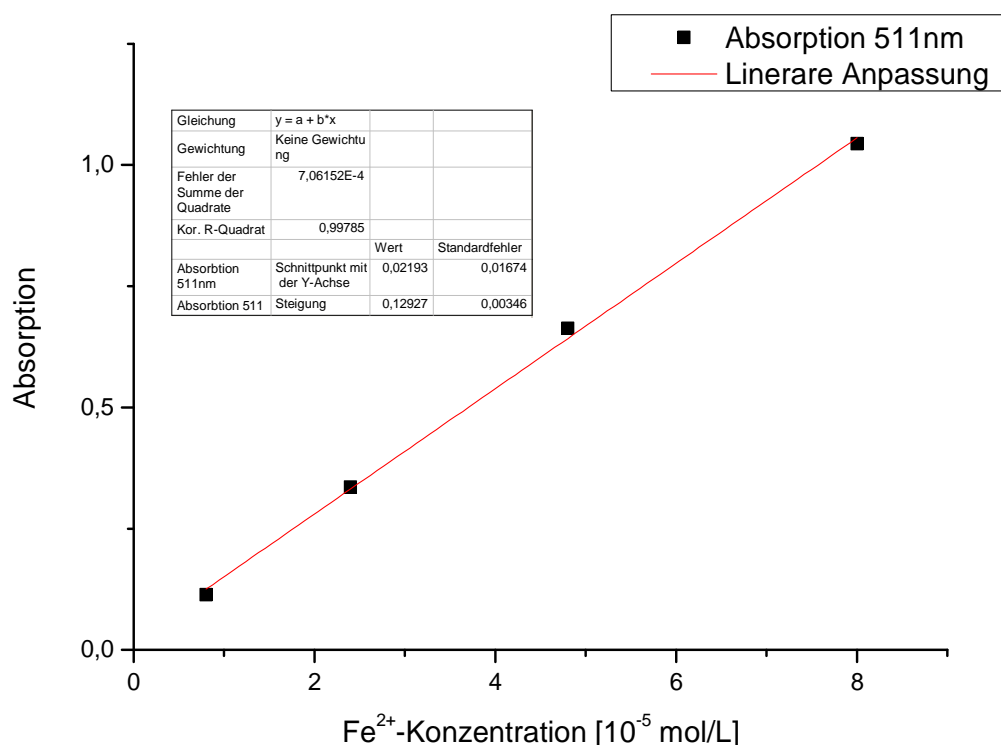


Abbildung 14 : Kalibriergerade zur Absorption von Fe^{2+} mit 0,12% Phenantrolin-Lösung

Im Bereich der Totalabsorption (s.o.) werden alle Photonen, die auf die Probe treffen, auch absorbiert. Wenn dies der Fall ist, kommt es zu einer linear verlaufenden Photodegradation von Fe^{3+} und einer Reaktionskinetik 0. Ordnung. Jedoch sind diese Bedingungen im Durchflusssystem nicht gewährleistet, da es zu Konzentrationsgradienten innerhalb der Kapillare auf Grund von Diffusionsvorgängen kommt. Deshalb kommt es zu unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten innerhalb der eingebrachten Probe. Die Schichtdicke der gehäkelten Kapillare kann nicht genau definiert werden, da es durch das Verhäkeln zu Überlappungen kommt. Außerdem ergeben sich verschiedene Winkel in Bezug zur Strahlungsquelle. Der Innendurchmesser der Kapillare kann aber näherungsweise auf 0,250 mm angenommen werden, dies wurde in der Arbeit von Frau Parlar bestimmt (Parlar 2000).

Die photochemische Degradation von Fe^{3+} wurde bei unterschiedlichen Bestrahlungszeiten (Δt) im System beobachtet, wobei die Fe^{3+} -Abnahme direkt mit der Fe^{2+} -Zunahme korreliert. Die Fe^{2+} -Zunahme ist in Abbildung 15 dargestellt.

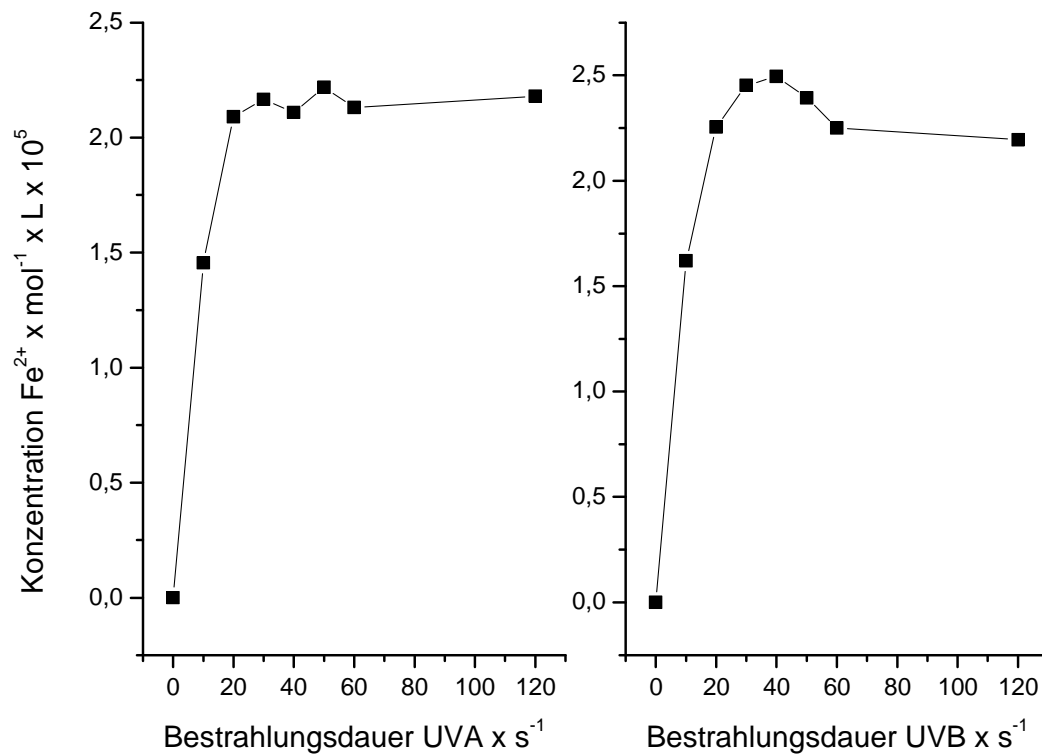


Abbildung 15 Bildung von Fe²⁺ nach Bestrahlung der Aktinometerlösung im Durchfluss in einer PTFE-Kapillare mit UVA/UVB

Wie man der Abbildung 15 entnehmen kann, liegt eine Mischkinetik vor, nach einem rasanten Anstieg der Fe²⁺-Konzentration kommt es zu einer Stagnation. Dies hat verschiedene Gründe, wie schon vorher diskutiert. Im Allgemeinen gilt die Formel 5-5 (Becker 1991), mit derer Hilfe man die Strahlungsintensität bestimmen kann.

$$-\frac{dc_A}{dt} = \varphi_A \cdot I_0 (1 - e^{-\chi \cdot c_A \cdot d}) = \varphi_A \cdot I_0 (1 - 10^{-A_\lambda}) = \varphi_A \cdot I_0 (1 - e^{-A'_\lambda})$$

χ : natürlicher molarer Absorptionskoeffizient ($\chi = 2,3 \varepsilon$) [$\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$]

ε : molarer Absorptionskoeffizient [$\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$]

I_0 : Strahlungsintensität [$\text{Es} \cdot \text{s}^{-1}$]

d : Schichtdicke [cm]

A_λ : Absorption, $A'_\lambda = 2,3 A_\lambda$

Wobei normalerweise als Grundvoraussetzung gilt, dass die Strahlung senkrecht auf eine planare Oberfläche auftrifft, damit es nicht zu einer Abschwächung der Strahlungsstärke durch Reflexion oder Streuung an der Oberfläche kommt. Eine planare Oberfläche ist bei einer Kapillare nicht gegeben, jedoch soll hier nicht die Strahlungsintensität an der Kapillarenoberfläche bestimmt werden, sondern die Strahlungsintensität innerhalb der Kapillare. Auf Grund dessen kann die Strahlungsabschwächung durch Streuung und Reflexion vernachlässigt werden. Die Strahlungsintensität bei den unterschiedlichen Bestrahlungszeiten (Δt) wurden mit Hilfe der Gleichung 5-6 berechnet.

$$I_{abs} = \frac{n_{Fe^{2+}}}{\varphi \cdot \Delta t} = \frac{A_{\lambda} \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot \varphi \cdot \Delta t}$$

I_{abs} : absorbierte Strahlungsintensität [Es/s]

$n_{Fe^{2+}}$: Stoffmenge Fe^{2+} (Ljunggren and Möller)

φ : Quantenausbeute

Δt : Bestrahlungszeit [s]

A_{λ} : Absorption des Phenanthrolinkomplexes bei 510 nm

ε : Absorptionskoeffizient [$L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$]

V: Volumen des Maßkolbens [L]

d: Schichtdicke [cm]

5-6

Wie man der Tabelle 3 entnehmen kann, nimmt die ermittelte Strahlungsintensität mit zunehmender Bestrahlungsdauer sogar ab. Dies liegt vor allem daran, dass die Störgrößen mit längerer Bestrahlungsdauer zunehmen. Auf der einen Seite verändert sich der Konzentrationsgradient innerhalb der Probe auf Grund der voranschreitenden Dispersion mit Zunahme der Zeit. Auf der anderen Seite ist davon auszugehen, dass nicht mehr alle Photonen absorbiert werden, da gerade in den Grenzschichten Eisen(III) zu Eisen(II) umgesetzt wird und die Konzentration von Eisen(III) damit wahrscheinlich über die Zeit in den Grenzschichten gegen Null geht. Dies würde vor allem erklären, weshalb es nach 30 Sekunden Bestrahlung nicht mehr zu einer Zunahme von Eisen(II) kommt. Dennoch kann man die erhaltenen Strahlungsintensitäten als Vergleich heranziehen, um eine Größenvorstellung zu bekommen. Beide Niederdruckstrahler geben näherungsweise die gleiche Strahlungsintensität ab, was zu erwarten war, da beide über eine Leistung von 8 Watt verfügen.

Strahlungsquelle:	UVA				UVB					
	Bestrahlungsdauer [s]	Mittelwert der Absorption	sdv (A)	Fe ²⁺ - Konzentration [10 ⁻⁵ Mol/L]	Strahlungsintensität [Es/s]	Bestrahlungsdauer [s]	Mittelwert der Absorption	sdv (A)	Fe ²⁺ - Konzentration [10 ⁻⁵ Mol/L]	Strahlungsintensität [Es/s]
0	0	-	0	-	0	0	-	0	-	
10	0,2314	0,01527	1,62041	3,125E-09	10	0,21844	0,13844	1,45486	3,4435E-09	
20	0,3134	0,06336	2,25474	2,1745E-09	20	0,29225	0,01823	2,09113	2,3318E-09	
30	0,339	0,04459	2,45277	1,498E-09	30	0,302	0,01808	2,16655	1,6815E-09	
40	0,3444	0,05845	2,49455	1,0962E-09	40	0,29467	0,02093	2,10985	1,2813E-09	
50	0,3312	0,04489	2,39243	9,1866E-10	50	0,30867	0,020312	2,21815	9,8571E-10	
60	0,3128	0,02912	2,250110	7,3743E-10	60	0,29733	0,01747	2,13042	7,7579E-10	
120	0,3056	0,05363	2,194410	3,7657E-10	120	0,30367	0,03202	2,17947	3,7897E-10	

Tabelle 3: Übersicht über die Änderung der einzelnen Parameter in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer

Um die erhaltenen Strahlungsintensitäten richtig einzuordnen, bietet es sich an, sie mit der Intensität des Tageslichtes zu vergleichen. Damit die Intensitäten verglichen werden können, muss zunächst eine Umrechnung stattfinden. Die in der Literatur zu findenden Intensitäten

des Sonnenlichtes beziehen sich immer auf eine Fläche. Typisch sind $W \cdot m^{-2}$ z.B. für die Strahlungsleistung oder $Es \cdot m^{-2} \cdot s^{-2}$ für den Photonenflux.

Die oben ermittelten Werte für die Intensität jedoch beziehen sich auf ein Volumen, nämlich die injizierten 20 μ l an Eisen(III)oxalat-Lösung.

Wenn man als bestrahlte Fläche in der Kapillare das Produkt aus Durchmesser und Länge annimmt, so kann man näherungsweise davon ausgehen, dass 20 μ l bei einem Innendurchmesser von 0,254 mm und einer Länge von 39,4 cm Kapillare einen cm^2 bestrahlter Fläche entsprechen (Parlar 2000).

Als Referenz wurde ein Standard-Sonnenspektrum herangezogen (Körperpflege 1995), welches von der Cosmetic, Toiletry and Parfumery Association (COLPIA) verwendet wurde. Das Spektrum inklusive Umrechnung ist im Anhang zu finden.

Dieses Spektrum soll die Sonneneinstrahlung eines wolkenlosen Himmels mit einer Höhe dicht über dem Meeresspiegel und hohem Sonnenstand simulieren. Natürlicherweise unterliegt die Strahlungsintensität der Sonne innerhalb unserer Atmosphäre Schwankungen, welche von Wetter, Sonnenstand und Höhenmetern abhängen (Moon 1940). Die Solarkonstante, d.h. die mittlere Leistung pro Fläche beträgt $E_0 = 1,367 \text{ kW} \cdot m^{-2}$ (Thekaekara and Drummond 1971)

Da die eingesetzten Niederdruckstrahler, wie in 5.1.1 gezeigt, polychromatisches Licht emittieren, muss die ermittelte Strahlungsintensität prozentual auf den Wellenlängenbereich des emittierten Lichtes in Abhängigkeit von der prozentualen spektralen Emission aufgeteilt werden.

Als Strahlungsintensität wurde jeweils die maximal ermittelte Strahlungsintensität verwendet. Die einzelnen Wellenlängen wurden nicht gewichtet, da nach Moore im angewendeten Bereich die Quantenausbeute konstant bei 1,2 bleibt (Moore 1996). Demnach kann vernachlässigt werden, dass Photonen mit kürzerer Wellenlänge eine höhere Energie besitzen.

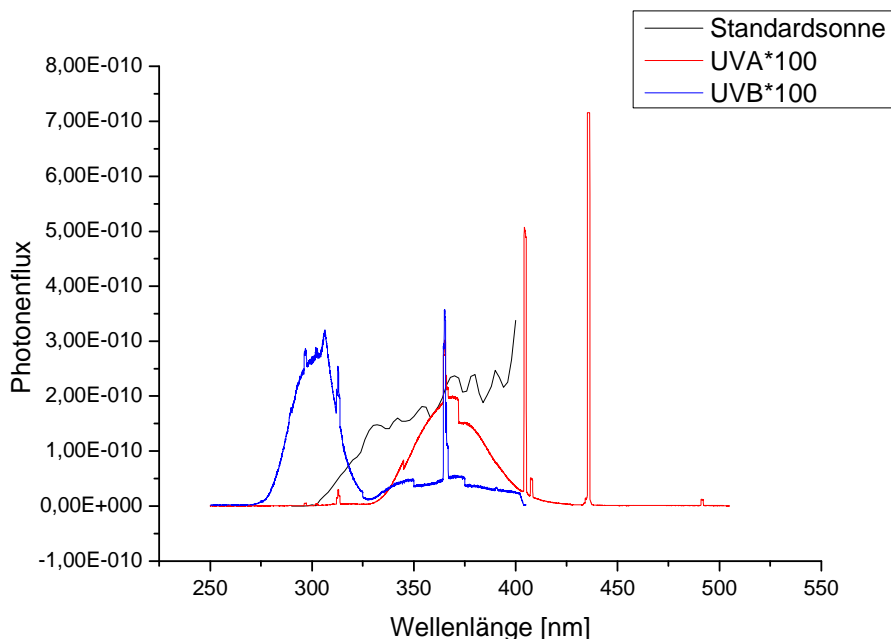


Abbildung 16 Photonflux der Standardsonne in Abhängigkeit der Wellenlänge im Vergleich zu dem ermittelten Photonflux der eingesetzten UVA- und UVB-Quelle * 100

In Abbildung 16 ist der Photonflux für das Referenzspektrum der Sonne und der Photonflux der jeweiligen untersuchten Strahlungsquelle dargestellt. Auffällig ist dabei, dass die gefundenen Strahlungsintensitäten deutlich niedriger sind als die der Standardsonne. Auch wenn die dargestellten Strahlungsintensität die erreichten Quantenausbeuten in der Reaktionskapillare widerspiegeln sollen, ist es doch unwahrscheinlich, dass sie exakt sind, da wie schon ausgeführt, mehrere Näherungen für diese Messungen gemacht wurden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass der Photonflux der Strahlungsquellen höher ist, als hier gefunden. Dennoch kann man anhand der gefundenen Ergebnisse mehrere Aussagen machen. Auf der einen Seite unterscheiden sich die beiden Strahlungsquellen kaum in ihrer Strahlungsintensität, sondern primär nur in ihrem ausgestrahlten Spektrum. Auf Grund dessen kann man davon ausgehen, dass gefundene Unterschiede der Arzneistoffe auf die Strahlungsquellen primär wellenlängenabhängig sind. Dieses war ein gestelltes Grundkriterium. Auf der anderen Seite kann man anhand dieser Grafik gut erkennen, dass das ausgestrahlte Spektrum des UVA-Strahlers komplett im Spektrum der Standardsonne liegt, während Teile des UVB-Strahler-Spektrums außerhalb des Spektrums der Standardsonne liegen. Dabei muss bedacht werden, dass dies ein idealisiertes Spektrum des Sonnenlichtes auf der Erde ist, und UVB-Licht auf der Erde in deutlich geringeren Mengen vorkommt als UVA-Licht. Daher ist auch der UVB-Strahler für die Untersuchungen geeignet.

5.2 Untersuchung der Photostabilität

5.2.1 Einführung

Das Untersuchen der Photostabilität von Arzneistoffen kann Aufschluss darüber geben, ob ein Arzneistoff potentielle photosensibilisierende Eigenschaften besitzt. Denn lichtinduzierte Veränderungen am Arzneistoff können zur Entstehung von toxischen Substanzen führen. Zusätzlich erhält man Informationen hinsichtlich der photochemischen Stabilität, die im Interesse der Stabilitätsprüfung für Arzneistoffe/-mittel sind. Allerdings muss beachtet werden, dass die Reaktivität in Lösung deutlich höher ist als im festen Zustand der Bulk-Ware.

Um eine mögliche photochemische Reaktion zu beobachten, wurden verschiedene Arzneistoffe in wässriger Lösung online mit UVA- oder UVB-Strahlung bestrahlt und anschließend chromatographiert, dabei kamen die in Kapitel 4.6 beschriebenen Analysesysteme zum Einsatz. Durch die Variation des Einstrahlspektrums durch die beiden Strahlungsquellen ist es möglich, Aussagen über die Wellenlängenabhängigkeit der photochemischen Reaktionen zu machen.

Grundsätzlich wurde im Wässrigen bestrahlt bei einem pH-Wert von 7,2, um Bedingungen in einer Zelle wiederzuspiegeln. Bei der Bestrahlung wurde in einem Photoreaktor in einem Temperaturbereich von ca. 30-32°C gearbeitet, diese Temperatur wurde durch die Abwärme der Lichtquellen und eine gleichzeitige Kühlung mit Hilfe eines Ventilators erreicht. Die Erhaltung der Temperatur wurde mit Hilfe eines Temperatursensors an der Außenseite der durchflossenen Kapillare kontrolliert. Dieser Temperaturbereich wurde ausgewählt, weil er die durchschnittliche Hauttemperatur widerspiegelt (Abe, Mayuzumi et al. 1980). Durch Variation in der Bestrahlungszeit ist es möglich, Aussagen über eine mögliche Zerfallskinetik zu machen und Reaktivitäten einzuschätzen.

5.2.2 Untersuchung von Ketoprofen hinsichtlich seiner Photostabilität

Ketoprofen (2-(3-benzoylphenyl)propionsäure) gehört zu der Arzneistoffgruppe der NSAIDs und wird vor allem in der Dermatologie verwandt. Gerade diese dermale Anwendung ist kritisch zu beurteilen, denn es könnte zu phototoxischen Reaktionen in den behandelten Hautarealen kommen, wenn diese UVA-Strahlung ausgesetzt sind (Radschuweit, Rüttinger et al. 2001).

Ketoprofen ist ein Arylpropionsäure Derivat und findet vor allem bei rheumatischen Erkrankungen Anwendung (Loet 1989). Wie schon in Kapitel 4.3.2.2 beschrieben, gibt es viele Un-

tersuchungen zum photochemischen Verhalten, zum photochemischen Potential und postulierte Reaktionswege von Ketoprofen. Deswegen ist es sehr gut geeignet, das entwickelte System zu testen.

5.2.2.1 Chromatographischen Bedingungen zur Untersuchung der photochemischen Stabilität von Ketoprofen

Um die zu erwartende Photodegradation von Ketoprofen zu untersuchen, wurde eine wässrige Ketoprofen-Lösung mit Hilfe des Zwei-Säulen-HPLC-Systems untersucht. Nach der Injektion in das System wird die Probe online im Photoreaktor jeweils viermal für 0, 60, 90, 120 und 180 Sekunden mit UVA-Licht, bzw. 0, 5, 10, 15 und 30 Sekunden mit UVB-Licht bestrahlt. Über Pumpe 1 wird mit 1 ml/min wässriger Phosphatpuffer gefördert, so dass die Probe über vier Minuten auf Säule 1 (Aqua 5 μ C18 30x4,8mm) angereichert wird und anschließend nach Ventilumschaltung mittels Backflush über Säule 2 (Onyx monolythic C18 50 x 4,6 mm) aufgetrennt wird. Über die Pumpe 2 wurde ein Gradient mit 1,5ml/min gefahren (siehe Tabelle 4). Die Peaks wurden bei 233nm ausgewertet.

	Zeit [min]	0	4	5	10	30
Pumpe 1	Puffer %	100	100	100	100	100
Pumpe 2	Puffer %	90	90	75	45	45
	Acetonitril	10	10	25	55	55

Tabelle 4: Gradientenprofil und Schaltplan für die Untersuchung von Ketoprofen

5.2.2.2 Ergebnisse zur Photostabilitätsuntersuchungen von Ketoprofen

Wie zu erwarten war, zeigt Ketoprofen sowohl unter UVA als auch unter UVB Bestrahlung Photodegradation. In Abbildung 17 und Abbildung 18 ist der Abbau von Ketoprofen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer dargestellt. Mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA) konnte ein signifikanter Abbau von Ketoprofen nachgewiesen werden.

Der Zerfall von Ketoprofen verläuft bei beiden Strahlungsquellen rasant, über 50% des Arzneistoffes sind unter UVA-Bestrahlung bereits nach 90 Sekunden Bestrahlung zersetzt. Der Abbau scheint linear zu verlaufen. Unter UVB-Bestrahlung ist die Photodegradations-Geschwindigkeit sogar noch höher, hier sind bereits nach 10 Sekunden über 50% des ursprünglich injizierten Arzneistoffes verschwunden. Der Abbau verläuft hier im Gegensatz zu

dem erhaltenen Kurvenverlauf des Abbaus unter UVA-Bestrahlung nicht linear. Die unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeit ist vor allem damit zu erklären, dass Ketoprofen im UVB-Bereich einen höheren Absorptionskoeffizienten besitzt, dies kann man dem UV-Vis-Spektrum von Ketoprofen entnehmen (Abbildung 20).

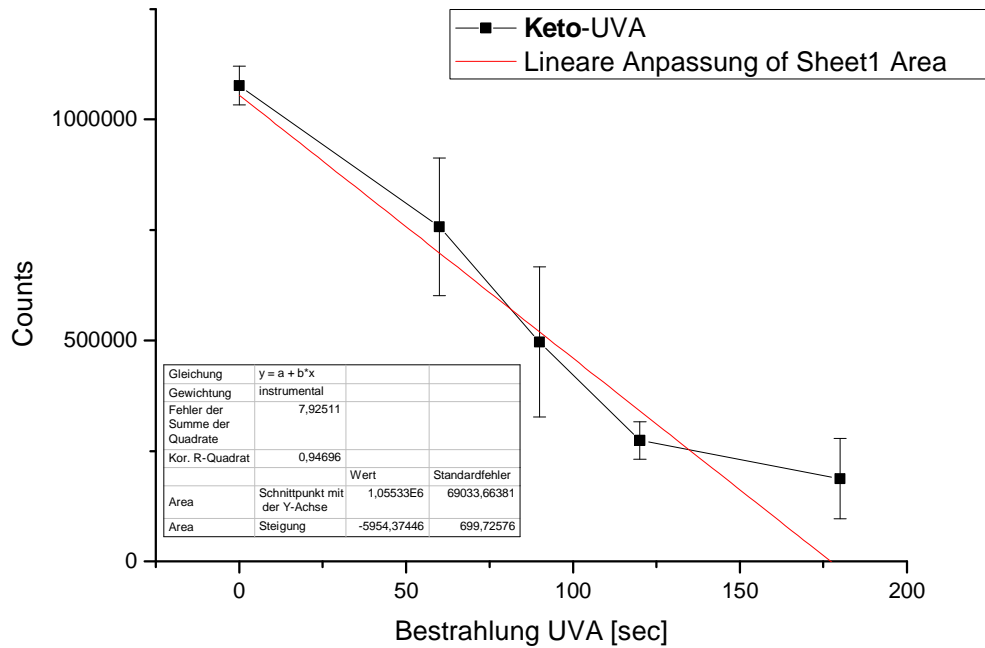


Abbildung 17: Abbau von Ketoprofen unter UVA-Bestrahlung

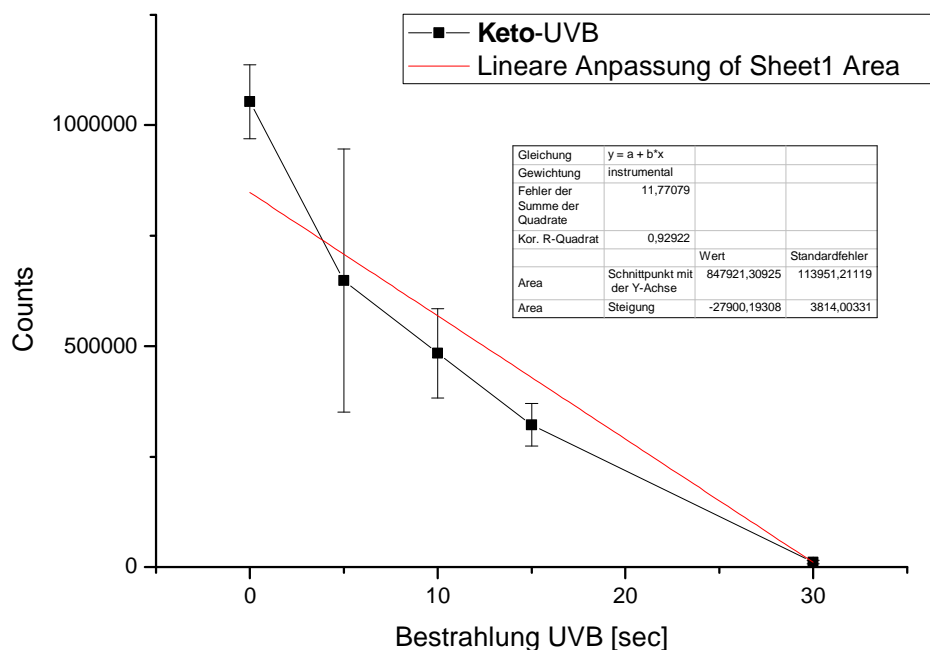


Abbildung 18: Abbau von Ketoprofen unter UVB-Bestrahlung

In Abbildung 19 sind beispielhaft die erhaltenen Chromatogramme für unbestrahlte, 60 Sekunden und 150 Sekunden UVA bestrahlte Ketoprofen-Lösung abgebildet. Nach 60 Sekunden Bestrahlung sind zwei Photoprodukte (2 und 3) im Chromatogramm neu zu erkennen, über das DAD-Spektrum findet sich sogar ein dritter Peak (1). Bei längerer Bestrahlung (150 sec) hat sich die Konzentration an dem Abbauprodukt 2 und 3 deutlich erhöht und auch der Peak 1 stellt sich deutlich heraus. Der Peak 1 entsteht erst nach längerer Bestrahlung, deswegen ist anzunehmen, dass es sich hierbei um ein Reaktionsprodukt handelt, welches sich aus einem der anderen Abbauprodukte bildet.

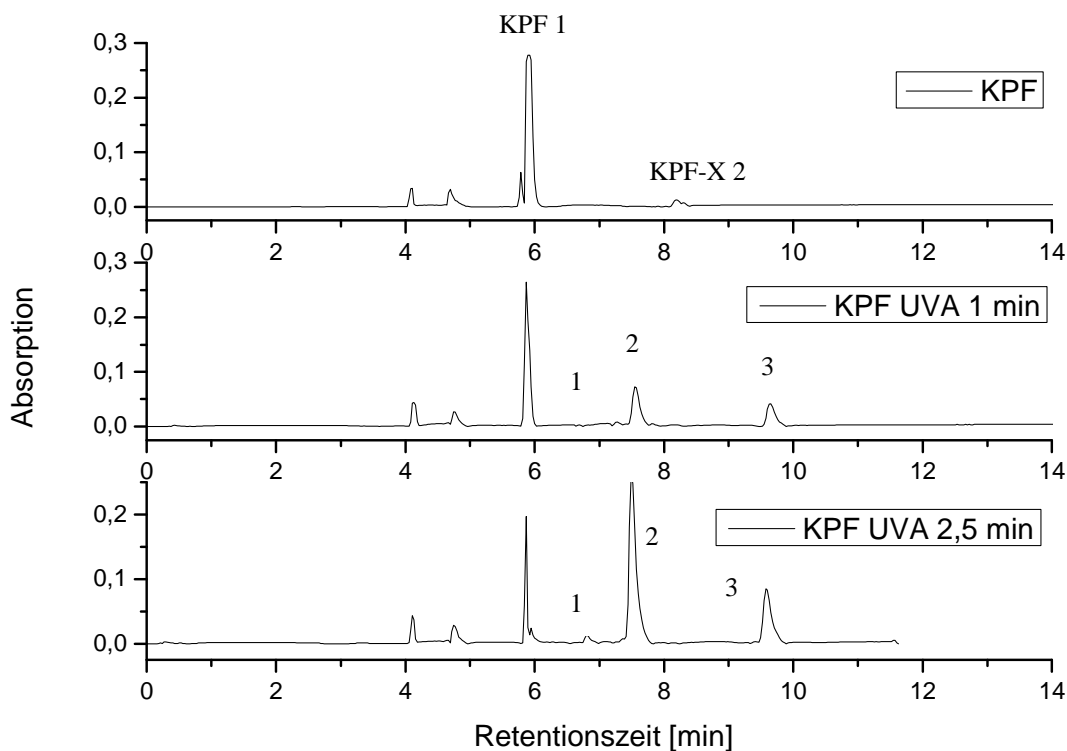


Abbildung 19: Chromatogramme von Ketoprofen ohne und mit Bestrahlung

Da auch in der unbestrahlten Probe ein Peak bei 8,2 min (KPF-X 2) zu erkennen war, wurden zusätzlich die DAD-Spektren der einzelnen Peaks ausgewertet, um zu zeigen, dass es sich bei den neu gebildeten Peaks tatsächlich um Photoprodukte handelt. Wie man in Abbildung 20 erkennen kann, besitzen die neugebildeten Peaks verschiedene Spektren. Dies bestätigt, dass es neu gebildete Photoprodukte sind. Die Spektren lassen darauf schließen, dass bei den gebildeten Photoprodukten weiterhin die Ringstruktur intakt bleibt. Dies steht im Einklang mit den in der Literatur zu findenden postulierten lichtinduzierten Abbaureaktionen (Vergleiche 4.3.2.2). Das im Vergleich zu den Reaktionschemata weniger Produkte gefunden wurden, ist nicht verwunderlich, da einige Zwischenprodukte direkt weiter reagieren und nicht so lange stabil sind, bis sie über die Säule eluiert und am Detektor angekommen sind. Auf Grund dessen wurde nach Möglichkeiten gesucht, eine noch zeitnähere Untersuchung zu ermöglichen. Ansätze dazu sind im Kapitel 5.3 beschrieben.

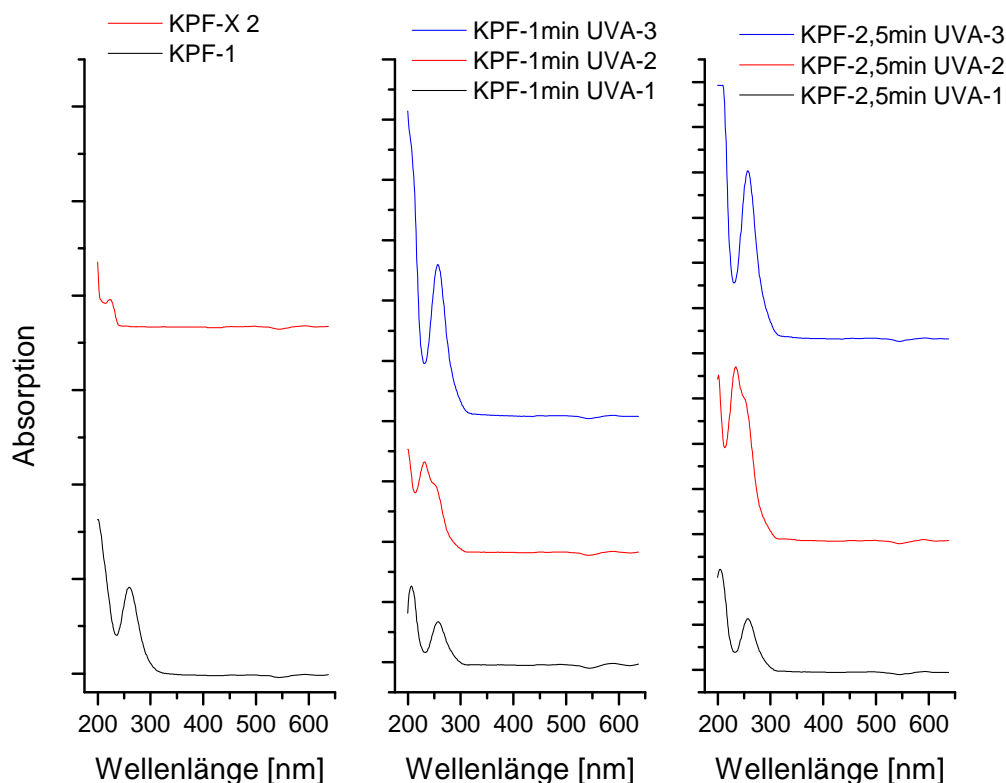


Abbildung 20: DAD-Spektren der markierten Peaks in Abbildung 19

5.2.3 Untersuchung von Naproxen hinsichtlich seiner Photostabilität

Naproxen ist ein weiteres NSAID, welches strukturverwandt mit Ketoprofen ist. Beide Arzneistoffe gehören zu den NSAIDs der Phenylpropionsäure-Derivate und besitzen daher eine gewisse Strukturverwandtschaft, sie unterscheiden sich aber dennoch im Ganzen in ihrer Struktur. Wie auch bei Ketoprofen sind für Naproxen photolytische Abbau-Reaktionen in der Literatur beschrieben (vergleiche 4.3.4), außerdem konnten photosensitive Reaktionen bei mehreren Patienten beobachtet werden (Levy, Barron et al. 1990; Matzke, Mann et al. 2007; Gutierrez-Gonzalez, Rodriguez-Pazos et al. 2011).

5.2.3.1 Chromatographische Bedingungen zur Untersuchung der photochemischen Stabilität von Naproxen

Eine wässrige Naproxen-Lösung wurde in das „Zwei-Säulen-System“ injiziert und jeweils dreimal für 0, 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten mit UVA- bzw. UVB-Strahlung gestresst. Während der Bestrahlung wurde der Fluss der Pumpe 1 auf Grund der langen Bestrahlungsdauer gestoppt und anschließend wieder gestartet. Über Pumpe 1 wurde mit 1 ml/min ein wässriger

Phosphatpuffer gefördert. Die Probe wurde nach dem Bestrahlen für 5 Minuten auf Säule 1 (Aqua 5 μ C18 30x4,8mm) angereichert und anschließend mittels Backflush über Säule 2 (Onyx monolythic C18 50 x 4,6 mm) mit Hilfe eines ACN/Puffer-Gemisches aufgetrennt. Die Analyten wurden mit einem DAD detektiert und bei 230nm ausgewertet.

	Zeit [min]	0	5	20
Pumpe 1 (1 ml/min)	Puffer %	100	100	100
Pumpe 2 (1 ml/min)	Puffer %	55	55	45
	Acetonitril	45	45	55

Tabelle 5: Gradientenprofil und Schaltplan für die Untersuchung von Naproxen

5.2.3.2 Ergebnisse zur Photostabilitätsuntersuchung von Naproxen

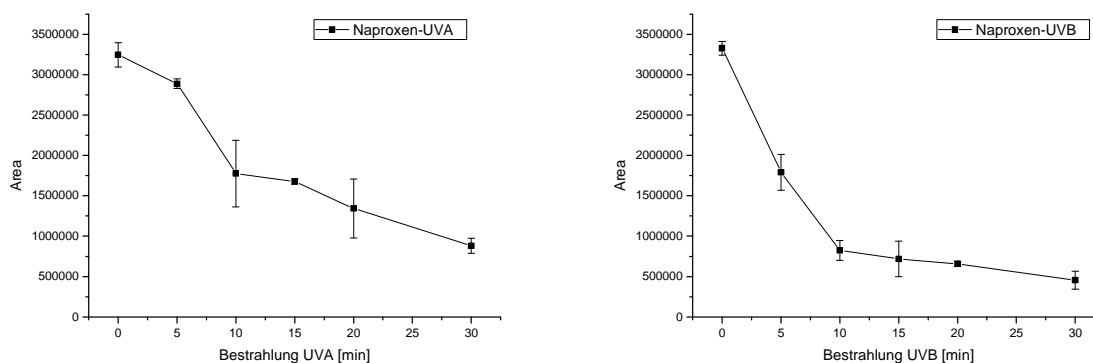


Abbildung 21: Photolytischer Abbau von Naproxen unter UVA- und UVB-Bestrahlung

Wie auch Ketoprofen zeigt Naproxen sowohl unter UVA- als auch unter UVB-Bestrahlung eine photolytische Spaltung. In Abbildung 21 ist der prinzipielle Verlauf des Abbaus von Naproxen zu verfolgen. Mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA) konnte ein signifikanter Abbau von Naproxen gezeigt werden. Die Abbauprofile von UVA und UVB unterscheiden sich dabei sowohl in ihrem Verlauf, als auch in ihrer Steilheit und damit der Abbaugeschwindigkeit. Nach fünf-minütiger Bestrahlung von Naproxen mit UVB sind nur noch ca. 54% der ursprünglichen Menge vorhanden, während nach der gleichen Zeit unter UVA-Bestrahlung noch 88% Naproxen vorhanden sind. Dies liegt wieder an der unterschiedlichen Absorptionsrate und zeigt, dass auch hier UVB zu einem viel schnelleren Zerfall führt als UVA, wenn es denn direkt mit dem Arzneistoff in Kontakt kommt. Eine längere Bestrahlung mit UVB als zehn

Minuten führt nicht mehr zu einer viel stärkeren Zersetzung, dies kann daran liegen, dass die Probe innerhalb der Kapillare nicht komplett von der Strahlung durchdrungen werden kann und das Naproxen im Mittelpunkt des Kapillarendurchmessers unbeeinflusst bleibt.

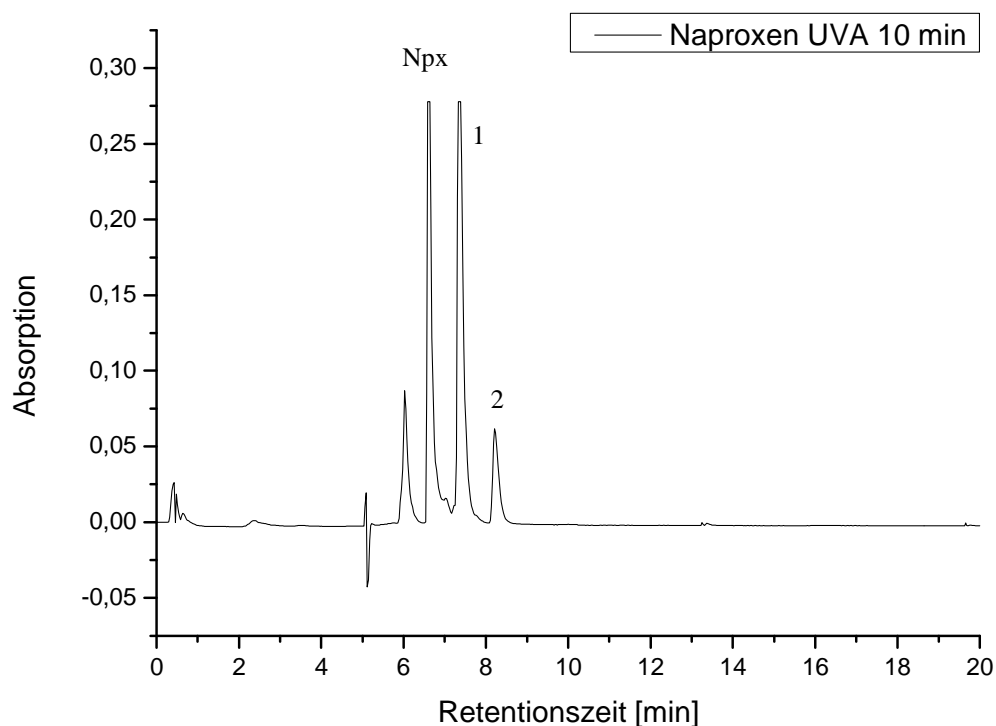


Abbildung 22: Chromatogramm von Naproxen nach 10 Minuten UVA-Bestrahlung

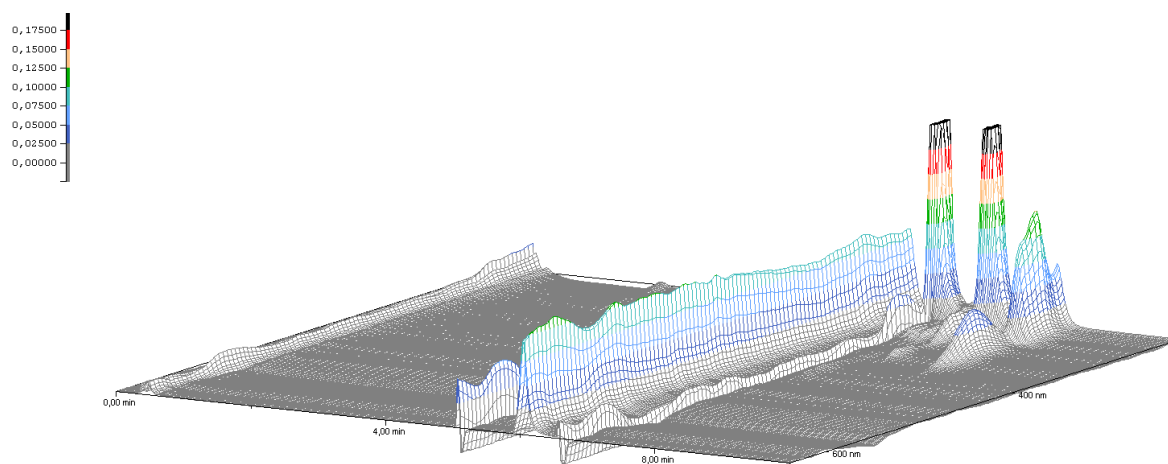


Abbildung 23: DAD-Plot von Naproxen nach 10 minütiger UVA-Bestrahlung

Anhand der aufgenommenen Chromatogramme kann man die Bildung verschiedener Photoprodukte sehen und verfolgen. So konnten zwei verschiedene Photoprodukte nachgewiesen werden, die sich im Verlauf der Bestrahlung bildeten. Mit Hilfe des aufgenommenen DAD-

Spektrums konnte auch gezeigt werden, dass sich diese sowohl von einander als auch von Naproxen unterscheiden. Diese Produkte scheinen relativ photostabil zu sein, da sie sich auch nach 30 Minuten Bestrahlung immer noch anreichern, obwohl sie weiterhin Licht im UVA- und UVB-Bereich absorbieren können.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Naproxen wie zu erwarten eine Photodegradation zeigt, die abhängig vom eingestrahlten Wellenlängenbereich schneller oder langsamer verläuft. Im Vergleich mit Ketoprofen verläuft jedoch der Abbau deutlich langsamer. Dies führt zu dem Schluss, dass Ketoprofen im Vergleich zu Naproxen deutlich photoreaktiver ist.

5.2.4 Untersuchung von Amiodaron hinsichtlich seiner Photostabilität

Amiodaron gehört zu der Klasse der Antiarrhythmika und gehört dort zu den effektivsten Arzneistoffen dieser Klasse. Ursprünglich wurde es in den 1960igern als ein Medikament gegen Angina Pectoris entwickelt (Rosenbaum, Chiale et al. 1976). Neben seiner guten erwünschten Wirkung verursacht Amiodaron aber auch eine Reihe von unerwünschten Wirkungen, darunter auch photosensibilisierende Reaktionen. So geht man davon aus, dass 25-75% der behandelten Patienten photosensitive Reaktionen zeigen (Vassallo and Trohman 2007).

5.2.4.1 Chromatographische Bedingungen zur Untersuchung der photochemischen Stabilität von Amiodaron

Eine wässrige Amiodaron-Lösung wurde in das „Ein-Säulen-System“ injiziert und jeweils viermal über 0; 3; 5; 7,5 und 10 Minuten mit UVA- bzw. UVB-Strahlung belichtet. Während der Bestrahlung im Photoreaktor wurde der Fluss der Pumpe 1 auf Grund der langen Bestrahlungsdauer gestoppt und anschließend chromatographisch mit Hilfe eines wässrigen Phosphatpuffer/Methanol/Acetonitril Gradienten aufgetrennt und mit Hilfe eines DADs detektiert.

	Zeit [min]	0	3	6	10	20
Pumpe 1 (1 ml/min)	Puffer %	100	100	40	0	0
	Methanol %	0	0	30	50	50
	Acetonitril %	0	0	30	50	50

Tabelle 6: Gradientenprofil und Schaltplan für die Untersuchung von Amiodaron

5.2.4.2 Ergebnisse zur Photostabilitätsuntersuchungen von Amiodaron

Amiodaron zeigt sowohl unter UVA- als auch unter UVB-Bestrahlung Photodegradation. Der Abbau verläuft dabei nicht linear und geschieht relativ schnell. So sind nach drei Minuten Bestrahlung nur noch 67% (UVA) bzw. 41% (UVB) an Amiodaron von der ursprünglich injizierten Menge wiederzufinden.

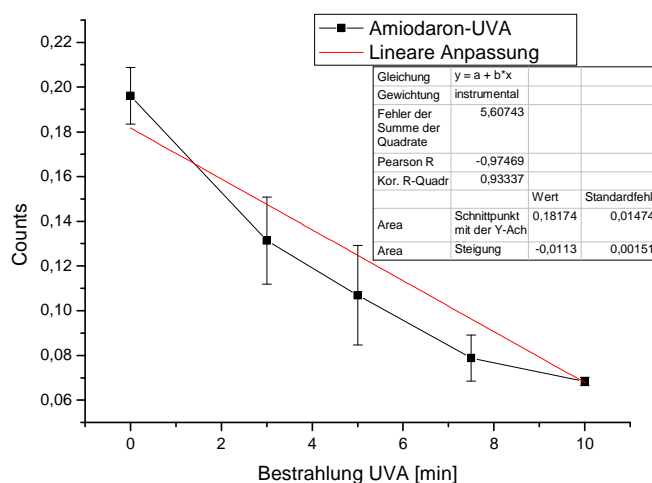


Abbildung 24: Abbau von Amiodaron unter UVA-Bestrahlung

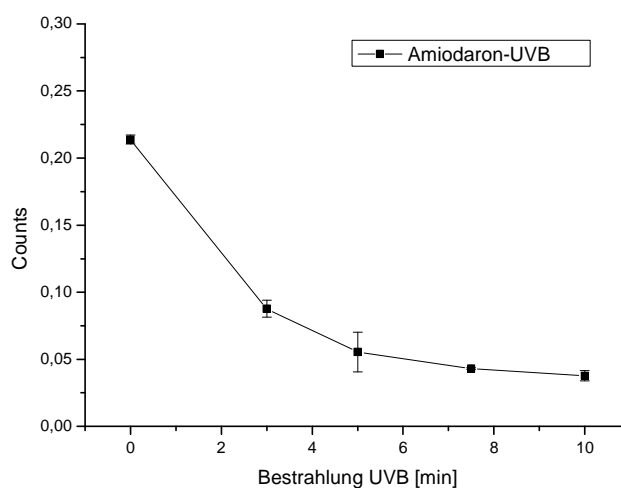


Abbildung 25: Abbau von Amiodaron unter UVB-Bestrahlung

Der photolytische Verlauf ist ähnlich dem Verlauf von Naproxen. Dies ist kein Zufall. Beide besitzen ein ähnliches Chromophor, nämlich ein substituiertes Phenon Grundgerüst. Dieses scheint sehr anfällig auf Lichteinwirkung zu sein.

5.2.5 Untersuchung von Diclofenac hinsichtlich seiner Photostabilität

Mit Diclofenac wurde ein weiterer Arzneistoff aus der Gruppe der NSAIDs untersucht. Wie auch schon bei Ketoprofen und Naproxen handelt es sich bei Diclofenac um ein Phenylpropionsäure-Derivat. Diclofenac findet vor allem in der rheumatischen Therapie Anwendung und ist ebenfalls dafür bekannt, dass es zu photosensitiven Erkrankungen führen kann (Przybilla, Schwab-Przybilla et al. 1987; Encinas, Bosca et al. 1998).

5.2.5.1 Chromatographische Bedingungen zur Untersuchung der photochemischen Stabilität von Diclofenac

Diclofenac wurde wie auch die anderen beiden NSAIDs mit Hilfe des „Zwei-Säulen-Systems“ untersucht. Die wässrige Untersuchungslösung wurde dabei jeweils vier Mal für 0, 1, 3, 5, 7 und 10 Minuten mit UVA-Licht bestrahlt und jeweils vier Mal für 0, 3, 5, 7, 10, 12 und 15 Minuten mit UVB-Licht bestrahlt. Für die Dauer der Bestrahlung musste der Fluss auf Pumpe 1 ausgesetzt werden und wurde danach wieder aufgenommen. Nach dem Anreichern der Probe für 5 Minuten auf Säule 1 (Aqua 5 μ C18 30x4,8mm) wurde sie anschließend mittels Backflush über Säule 2 (Onyx monolythic C18 50 x 4,6 mm) mit Hilfe eines ACN/Puffer-Gradienten aufgetrennt.

	Zeit [min]	0	5	8	30
Pumpe 1 (1 ml/min)	Puffer %	100	100	100	100
Pumpe 2 (1,5ml/min)	Puffer %	90	90	55	55
	Acetonitril	10	10	45	45

Tabelle 7: Gradientenprofil und Schaltplan für die Untersuchung von Diclofenac

5.2.5.2 Ergebnisse zur Photostabilitätsuntersuchung von Diclofenac

Diclofenac zeigt im Gegensatz zu den beiden anderen getesteten NSAIDs eine stärkere Photodegradation unter UVA-Bestrahlung. So sind nach fünf Minuten Bestrahlung mit UVA-Licht nur noch 47% Diclofenac wiederzufinden, während nach zeitlich gleicher UVB-Bestrahlung noch 70% Diclofenac wiederzufinden sind.

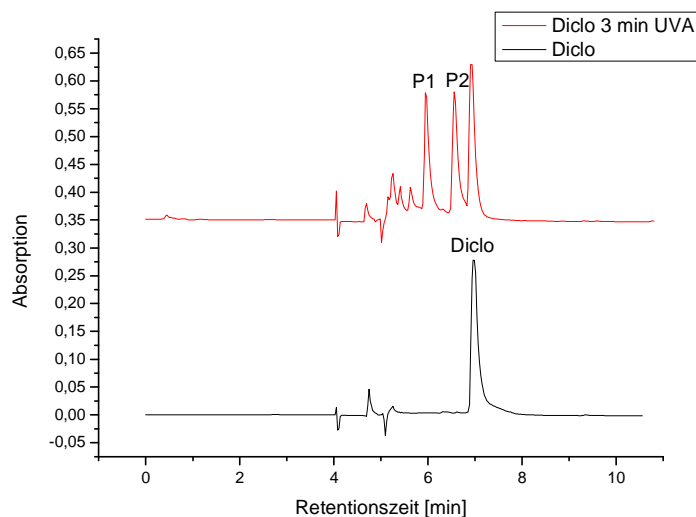


Abbildung 26: Chromatogramme von der injizierten Diclofenac-Lösung unbestrahlt und nach fünfminütiger UVA-Bestrahlung

Wie man Abbildung 26 entnehmen kann, können mehrere Photoproducte während des photolytischen Abbaus von Diclofenac gefunden werden. Daher bildeten sich nicht alle Produkte direkt aus Diclofenac. Es ließ sich vielmehr zeigen, dass es sich um eine Momentaufnahme handelt und die gebildeten Produkte weiterreagieren. Wenn man sich den Konzentrationsverlauf von Diclofenac, Photoprodukt P1 und Photoprodukt P2 anschaut (Abbildung 27), dann kann man sehen, dass es sich beim Photoprodukt P1 um ein gebildetes Intermediär handelt, während das Photoprodukt P2 ein mögliches Endprodukt darstellt. Während die Konzentration von P1 zunächst ansteigt und danach über die Bestrahlungszeit abfällt, steigt die Konzentration von P2 stetig.

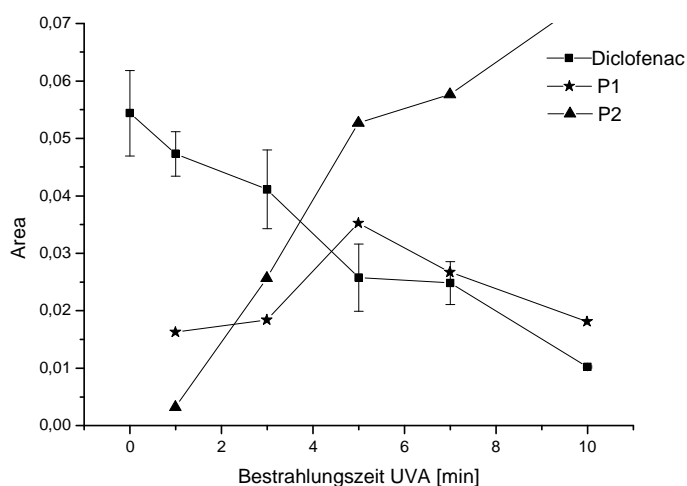


Abbildung 27: Photolytischer Abbau von Diclofenac unter UVA, inklusive Konzentrationsverlauf von Photoprodukt 1 und 2

Das Photoprodukt P1 konnte mit Hilfe des DAD-Spektrums als 8-Chloro-9H-Carbazol-1yl-essigsäure identifiziert werden. Dieses Photoprodukt wurde von Eriksson, Svanfelt et al. (Eriksson, Svanfelt et al. 2010) als ein mögliches Intermediär beschrieben. Leider konnten die übrigen Photoprodukte anderen möglichen Strukturen nicht zugewiesen werden, da in der Literatur keine entsprechenden UV/VIS-Spektren vorhanden waren. P1 reagiert wahrscheinlich durch eine schnell ablaufende photonucleophile Hydroxylierung weiter. Hierbei handelt es sich um eine bekannte Reaktion von halogenierten aromatischen Verbindungen in wässrigen Lösungen (Rayne, Forest et al. 2009).

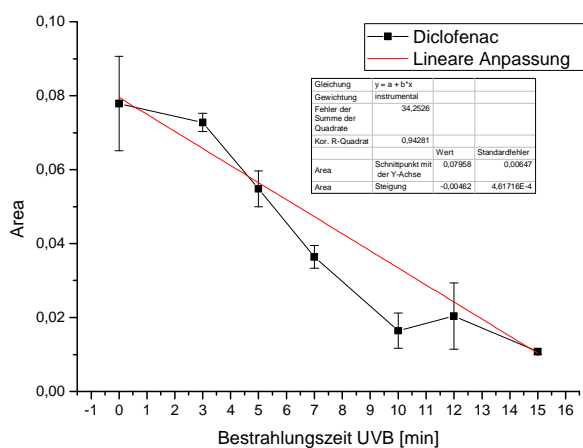


Abbildung 28: Kinetik von Diclofenac unter UVB-Bestrahlung

Wie schon angesprochen, verläuft die Kinetik des Abbaus von Diclofenac unter UVB-Bestrahlung in einer anderen Geschwindigkeit als unter UVA-Bestrahlung. Jedoch sind dies nicht die einzigen Unterschiede. So zeigt sich nicht nur eine andere Abbaugeschwindigkeit, sondern auch, dass sich die gebildeten Photoprodukte unterscheiden, wie man an Hand der unterschiedlichen UV/VIS Spektren der entstandenen Peaks sehen kann.

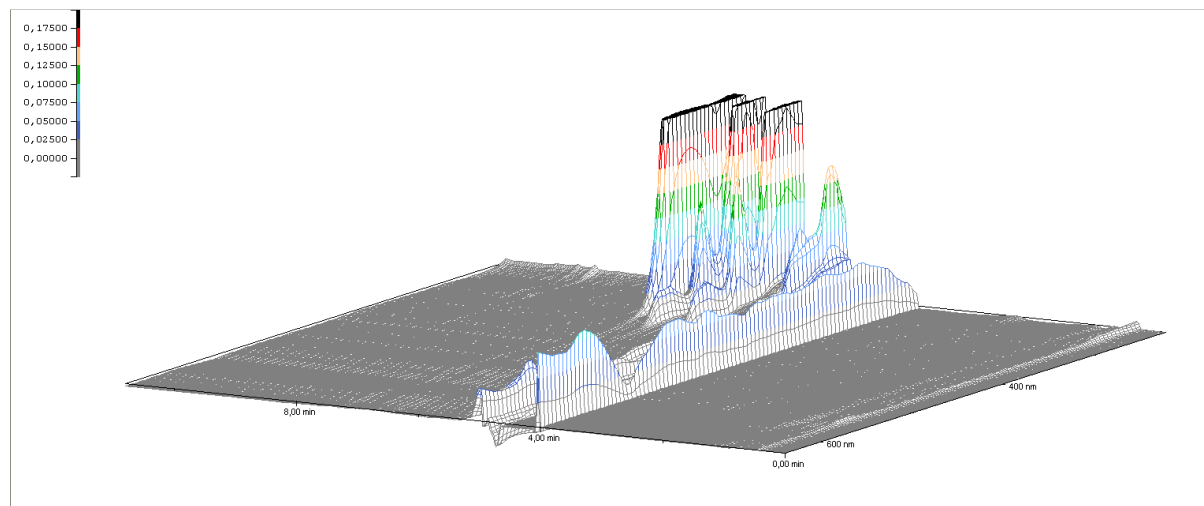


Abbildung 29: DAD-Plot von einer wässrigen Diclofenac Probe nach UVA-Bestrahlung

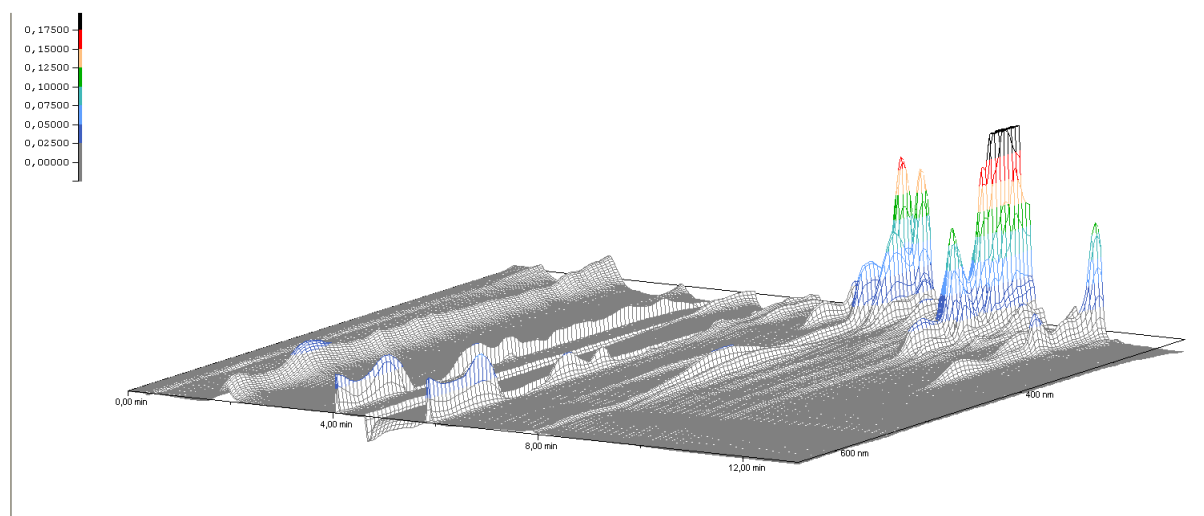


Abbildung 30: DAD-Plot von einer wässrigen Diclofenac Probe nach UVB-Bestrahlung

Dies kann unterschiedliche Ursachen haben. Auf der einen Seite sind in der Literatur je nach Sauerstoff An- und Abwesenheit unterschiedliche Reaktionswege beschrieben. Es ließe sich ferner dadurch erklären, dass die Proben an unterschiedlichen Tagen hergestellt wurden und sich der gelöste Sauerstoffanteil im Wasser unterscheiden könnte und sich so unterschiedliche Abbauprodukte gebildet haben. Eine andere Erklärung wäre, dass auf Grund der unterschiedlichen emittierten Wellenlängenbereiche der Lampen unterschiedliche Molekülstrukturen angeregt wurden und so andere photochemischen Reaktionen abliefern.

Aufgrund dieser Ergebnisse sieht man, dass es wichtig ist, die UV-Strahlung als Eingangsgröße zu diskriminieren, denn nicht nur die Kinetik kann sich unterscheiden, es scheint auch möglich zu sein, dass es in Abhängigkeit des eingestrahlt Lichtes, zu anderen Photoprodukten kommt.

5.2.6 Untersuchung von Hydrochlorothiazid hinsichtlich seiner Photostabilität

Hydrochlorothiazid (HCT) gehört zu der Gruppe der Diuretika und dort zu den Thiaziden. Es findet verstärkt Einsatz als orales Antihypertensivum. Schon kurz nach seiner Markteinführung in den 1950iger Jahren wurden die ersten photosensitiven Hautreaktionen beschrieben (Harber, Lashinsky et al. 1959; Norins 1959). Auch wenn der Mechanismus der photosensibilisierenden Wirkung unklar ist, so ist doch der photochemische Abbau schon mehrmals untersucht worden. Gerade das in 6-Stellung substituierte Chlor scheint photochemisch instabil zu sein (Tamat and Moore 1983).

5.2.6.1 Chromatographische Bedingungen zur Untersuchung der photochemischen Stabilität von Hydrochlorothiazid

Um die Photostabilität von HCT zu untersuchen, wurde eine wässrige Hydrochlorothiazid-Lösung mit Hilfe des „Zwei-Säulen“-HPLC-Systems untersucht. Die Probe wurde jeweils vier Mal für 0; 5; 7,5; 10 und 12,5 Minuten mit UVA-Licht bestrahlt und analog dazu 0; 1; 3; 5 und 7,5 Minuten mit UVB-Licht bestrahlt. Nach der Bestrahlung im Photoreaktor wurden die Proben jeweils für vier Minuten auf Säule 1 angereichert (Aqua 5 μ C18 30x4,8mm) und anschließend nach Ventilumschaltung über Säule 2 (Onyx monolythic C18 50 x 4,6 mm) chromatographisch aufgetrennt. Die Bestrahlung fand im wässrigen Phosphatpuffer pH 7,2 statt.

	Zeit [min]	0	4	5	10	30
Pumpe 1	Puffer %	100	100	100	100	100
Pumpe 2	Puffer %	90	90	75	45	45
	Acetonitril	10	10	25	55	55

Tabelle 8: Gradientenprofil und Schaltplan für die Untersuchung von HCT

5.2.6.2 Ergebnisse zur Photostabilitätsuntersuchung von Hydrochlorothiazid

Mit zunehmender Belichtungszeit werden die detektierten Signalfächen für Hydrochlorothiazid immer kleiner. Die Abbildung 31 und Abbildung 32 geben dabei die erhaltenen Ergebnisse der Peakflächen bei 224 nm wieder.

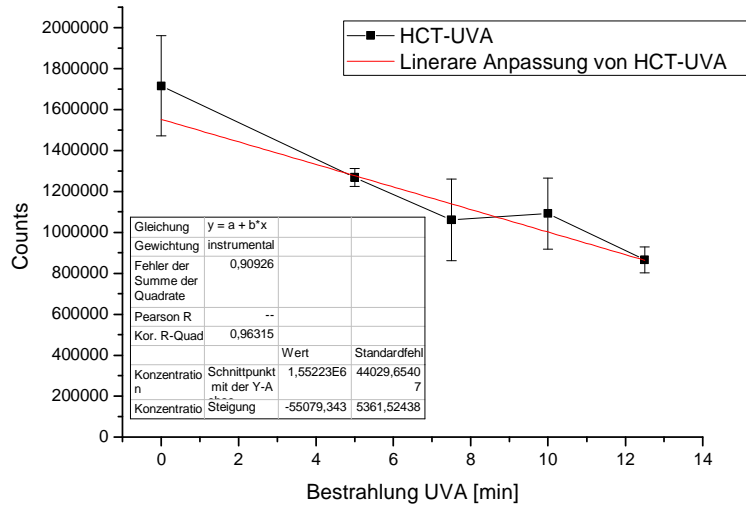


Abbildung 31: Photolyse einer wässrigen Hydrochlorothiazid-Lösung gepuffert bei pH 7,2 unter Belichtung mit UVA

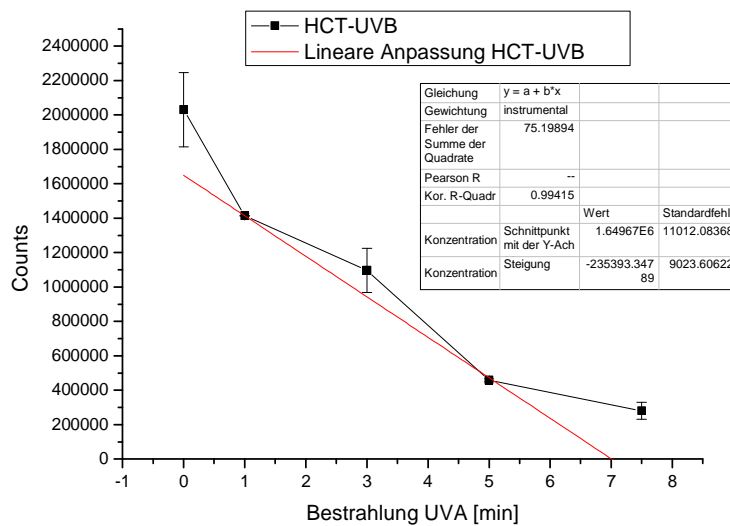


Abbildung 32: Photolyse einer wässrigen Hydrochlorothiazid-Lösung gepuffert bei pH 7,2 unter Belichtung mit UVB

Nach fünf Minuten Bestrahlung sind unter UVA-Licht noch 74% HCT vorhanden, während nach gleicher Zeit UVB-Licht nur noch 22,5% vom ursprünglichen injizierten HCT vorhanden sind. Auch hier reagiert der Arzneistoff deutlich stärker auf das Einwirken von UVB-Licht. Dies ist auch an der Steigung der Konzentrationabnahme über die Bestrahlungszeit abzulesen. Während der Abbau unter UVA Einwirkung annähernd linear verläuft, verläuft der Abbau unter UVB eher exponentiell. Verglichen jedoch mit Ketoprofen verläuft der Abbau relativ langsam, hat aber eine ähnliche photolytische Halbwertszeit wie Naproxen.

5.2.7 Untersuchung von Furosemid hinsichtlich seiner Photostabilität

Wie schon in Kapitel 4.3.3 beschrieben, gehört Furosemid zu der Gruppe der Diuretika und es ist bekannt, dass es zu phototoxischen Reaktionen kommen kann. Das Hauptziel der Untersuchungen ist es zu prüfen, ob ein oder mehrere Photoprodukte gefunden werden können und wie schnell es zum Abbau unter UVA und UVB-Bestrahlung kommt, um eine Reaktivität abschätzen zu können.

5.2.7.1 *Chromatographische Bedingungen zur Untersuchung der photochemischen Stabilität von Furosemid*

Als chromatographisches System wurde wieder das „Zwei-Säulen-System“ gewählt. Die injizierte wässrige Furosemid-Lösung wurde mehrfach unterschiedlich lange mit UVA und UVB bestrahlt. Dabei wurden die verschiedenen Bestrahlungszeiten unter UVA- und UVB-Licht diskriminiert, da unter UVB auf Grund einer erhöhten Absorption gegenüber UVA mit einer erhöhten Reaktivität gerechnet wurde. Unter UVB wurde Furosemid 0; 3; 5; 7,5 und 10 Minuten im Wässrigen bestrahlt, während unter UVA die Zeitintervalle 0; 5; 10; 15 und 20 Minuten betragen. Über Pumpe 1 wurde mit 1 ml/min wässriger Phosphatpuffer gefördert, der Fluss wurde jeweils für die Bestrahlung gestoppt. Die Probe wurde anschließend auf Säule 1 (Aqua 5 μ C18 30x4,8mm) angereichert und danach mittels Backflush über Säule 2 (Onyx monolythic C18 50 x 4,6 mm) aufgetrennt. Über die Pumpe 2 wurde ein Phosphatpuffer/Acetonitril-Gradient mit 1,5ml/min gefahren (siehe Tabelle 4). Die Peaks wurden bei 233 nm ausgewertet.

	Zeit [min]	0	5	8	30
Pumpe 1	Puffer %	100	100	100	100
Pumpe 2	Puffer %	90	90	55	55
	Acetonitril	10	10	45	45

Tabelle 9: Gradientenprofil und Schaltplan für die Untersuchung von Furosemid

5.2.7.2 Ergebnisse zur Photostabilitätsuntersuchung von Furosemid

Das phototoxische Diuretikum Furosemid zeigt sowohl unter UVA, als auch unter UVB im Wässrigen (gepuffert pH 7,2) Photodegradation. Dabei verläuft, wie zu erwarten war, die Photolyse unter UVB-Bestrahlung deutlich schneller ab als unter UVA. Wenn man sich die Konzentrationen von Furosemid nach 5 Minuten Bestrahlung betrachtet, so sind unter UVA Einwirkung 27% zersetzt, während unter UVB bereits 40% Furosemid umgesetzt sind. Wie man an Hand der Abbildung 33 und Abbildung 34 sehen kann, verläuft die Zerfallskinetik nicht linear.

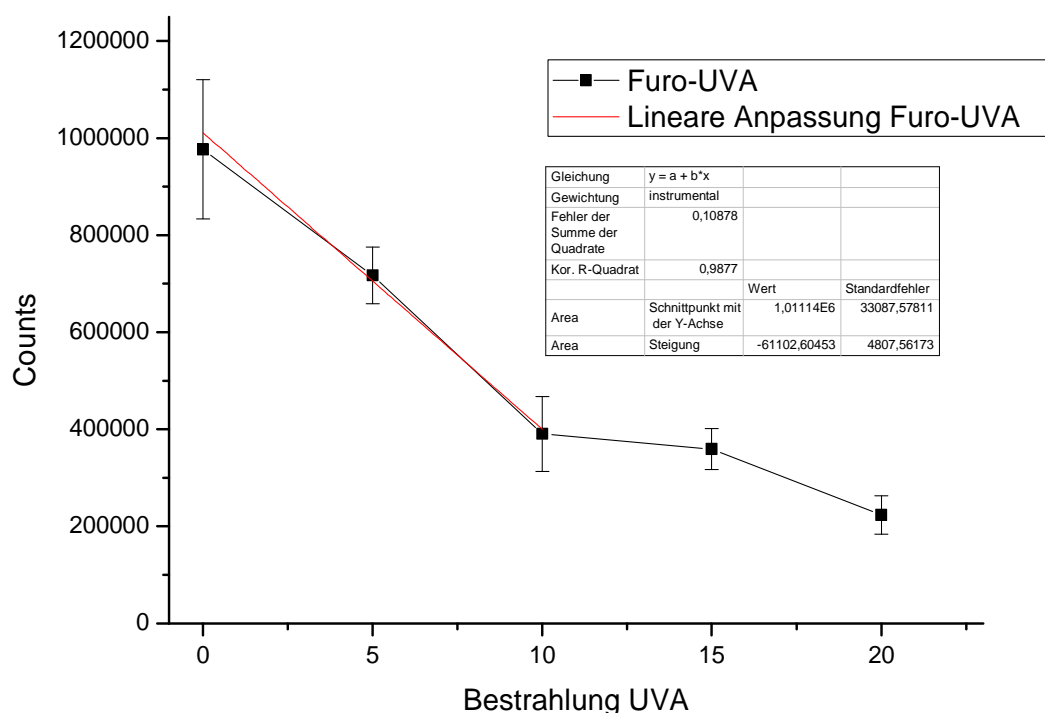


Abbildung 33: Abbau von Furosemid unter UVA-Bestrahlung

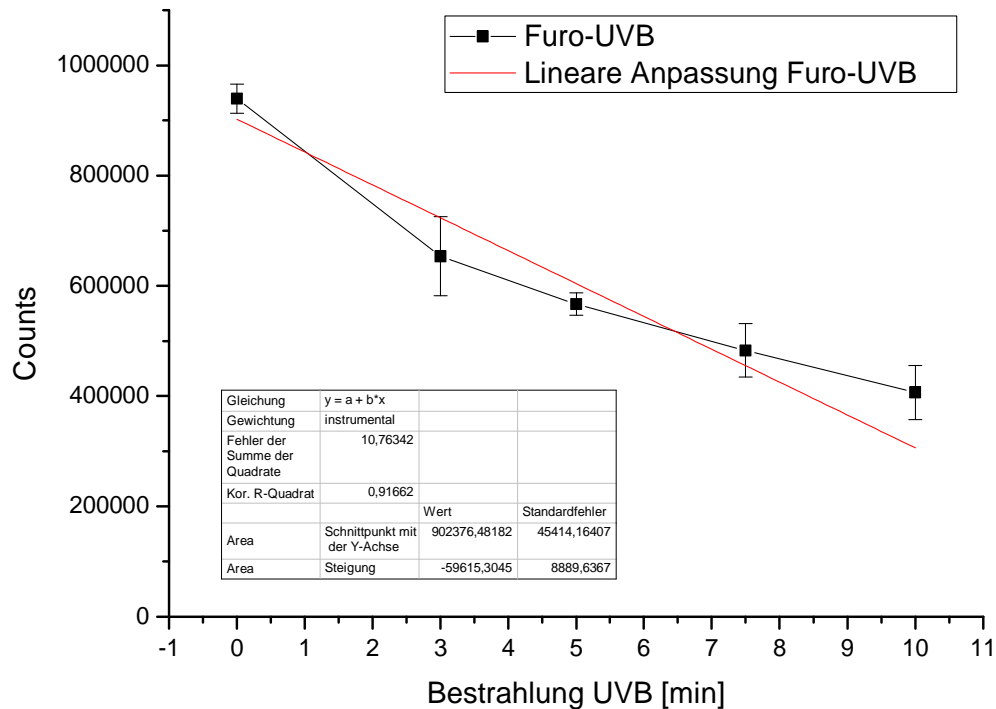


Abbildung 34: Abbau von Furosemid unter UVB-Bestrahlung

Photoprodukte konnten im Chromatogramm nicht gefunden werden. Es ist zu vermuten, dass sie auf Grund anderer physikochemischer Eigenschaften durch das Umschalten verloren gegangen sind oder mit der Kapillare des Photoreaktors wechselwirken und erst nach dem Umschalten eluieren und daher nicht erfasst werden. Dennoch ist die rasche Photolyse von Furosemid ein erster Hinweis auf das photosensitive Potential des Arzneistoffes, da er eine starke Reaktion auf die Einstrahlung von UVA- und UVB-Licht zeigt.

5.2.8 Untersuchung von Doxycyclin hinsichtlich seiner Photostabilität

Doxycyclin gehört zu der Klasse der Tetracyclin-Antibiotika, welche bekannt dafür sind, als Photosensitizer während der Therapie zu wirken (Bjellerup and Ljunggren 1994). Das phototoxische Potential unter den Tetracyclin-Derivaten ist verschieden, obwohl sie alle das gleiche Grundgerüst besitzen. Doxycyclin gehört dabei zu den an stärksten photoaktiven Mitgliedern der Tetracyclin-Antibiotika. Ungefähr 3% der Patienten zeigen bei einer Doxycyclin-Gabe von 100mg/Tag phototoxische Wirkungen. Bei einer Studie mit 15 Patienten zeigten 11 von 15 Patienten phototoxische Reaktionen unter Gabe von 200mg Doxycyclin pro Tag (Frost,

Weinstein et al. 1972). Auf Grund dessen ist Doxycyclin der interessanteste Vertreter aus der Gruppe der Tetracycline und eignet sich hervorragend als Modells substanz.

5.2.8.1 Chromatographische Bedingungen zur Untersuchung der photochemischen Stabilität von Doxycyclin

Die wässrige Doxycyclin-Lösung (Doxy) wurde nach der Injektion durch die Pumpe 1 im wässrigen Phosphatpuffer (pH 7,2) in den Photoreaktor befördert. Dort wurde sie jeweils vier Mal für 0, 3, 5, 7, 10 und 15 Minuten mit UVA-Licht und analog dazu 0, 10, 15, 20, 25 und 30 Minuten mit UVB-Licht bestrahlt. Während der Bestrahlung wurde der Fluss der Pumpe 1 gestoppt. Nach der Bestrahlung wurde die Probe für 4 Minuten auf Säule 1 angereichert und anschließend nach Ventilumschaltung unter Verwendung eines Acetonitril/Puffergradienten über die Säule 2 chromatographisch aufgetrennt und mit Hilfe eines DADs detektiert.

	Zeit [min]	0	4	8	30
Pumpe 1 (1 ml/min)	Puffer %	100	100	100	100
Pumpe 2 (1,5 ml/min)	Puffer %	90	90	55	55
	Acetonitril	10	10	45	45

Tabelle 10: Gradientenprofil und Schaltplan für die Untersuchung von Doxycyclin

5.2.8.2 Ergebnisse zur Photostabilitätsuntersuchung von Doxycyclin

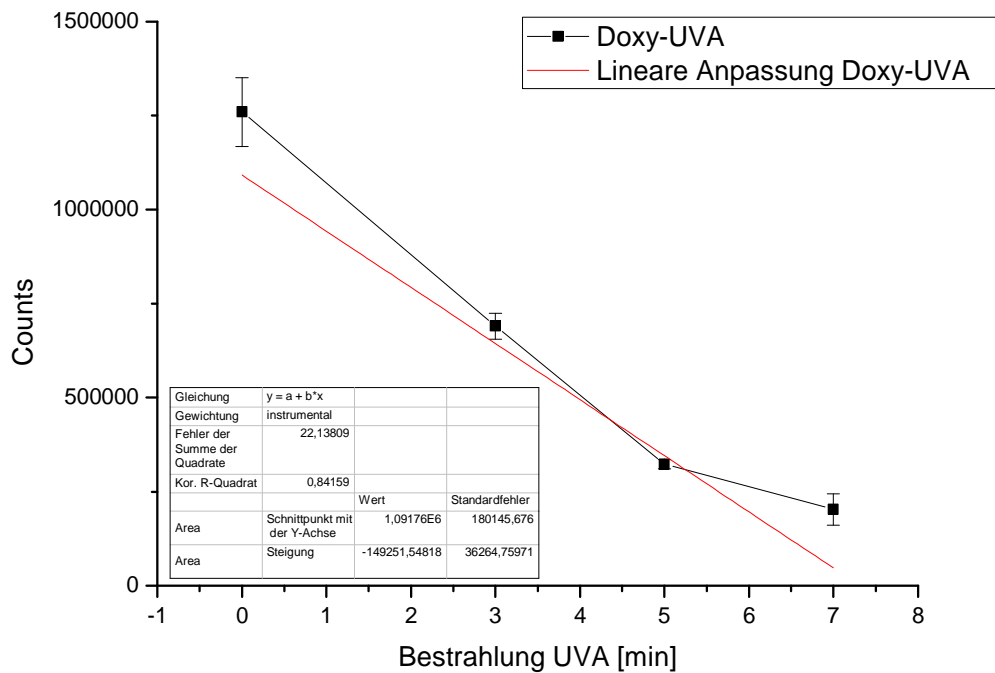


Abbildung 35: Doxy mit UVA belichtet

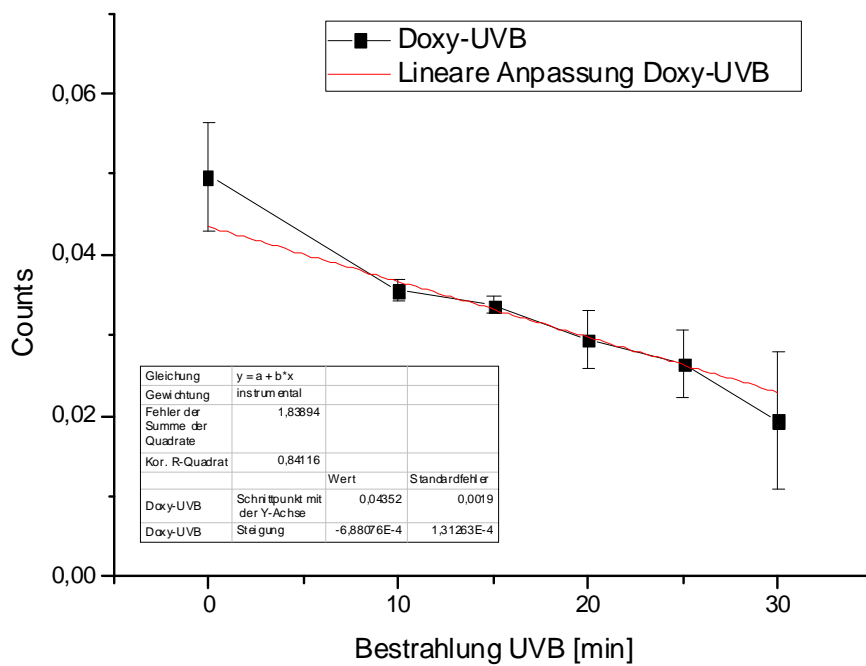


Abbildung 36: Doxy mit UVB belichtet

Die Kinetik des photochemischen Abbaus von Doxycyclin ist in der Abbildung 35 und Abbildung 36 dargestellt. In beiden Fällen nehmen die detektierten Signalflächen mit steigender Bestrahlungsdauer ab, beide Kinetiken verlaufen annähernd linear. Auffällig ist dabei, dass Doxycyclin unter UVA-Bestrahlung deutlich schneller einer Photodegradation unterliegt als unter UVB-Bestrahlung. So sind nach fünf Minuten UVA-Bestrahlung bereits ca. 75% ursprünglich injiziertes Doxycyclin abgebaut, während unter UVB-Bestrahlung nach 20 Minuten noch ca. 60% Doxycyclin vorhanden sind. In Abbildung 37 ist ein erhaltenes Chromatogramm nach der zehn-minütigen Bestrahlung von Doxycyclin mit UVB dargestellt. Neben dem Hauptpeak Doxycyclin kann man die Bildung mehrerer anderer Peaks und damit von Abbauprodukten beobachten.

Die verstärkte Photoaktivität von Doxycyclin auf UVA lässt sich durch das große Chromophor des Moleküls und der verstärkten Absorption in diesem Bereich erklären. Jedoch ist diese größere Reaktivität im UVA-Bereich auch eine mögliche Erklärung für das starke phototoxische Potential von Doxycyclin, da UVA-Licht in der Lage ist, in tiefere Kompartimente der Haut einzudringen. Somit ist die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass Doxycyclin in der Haut von der Strahlung erreicht wird und dort durch phototoxische Reaktionen zur Zellschädigung führen kann.

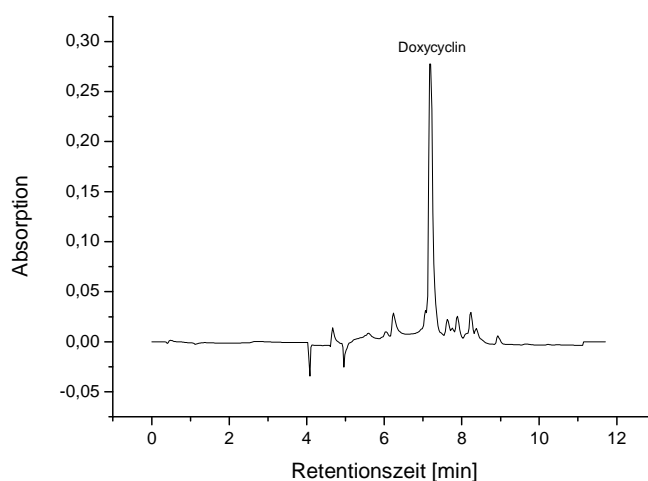


Abbildung 37: Chromatogramm von Doxycyclin nach 10 min UVB-Bestrahlung detektiert bei 254 nm

5.2.9 Untersuchung von Simvastatin hinsichtlich seiner Photostabilität

Simvastatin ist strukturverwandt zu Lovastatin und gehört zur Klasse der HMG-CoA-Reduktasehemmer (Beck, Kessler et al. 1990), die Statine genannt werden. Es findet Einsatz

in der Kontrolle der Hypercholesterinämie, um das Risiko eines kardiovaskulären Vorfalls zu verringern (Schmitz and Langmann 2006).

Obwohl Statine für ihre geringen Nebenwirkungen bekannt sind (Istvan 2003), gibt es dennoch auch Fallbeschreibungen von photosensitiven Ereignissen bei Patienten, wie z.B. das Auftreten von Erythemen und aktinischer Dermatitis in lichtexponierten Hautarealen (Holme, Pearse et al. 2002; Morimoto, Kawada et al. 2006). Deshalb ist es interessant, die photochemischen Eigenschaften im Wässrigen zu untersuchen, besonders, weil Simvastatin als Bulkware keine Photodegradation zeigt (Mielcarek, Naskrent et al. 2009).

5.2.9.1 Chromatographische Bedingungen zur Untersuchung der photochemischen Stabilität von Simvastatin

Als analytisches System kam das in Kapitel 4.6 beschriebene „Zwei-Säulen-System“ zum Einsatz, wobei die Bestrahlung von Simvastatin im wässrigen Phosphatpuffer erfolgte und jeweils drei Mal für je 5, 10, 20 und 30 min mit UVB bestrahlt wurde. Während der Bestrahlung wurde der Fluss der Pumpe 1 gestoppt. Nach der Bestrahlung wurde die bestrahlte Probe fünf Minuten auf Säule 1 (Aqua 5 μ C18 30x4,8mm) angereichert und nach Ventilumschaltung mittels Backflush über Säule 2 (Onyx monolythic C18 50 x 4,6 mm) aufgetrennt. Über die Pumpe 2 wurde isokratisch ACN/Phosphatpuffer (45/55) gefördert. Beide Pumpen förderten 1 ml/min an Fließmittel. Die Peaks werden bei 238 nm detektiert.

Analog dazu wurde Simvastatin jeweils drei Mal 5; 7,5 und 10 Minuten mit Licht im UVA-Bereich bestrahlt.

5.2.9.2 Ergebnisse zur Photostabilitätsuntersuchung von Simvastatin

Bei der Bestrahlung von Simvastatin im Wässrigen kam es bei beiden Strahlungsquellen zu einer Photodegradation. Die photolytische Zersetzung ist in Abbildung 38 dargestellt. Der prinzipielle Kurvenverlauf deutet auf eine Reaktionskinetik erster Ordnung hin. Nach einer Bestrahlung mit UVB-Licht von fünf Minuten sind bereits 50% des Arzneistoffes zersetzt, während bei der Bestrahlung mit Strahlung im UVA-Bereich nach fünf Minuten bereits 75% Simvastatin zerstört sind. Dies ist sehr erstaunlich, da Simvastatin mehr Energie im Bereich des UVB-Lichtes absorbieren sollte. Um Temperatureinflüsse bezüglich dieses Ergebnisses auszuschließen, wurde in einem weiteren Versuch die Stabilität von Simvastatin gegenüber erhöhter Temperatur untersucht (5.2.9.3).

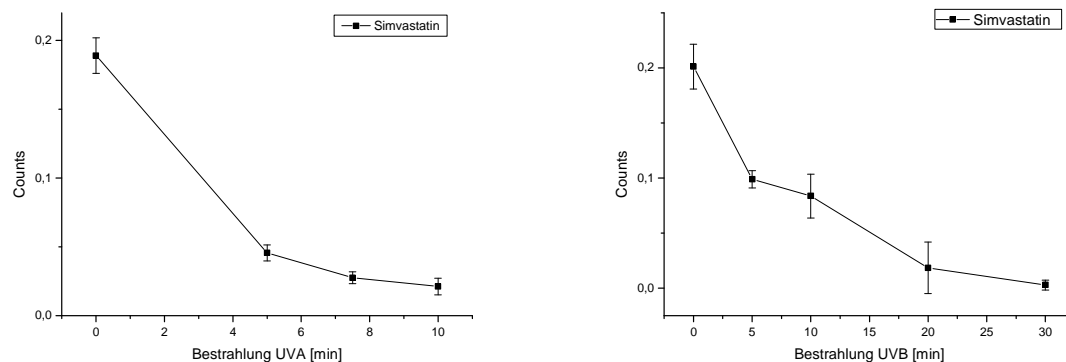


Abbildung 38: Photodegradation von Simvastatin in wässriger Lösung in Abhängigkeit von UVA- und UVB-Bestrahlung.

In Abbildung 39 sind die erhaltenen Chromatogramme für Simvastatin ohne Bestrahlung, nach fünf minütiger UVA- und zehn-minütiger UVB-Bestrahlung abgebildet. Im Chromatogramm von Simvastatin „unbestrahlt“ ist neben den Störungen in der Baseline durch das Schalten der Ventile - deutlich am negativen Ausschlag zu erkennen, noch zusätzlich ein Systempeak bei ca. sechs Minuten zu sehen. Dieser kommt durch die gewählten chromatographischen Bedingungen zustande, denn nach dem Umschalten gelangt das gesamte Volumenfließmittel, welches sich in der Säule 1 befindet, in diesem Fall 100%-iger wässriger Phosphatpuffer, auf die Säule 2 und es kommt zur Störung des Gleichgewichtes.

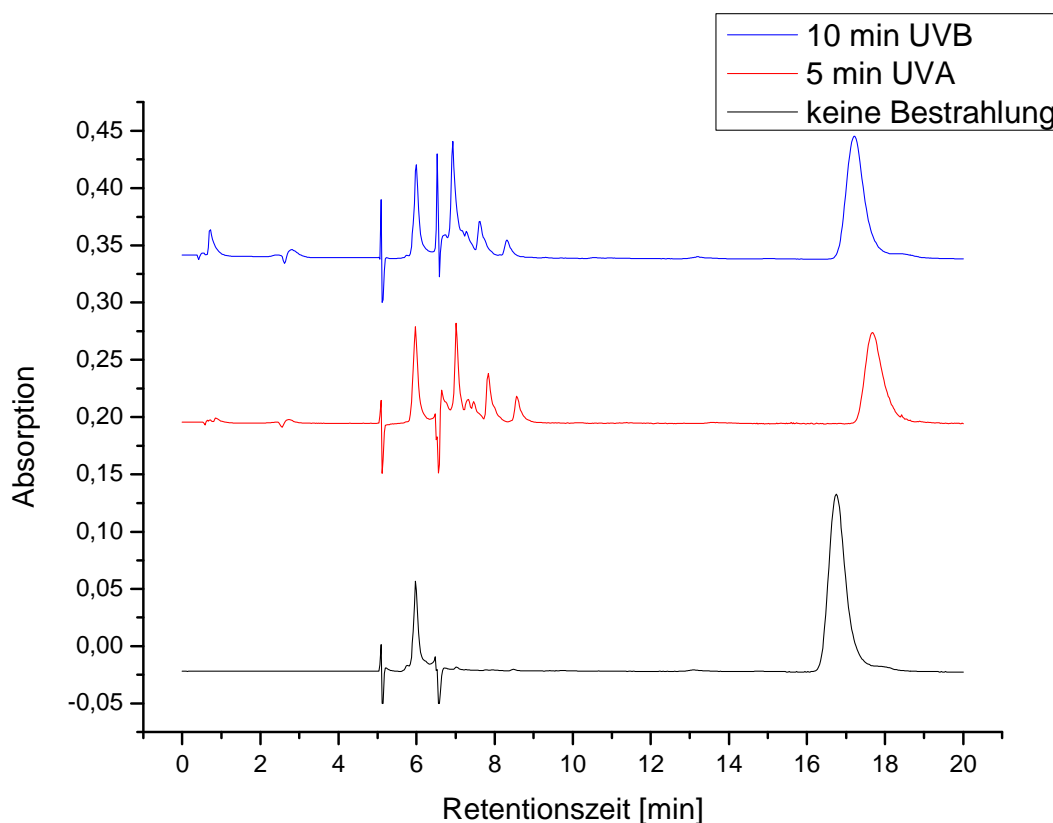


Abbildung 39: Chromatogramme von Simvastatin unbestrahlt und bestrahlt mit UVA und UVB. Detektionsquellenlänge ist 238 nm.

Bei den beispielhaft ausgewählten Chromatogrammen für Simvastatin online, bestrahlt mit UVA- und UVB-Strahlung, ist gut zu erkennen, wie sich mehrere neue Peaks neben denen von Simvastatin ausbilden. Weil sie über eine deutlich kleinere Retentionszeit verfügen, ist davon auszugehen, dass es sich entweder um polare Abbauprodukte handelt oder um deutlich kleinere Fragmente vom ursprünglichen Simvastatin-Molekül. Wie man dem DAD-Plot (Abbildung 40) entnehmen kann, handelt es sich hierbei auf jeden Fall um neu gebildete Substanzen. Außerdem scheint das Stoppen des Flusses während der Bestrahlung eine leichte Verschiebung der Retentionszeiten zu bewirken. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass es auf Grund des längeren Verweilens im Photoreaktor zu Diffusionsvorgängen kommt.

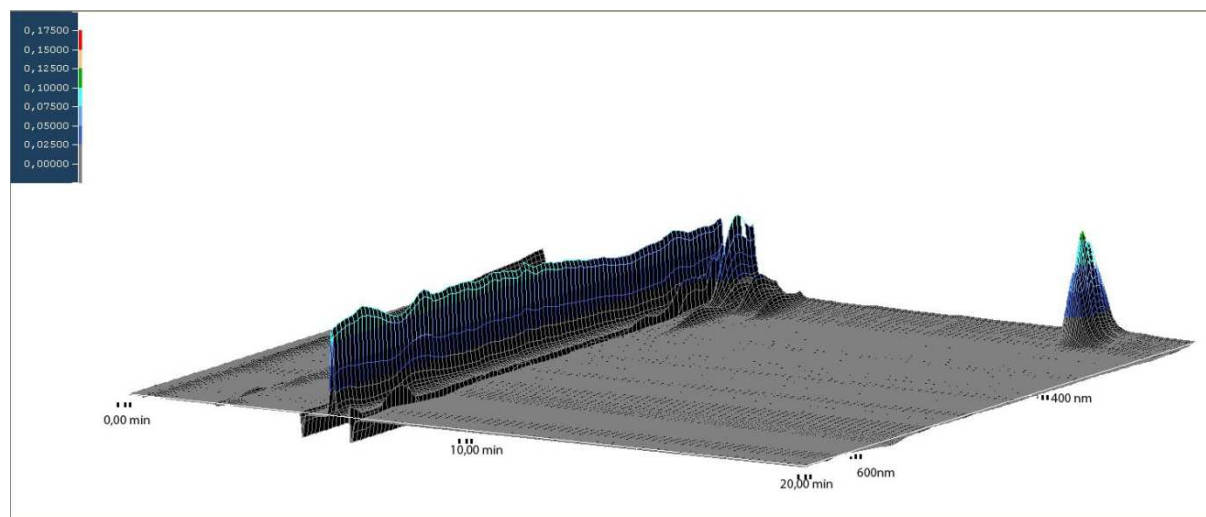


Abbildung 40: DAD-Plot von Simvastatin nach 10 Minuten UVB-Bestrahlung

5.2.9.3 Untersuchung der Stabilität von Simvastatin im Wässrigen hinsichtlich erhöhter Temperatur

Um die Einflüsse der Temperatur auf Simvastatin im Wässrigen zu untersuchen, wurde eine Simvastatin-Lösung 15, 30 und 60 Minuten im Trockenschrank bei 60°C thermisch gestresst und anschließend mit Hilfe des Analysensystems 1 aufgetrennt. Um Störungen im System zu vermeiden, wurde die Methode ein wenig angepasst und ein Gradient gefahren, die Bedingungen sind in Tabelle 11 wiedergegeben.

	Zeit	0	4	5	10	30
Pumpe1	Puffer %	100	100	100	100	100
Pumpe 2	Puffer %	90	90	75	45	45
	Acetonitril	10	10	25	55	55

Tabelle 11: Gradientenprofil und Schaltplan für die Untersuchung von Simvastatin

In Abbildung 41 sind Auszüge der erhaltenen Ergebnisse zu sehen, wobei das Hauptaugenmerk darauf lag, zu beobachten, ob sich die gleichen zusätzlichen Peaks bilden wie bei der Bestrahlung mit UVA- und UVB-Licht. Die Konzentration in der thermisch belasteten Probe ist geringer als in der bestrahlten und der Kontrollprobe, da auf Grund der erhöhten Temperatur kein Anlösen in Methanol möglich war und so die Konzentration verringert werden musste.

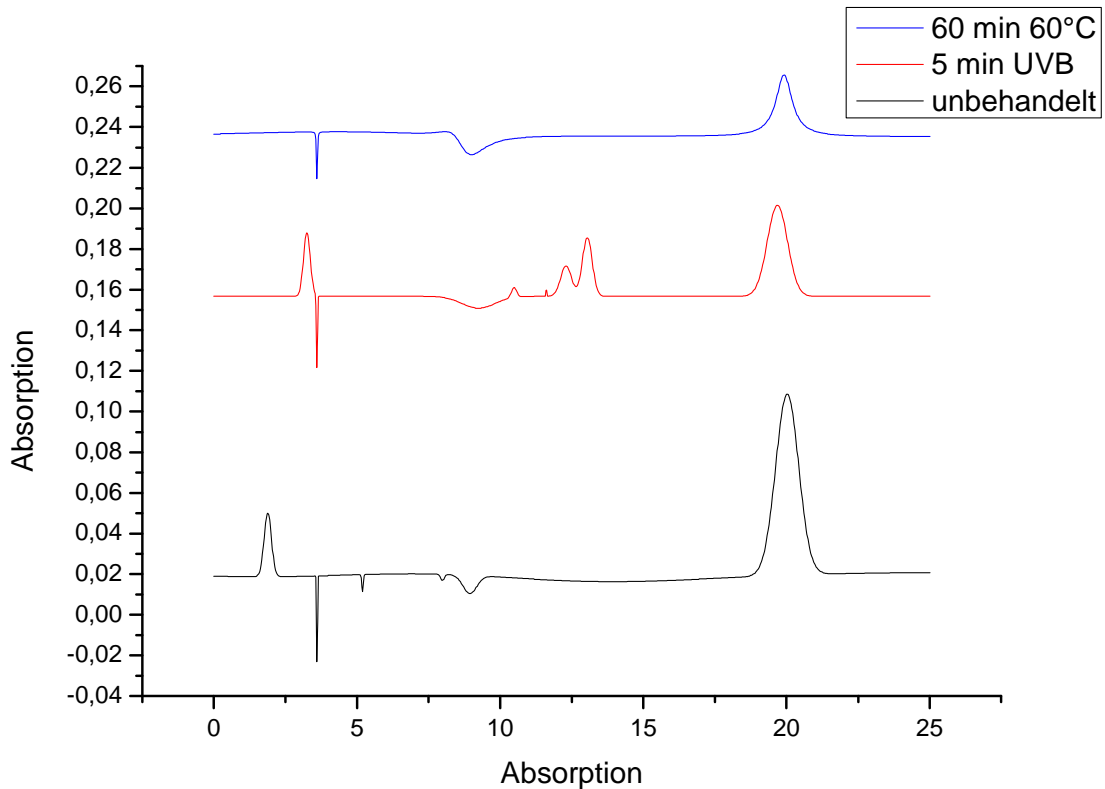


Abbildung 41: Chromatogramme (geglättet) zur Untersuchung der Stabilität von Simvastatin gegenüber thermischen Einflüssen

Wie man aber gut den Chromatogrammen entnehmen kann, treten keine zusätzlichen Peaks bei dem thermisch belasteten Simvastatin auf, so dass die gebildeten Abbauprodukt lichtinduziert sein müssen.

5.2.10 Untersuchung von H1-Antihistaminika hinsichtlich seiner Photostabilität

H 1-Antihistaminika sind weit verbreitete antiallergische Arzneistoffe. Topische Applikationen von Antihistaminika führen im Allgemeinen zu Hautreaktionen, während bei einer oralen Aufnahme Hautreaktionen sehr selten sind (Lew, Haw et al. 2004). Unter diesen Hautreaktionen befinden sich auch photosensitive Reaktionen. Auf Grund dessen wurden Loratadin und Cetirizin untersucht, da sie häufige Vertreter dieser Klasse in der modernen Therapie sind.

5.2.10.1 Chromatographische Bedingungen zur Untersuchung der photochemischen Stabilität von Loratadin und Cetirizin

Als analytisches System kam für Loratadin das in Kapitel 4.6 beschriebene „Ein-Säulen-System“ zum Einsatz, während für Cetirizin das „Zwei-Säulen-System“ genutzt wurde. Wie auch bei den vorherigen untersuchten Substanzen geschah die Belichtung im wässrigen Phosphatpuffer und der Fluss wurde jeweils während der Bestrahlung angehalten. Für Cetirizin wurden die gleichen Bedingungen wie bei Ketoprofen gewählt (5.2.2.1.) Bei Loratadin hingegen wurde ein wässriger Phosphatpuffer/Acetonitril Gradient eingesetzt.

	Zeit	0	3	10	13	18
Pumpe1 (1ml/min)	Puffer %	100	100	65	65	0
	Acetonitril	0	0	35	35	100

Tabelle 12: Gradientenprofil für die Untersuchung von Loratadin

5.2.10.2 Ergebnisse zur Photostabilitätsuntersuchung von Loratadin und Cetirizin

Sowohl Loratadin, welches vier Mal für jeweils 0; 3; 5; 7,5 und 10 Minuten, als auch Cetirizin (Ceti), welches ebenfalls viermal über 0, 10, 20 und 30 Minuten mit UVA-Licht bestrahlt wurde, zeigen keine signifikanten Änderungen. Die Abweichungen, die in Abbildung 42 zu erkennen sind, lassen sich dadurch erklären, dass es durch das Stoppen des Flusses zu vermehrten Diffusionvorgängen kommt, welche eine Peakverbreiterung verursachen.

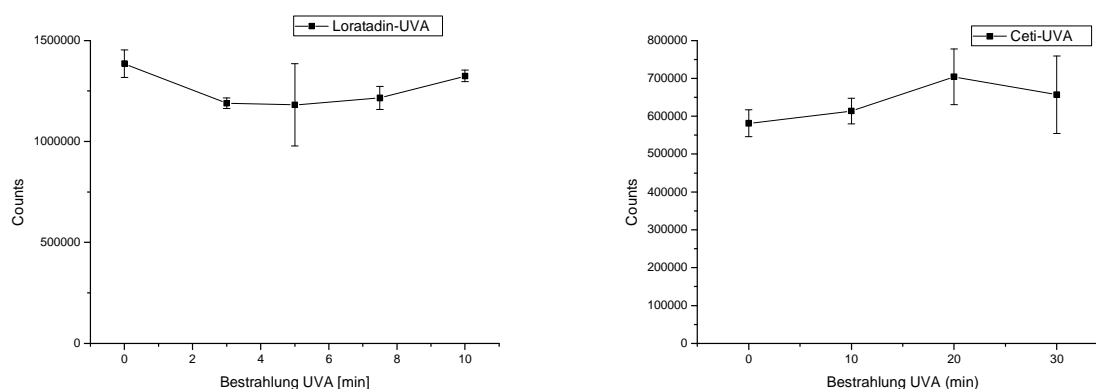


Abbildung 42: Peakflächen von Loratadin und Cetirizin in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht

Ganz anders sieht das photochemische Verhalten der beiden H₁-Antihistaminika unter UVB-Bestrahlung aus. Hier zeigt sich schon nach kurzer Zeit eine starke Photodegradation. Bei beiden Arzneistoffen ist nach 10 Minuten Bestrahlung mit UVB-Licht kaum noch etwas vom ursprünglich injizierten Reinstoff vorhanden.

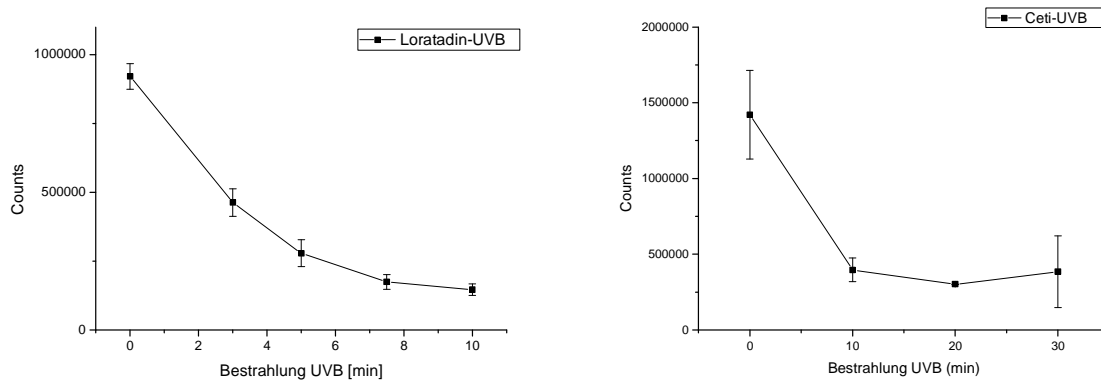


Abbildung 43: Peakflächen von Loratadin und Cetirizin in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVB-Licht

Beide Kinetiken zeigen prinzipiell einen exponentiellen Abbau. Das unterschiedliche Reagieren auf das eingestrahelte UVA- und UVB-Licht lässt sich leicht erklären, wenn man sich die Strukturen der beiden Arzneistoffe anschaut. Beide verfügen über ein kleines chromophores System und absorbieren nur geringfügig Strahlung oberhalb von 300 nm. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass diese Substanzklasse hauptsächlich photosensitive Nebenreaktionen nach dermalen Applikation zeigt, denn Licht im UVB-Bereich kann nicht so tief in die Haut eindringen. UVB-Licht kann nur das Stratum Corneum und obere Schichten der Epidermis erreichen, bevor es durch Proteine oder Aminosäuren wie Tryptophan und Tyrosin absorbiert wird (Anderson and Parrish 1981). Systemisch aufgenommene Arzneistoffe besitzen daher nur eine geringe Chance, UVB-Licht aufzunehmen, es sei denn, sie reichern sich im Stratum Corneum an.

5.2.11 Untersuchung von Allopurinol hinsichtlich seiner Photostabilität

Allopurinol ist ein Arzneistoff, welcher zu der Gruppe der Xanthinoxidase-Inhibitoren gehört. Für Allopurinol werden antioxidative Eigenschaften beschrieben (Moorhouse, Grootveld et al. 1987), aber auch phototoxische Reaktionen beobachtet, die während der Therapie an Patienten auftreten. (Zurcher and Krebs 1970; Mauget-Faysse, Quaranta et al. 2001; Escousse, Jean-Pastor et al. 2002). Dies macht Allopurinol zu einem interessanten Arzneistoff, denn auf

Grund der antioxidativen Eigenschaften kann eine Photoxizität nicht über Singulett-Sauerstoff verlaufen.

5.2.11.1 Chromatographische Bedingungen zur Untersuchung der photochemischen Stabilität von Allopurinol

Als analytisches System wurde der „Ein-Säulen“ Aufbau gewählt. Die chromatographischen Bedingungen sind identisch mit denen, die zur Untersuchung von Loratadin verwendet wurden (5.2.10.2).

5.2.11.2 Ergebnisse zur Photostabilitätsuntersuchung von Allopurinol

Allopurinol wurde jeweils für 0, 5, 10, 20 und 30 Minuten mit UVA- bzw. UVB-Licht bestrahlt, dabei zeigt sich keine wesentliche Signalveränderung (Abbildung 44).

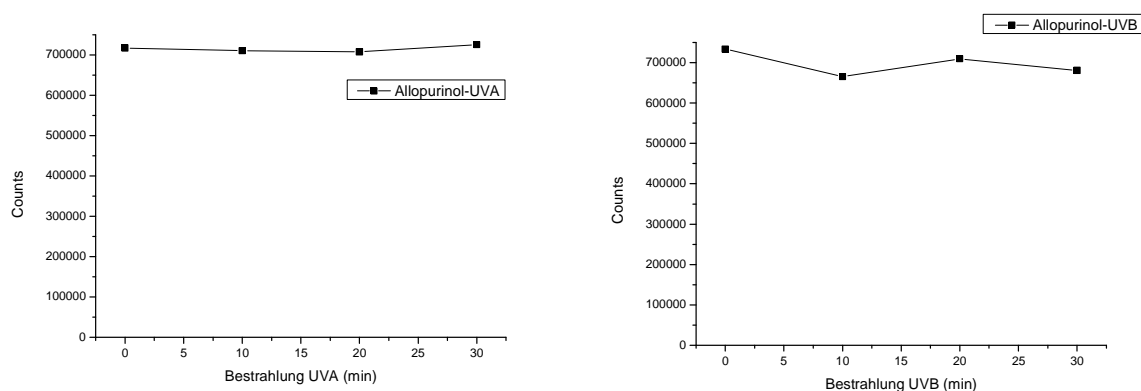


Abbildung 44: Peakflächen von Allopurinol in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA bzw. UVB-Licht

Somit lässt sich aus diesen Experimenten kein direkter Zusammenhang zwischen photochemischem Verhalten und möglicher Phototoxizität zeigen. Allopurinol ist bei den gewählten Bedingungen photostabil. Vargas et al. fand bei einem ähnlichen Versuch einen photolytischen Abbau von Allopurinol unter UVB-Bestrahlung zu Oxypurinol (Vargas, Rivas et al.). Jedoch wurde Allopurinol bei jenem Versuch in einer methanolischen Stofflösung, demnach in einer größeren Stoffmenge als hier eingesetzt bestrahlt. Die photochemische Veränderung soll hierbei durch ein photochemisches gebildetes Hydroxylradikal laufen. Es ist möglich, dass genau diese Bedingungen notwendig sind, um Allopurinol durch Einwirken von UVB-Strahlung zu einer photochemischen Reaktion zu veranlassen. Allerdings ist eine methanolische Lösung

kein gutes Modell zur Darstellung der Verhältnisse in der Haut und deswegen wurde auf eine Untersuchung in Methanol verzichtet, da sie nicht zweckmäßig ist.

5.2.12 Zusammenfassung der Untersuchung der verschiedenen Photo- stabilitäten

Die photochemischen Untersuchungen der verschiedenen Arzneistoffe zeigen, dass bis auf Allopurinol alle untersuchten Substanzen im Wässrigen einer Photodegradation unterliegen. Dabei unterscheiden sich jedoch die Arzneistoffe hinsichtlich der Abbaukinetik. So kann man anhand der unterschiedlichen Steigungen der Kurven die Empfindlichkeit der einzelnen Stoffe gegenüber Licht abschätzen und miteinander vergleichen. Besonders auffällig war dabei Ketoprofen, welches innerhalb von Sekunden zerfällt, während die anderen Arzneistoffe deutlich langsamer reagieren. Im Allgemeinen kann man sagen, dass der Abbau der Arzneistoffe meist nicht linear geschieht. Bei den meisten untersuchten Arzneistoffen ist ein schnellerer Zerfall im UVB-Wellenlängenbereich zu beobachten als im UVA-Bereich. Dies liegt vor allem an den physikalischen Eigenschaften der Moleküle. So absorbieren die meisten untersuchten Arzneistoffe stärker im UVB-Bereich. Ein extremes Beispiel sind hier die untersuchten Antihistaminika Loratadin und Cetirizin. Beide waren unter UVA-Bestrahlung stabil, während sie unter UVB-Bestrahlung einem raschen Abbau unterlagen. Die Diskriminierung zwischen UVA und UVB hat aber vor allem den Hintergrund, dass es wichtig ist, das unterschiedliche Verhalten der Arzneistoffe gegenüber den unterschiedlichen UV-Spektren zu kennen, da das Licht in Abhängigkeit von der Wellenlänge unterschiedlich tief in die Haut eindringen kann. So lässt sich damit z.B. erklären, warum ein Arzneistoff, dermal appliziert, phototoxisch wirken kann, während er systemisch aufgenommen diese unerwünschte Wirkung nicht zeigt.

Die photochemisch aktiven Arzneistoffe verfügen meist über planare Strukturen, sind häufig polycyclisch und verfügen zusätzlich über Heteroatome. Vor allem sind Benzophenonstrukturen sehr reaktiv gegenüber Licht (Boscá and Miranda 1998; Stein and Scheinfeld 2007).

Die Untersuchung der Photostabilität der Arzneistoffe kann nur Hinweise auf ein mögliches phototoxisches Potential geben. Auf der einen Seite zeigt der photochemische Abbau, dass die untersuchte Substanz Licht absorbiert und, ausgehend von einem angeregten Zustand, zerfällt. Damit kann jedoch keine Phototoxizität bewiesen, sondern nur ein Hinweis auf die Reaktivität des Arzneistoffes gegenüber Strahlung gegeben werden. Auf der anderen Seite ist ein nicht vorhandener Zerfall, von Substanzen gegenüber Licht, kein Ausschlusskriterium für Phototoxizität, da über Energie-Transfer z.B. ROS gebildet werden können, oder auch direkt Biomoleküle angegriffen werden können. Es ist jedoch möglich, längerlebige Photoprodukte zu detektieren und deren kinetischen Verlauf zu verfolgen.

5.3 Untersuchung der photochemischen Stabilität mit Hilfe der LC-MS

5.3.1 Einführung

Die Photostabilität von verschiedenen Arzneistoffen wurde bereits mit Hilfe eines HPLC/DAD-Systems im vorherigen Kapitel untersucht und beschrieben. Allerdings kann man mit Hilfe des DADs nur UV/VIS-Spektren aufnehmen und es ist schwer, Rückschlüsse auf die detektierten Strukturen zu ziehen. So sollten die durch den photochemischen Untergang der bestrahlten Arzneistoffe neu gebildeten Photoprodukte mit Hilfe eines MS-Detektors nachgewiesen werden.

Auf Grund dessen wurde der Photoreaktor in ein LC-ESI-TOF System integriert. Hierbei wurde ein Photoreaktor zwischen einem Autoinjektor und einem Säulenofen eingebaut. Auf die Verwendung einer Säule wurde bei den ersten Versuchen verzichtet, da die bestrahlte Probe möglichst schnell zum Detektor gelangen sollte, um auch kurzlebige Produkte zu sehen. Da mit Hilfe des TOFs die einzelnen Massen detektiert werden können, ist eine Separation erst einmal zweitrangig.

Es wurden vorrangig Arzneistoffe ausgesucht, bei denen schon in Kapitel 5.2, mit Hilfe des DADs Photoprodukte gefunden wurden, bzw. bei denen in der Literatur photolytische Abbaureaktionen beschrieben wurden.

5.3.2 Untersuchungsbedingungen

Die Proben konnten diesmal nicht im rein Wässrigen bestrahlt werden, da ein gewisser Anteil an organischem Lösungsmittel erforderlich ist, um eine optimale Aerosolbildung während der Elektronensprayionisation zu gewährleisten, denn der Tröpfchendurchmesser ist unter anderem abhängig vom Lösungsmittel (Viskosität, Leitfähigkeit und Volatilität). Auf Grund dessen fand die Bestrahlung in einer Mischung aus Wasser/Acetonitril (80/20) statt. Dies war auch gleichzeitig das verwendete Fließmittel. Ein weiterer bestimmender Faktor für die Tröpfchengröße ist die Flussrate, so wurde eine Flussrate von 0,5 ml/min gewählt. Auch hier gilt, je höher die Flussrate, desto instabiler ist das Spray. Die Verweildauer im Photoreaktor beträgt deshalb etwa 3,5 Minuten. Alle Untersuchungen wurden im positiven Modus vorgenommen.

5.3.3 Untersuchung der Photostabilität von Ketoprofen mittels MS

In Abbildung 45 und Abbildung 46 sind die erhaltenen MS-Spektren für Ketoprofen mit und ohne Bestrahlung mit UVA-Licht im Photoreaktor wiedergegeben.

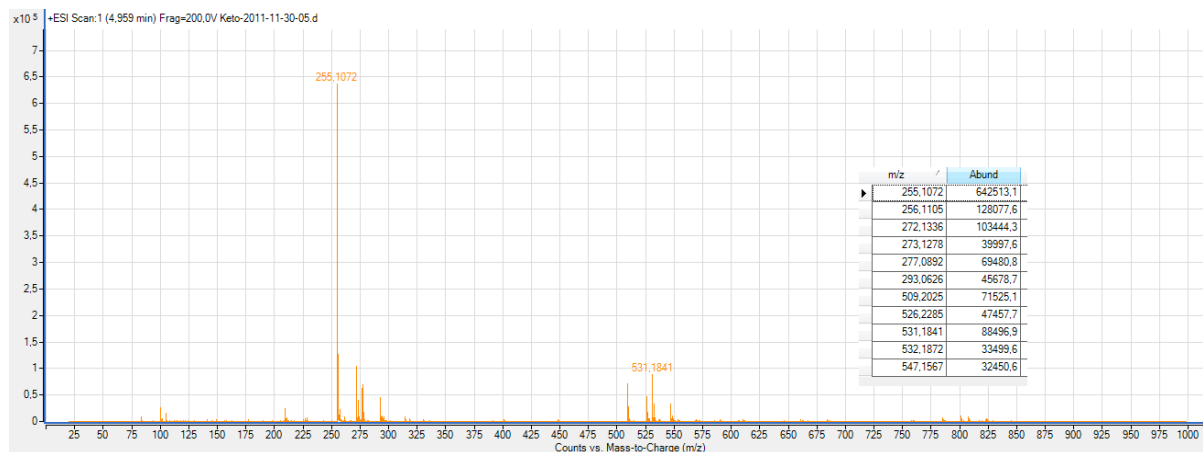


Abbildung 45: Ketoprofen ESI-TOF-Spektrum

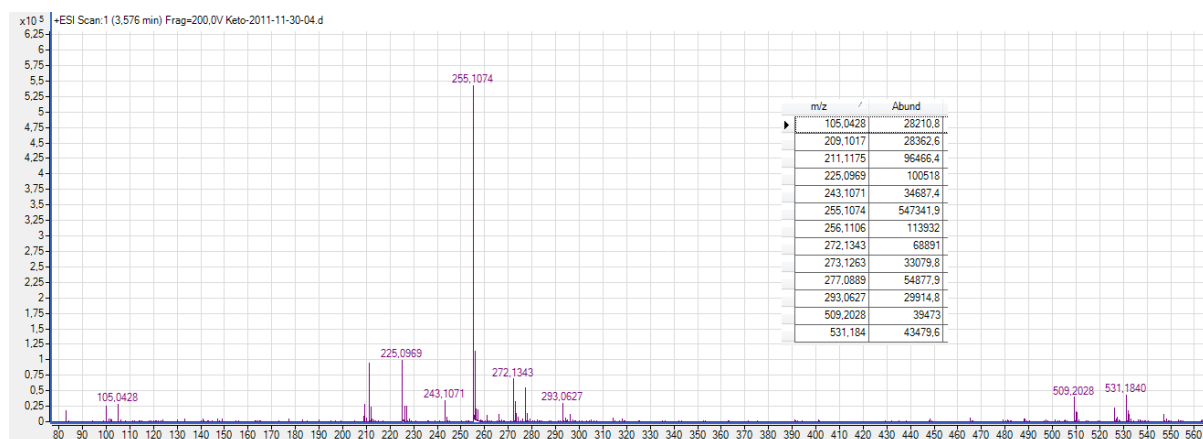


Abbildung 46: ESI-TOF-Spektrum direkt nach 3,5 Minuten UVA online Bestrahlung von Ketoprofen

Auf den ersten Blick sind keine großen Unterschiede bei den beiden Spektren zu erkennen. Dies scheint im Widerspruch mit den gefundenen Ergebnissen in Kapitel 5.2.2.2 zu stehen, denn es wurden dort mehrere Photoabbauprodukte gefunden. Bezieht man jedoch die in der Literatur postulierte Photodegradation (Radschuweit, Rüttinger et al. 2001) von Ketoprofen mit ein (Abbildung 5, Seite 13), so fällt auf, dass die Photoprodukte nur geringe Massenunterschiede zu Ketoprofen zeigen und im erhaltenen Spektrum der bestrahlten Ketoprofen-Probe neue Massenpeaks auftauchten. Dazu zählen gerade auch die Peaks 211 m/z und 209 m/z, die auf eine Decarboxylierung hinweisen und bei der Untersuchung der exakten Masse mittels Analyse Software eine elementare Zusammensetzung von $C_{15}H_{15}O^+$ als einziges Ergebnis liefern. Dies unterstützt die These, dass es zu einer Decarboxylierung von Ketoprofen ge-

kommen ist. Eine Vergleichssubstanz zur vollständigen Bestätigung der These war nicht verfügbar.

Die erhaltenen Peaks bei m/z 531 weisen auf eine Dimerisierung inklusive Natrium Anlagerung hin, dies konnte mit Hilfe der Kalkulation der Elementarzusammensetzung bestätigt werden.

So ist es also möglich, neue Produkte auf diese Art und Weise zu detektieren. Allerdings ist eine Strukturaufklärung schwierig, da alle Substanzen, und damit Massen, nebeneinander auftreten und es auf Grund der schonenden Ionisierung des ESI nur zur geringen Fragmentierung kommt.

5.3.4 Untersuchung der Photostabilität von Naproxen mittels MS

Bei der Online-Bestrahlung von Naproxen mit UVA sind deutliche Veränderungen im erhaltenen MS-Spektrum (Abbildung 48), im Vergleich zu der unbestrahlten Probe (Abbildung 47), zu erkennen. So sind in der bestrahlten Probe z.B. Peaks von kleineren Massen zu finden (Abbildung 49).

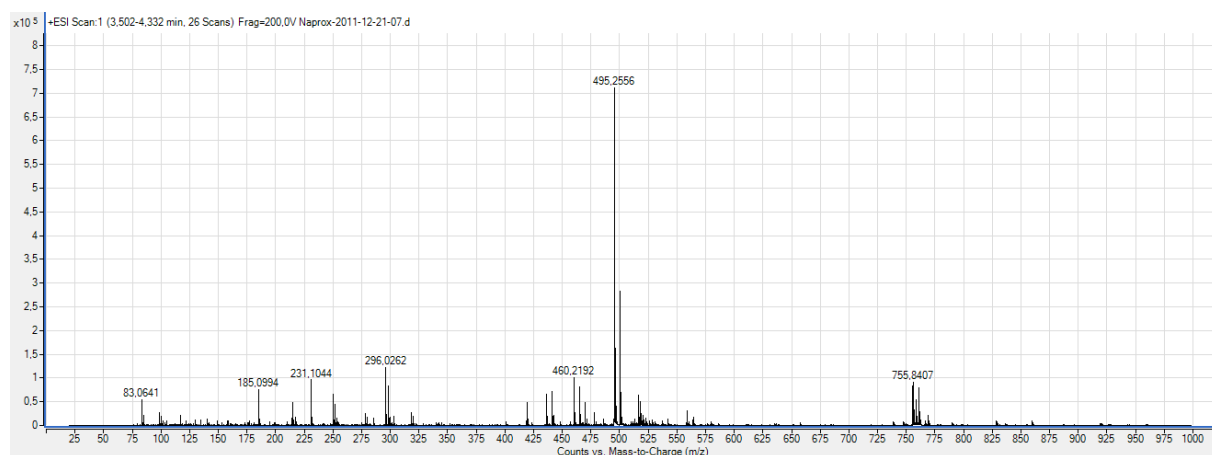


Abbildung 47: Naproxen ESI-TOF-Spektrum

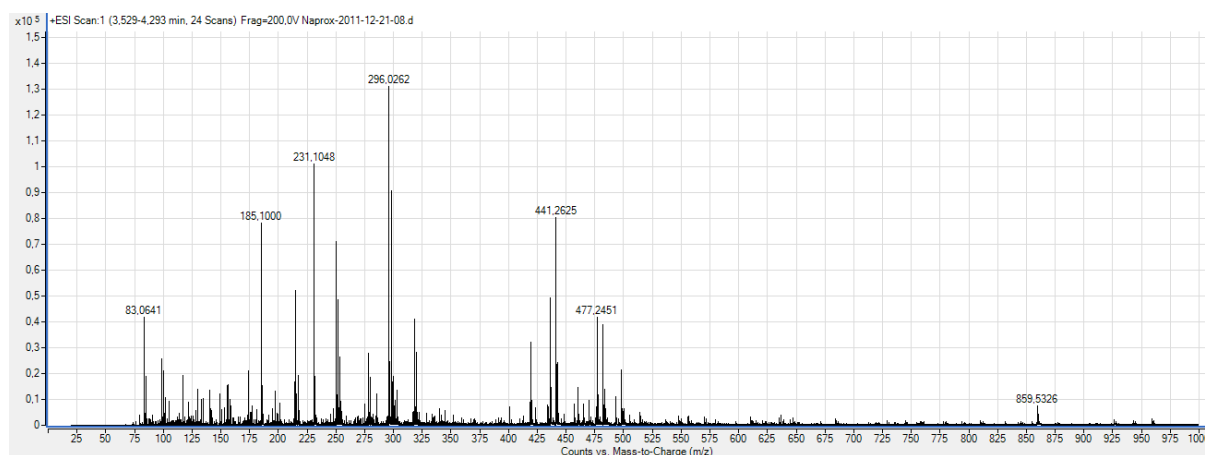


Abbildung 48: ESI-TOF-Spektrum direkt nach 3,5 Minuten UVA online Bestrahlung von Naproxen

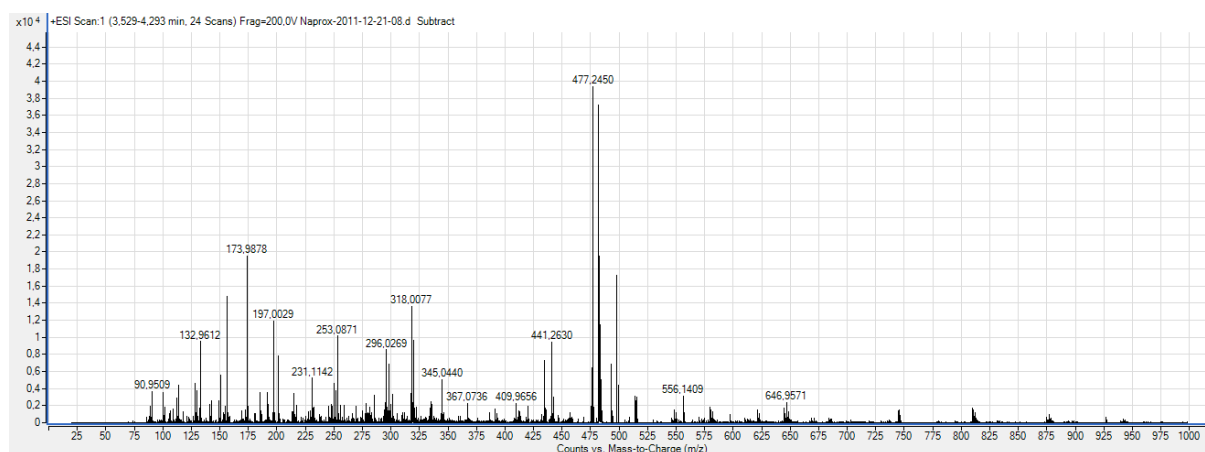


Abbildung 49: modifiziertes ESI-TOF-Spektrum; das erhaltenen Spektrum aus Abbildung 47 wurde von dem ESI-TOF-Spektrum in Abbildung 48 abgezogen

Auffällig ist hier, dass zwar $M+1$ m/z Peaks bei 231 für Naproxen gefunden werden können, jedoch die Masse 496 dominierend ist. Die Analyse des Peaks über eine kalkulierte Elementarzusammensetzung führt zu keiner sinnvoll erscheinenden Summenformel. Versucht man jedoch wieder, die gefundenen Massenpeaks dem Photodegradationsweg von Naproxen zuzuordnen (vergleiche Abbildung 8), so findet man ähnliche Ergebnisse wie beim strukturverwandten Ketoprofen. Es können wieder Massenverluste einer Decarboxylierung gefunden werden, nämlich von 496 m/z auf 441 m/z . Die Massen lassen sich allerdings nicht alle direkt einer Struktur zuweisen.

5.3.5 Untersuchung der Photostabilität von Amiodaron mittels MS

Im MS-Spektrum der unbestrahlten Amiodaron Probe wurde, wie zu erwarten, nur der Molmassenpeak+1 von Amiodaron gefunden (Abbildung 50).

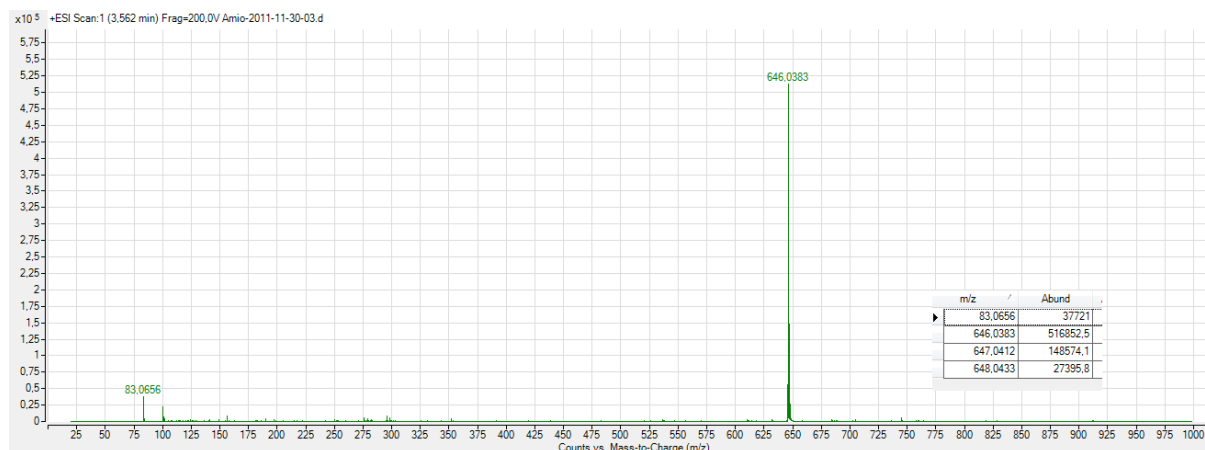


Abbildung 50: Amiodaron ESI-TOF-Spektrum

Das MS-Spektrum der mit UVA-Licht bestrahlten Probe zeigt starke Veränderungen. So kann auf jeden Fall der Verlust eines Iod-Atoms postuliert werden (m/z 520). Dieses einfach deiodierte Amiodaron gilt als Zwischenprodukt des photochemischen Abbaus von Amiodaron. Die Massenpeaks des zweifach deiodierten Amiodarons können nicht gefunden werden. Dies weist auf eine langsame Reaktion gegenüber dem eingestrahlten Licht hin, so zeigten schon die vorherigen Ergebnisse im Kapitel 5.2.4.2, dass Amiodaron langsamer reagiert als zum Beispiel Ketoprofen. Dies sieht man auch daran, dass im Gegensatz zu den vorher untersuchten Stoffen, nach 3,5 Minuten UVA-Bestrahlung der Molmassenpeak des bestrahlten Arzneistoffes dominiert.

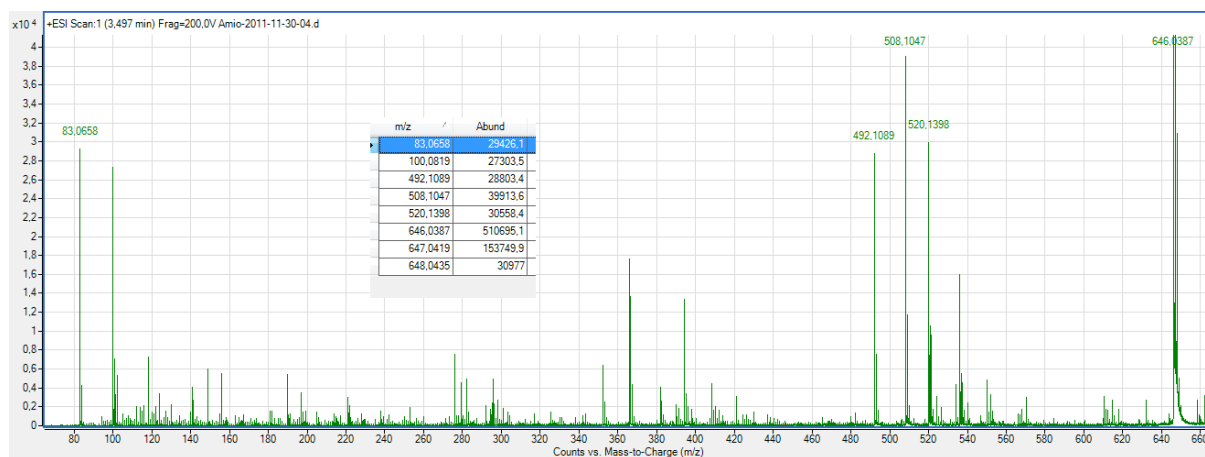


Abbildung 51: ESI-TOF-Spektrum direkt nach 3,5 Minuten UVA online Bestrahlung von Amiodaron

Für die anderen detektierten Massen konnten keine sinnvollen Strukturen mit Hilfe der Auswertung über die Elementarzusammensetzung gefunden werden.

5.3.6 Untersuchung der Photostabilität von Diclofenac mittels MS

Wie schon bei den vorher untersuchten NSAIDs der Phenylpropionsäure-Abkömmlinge zeigt auch Diclofenac eine Veränderung des MS-Spektrums nach der Bestrahlung mit UVA-Licht. Wie man in Abbildung 53 erkennen kann, können neue m/z -Peaks nach der Bestrahlung der Probe detektiert werden. Bei der photochemischen Untersuchung von Diclofenac in Kapitel 5.2.5 konnte mit Hilfe des UV/VIS Spektrums 8-Chloro-9H-Carbazol-1yl-Essigsäure als ein Photoprodukt identifiziert werden. Der $M+1$ Peak dieses Photoproduktes konnte nicht gefunden werden. Dies schließt allerdings nicht aus, dass es gebildet wurde. Denn die gewählten Parameter müssen nicht zwingend zur Ionisation des Moleküls führen.

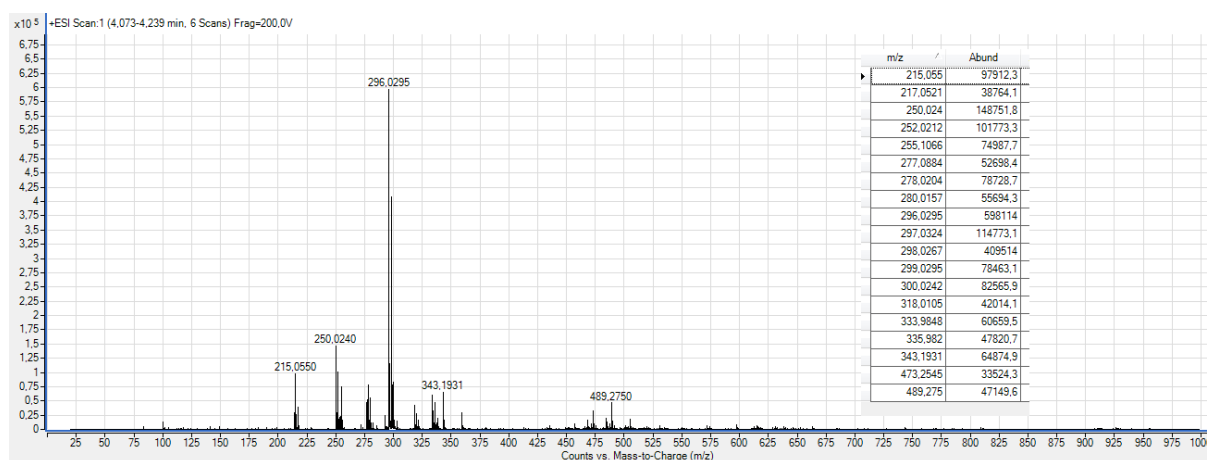


Abbildung 52: Diclofenac ESI-TOF-Spektrum

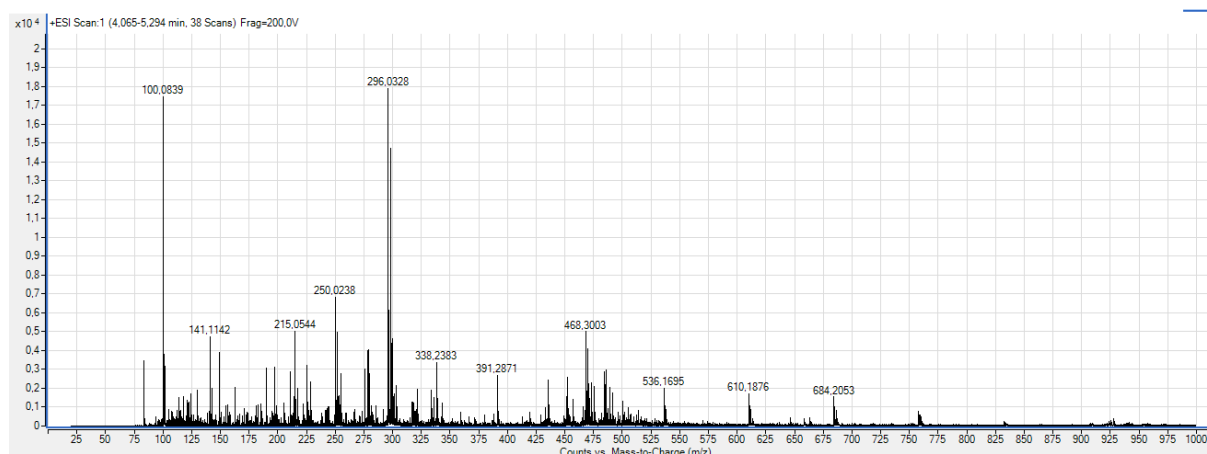


Abbildung 53: ESI-TOF-Spektrum direkt nach 3,5 Minuten UVA online Bestrahlung von Diclofenac

In Abbildung 54 sind die gefundenen m/z Peaks dargestellt, die nicht im Spektrum des unbestrahlten Diclofenacs vorhanden sind. Auch hier wurden die m/z Peaks wieder mittels Software auf die mögliche Elementarzusammensetzung der dahinterstehenden Fragmente ausgewertet. Jedoch konnte wieder keine der kalkulierten Summenformeln einem in der Literatur postulierten Photoprodukt von Diclofenac zugewiesen werden.

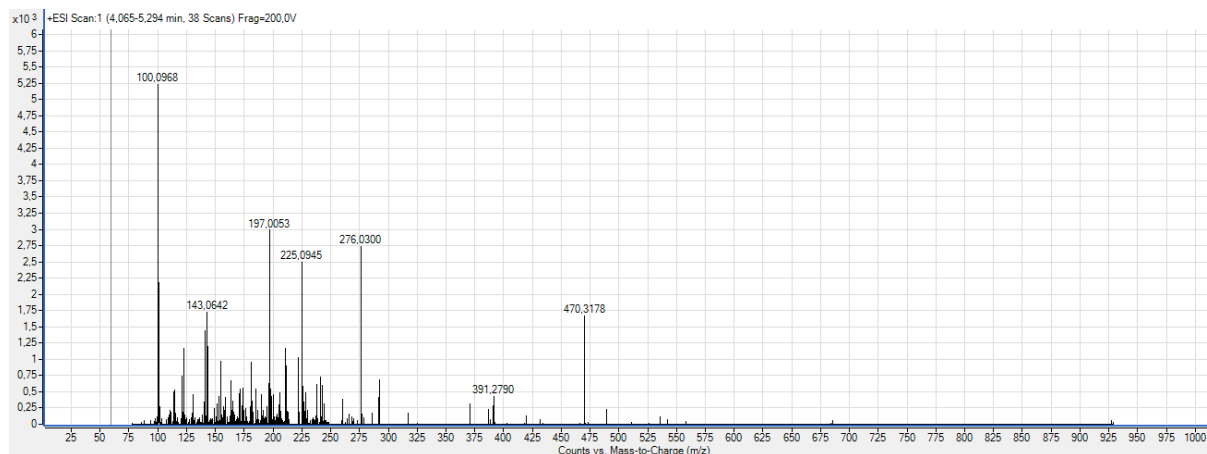


Abbildung 54: modifiziertes ESI-TOF-Spektrum; das erhaltene Spektrum aus Abbildung 52 wurde von dem ESI-TOF-Spektrum in Abbildung 53 abgezogen

5.3.7 Untersuchung der Photostabilität von Furosemid mittels MS

Für Furosemid konnte im positiven Modus kein $M+1$ Peak bei 331 m/z gefunden werden, stattdessen wurde ein Peak bei 311 m/z detektiert. Dies deutet auf eine Fragmentierung von Furosemid, selbst beim schonenden ESI-Verfahren, hin.

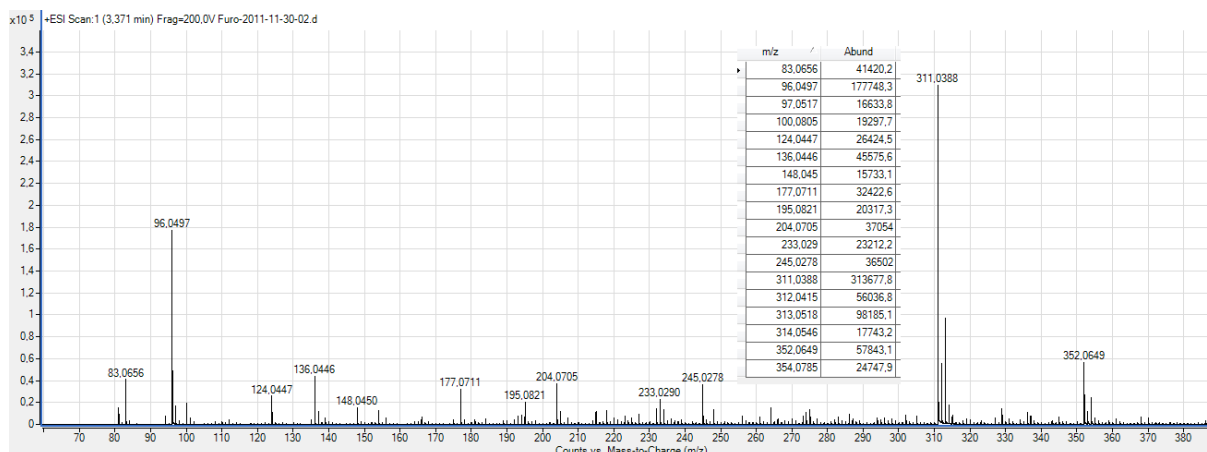


Abbildung 55: Furosemid ESI-TOF-Spektrum

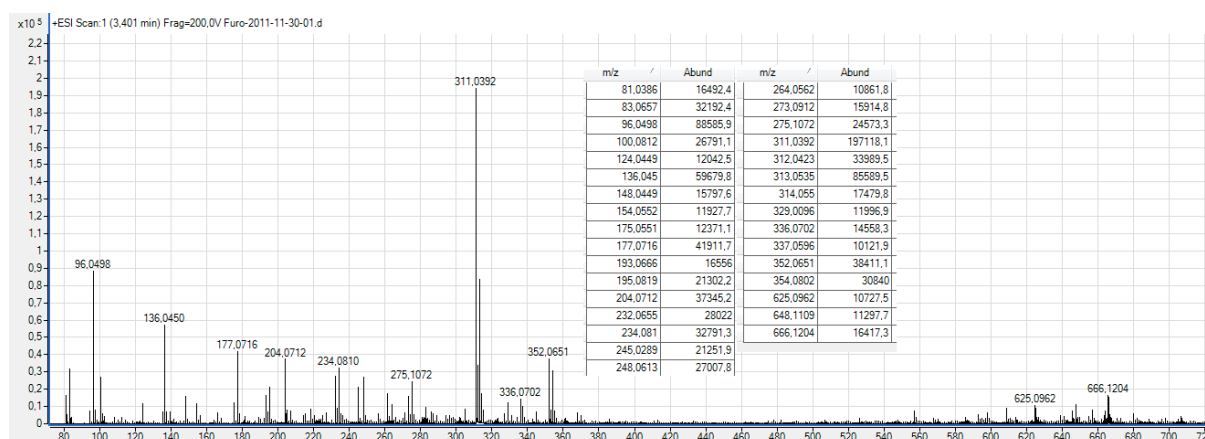


Abbildung 56: ESI-TOF-Spektrum direkt nach 3,5 Minuten UVA online Bestrahlung von Furosemid

Wenn man die erhaltenen Spektren für eine bestrahlte und unbestrahlte Probe von Furosemid, dargestellt in Abbildung 55 und Abbildung 56, vergleicht, so kann man auch hier eine Photodegradation von Furosemid erkennen. So weist der neu erhaltene m/z Peak bei 275 auf einen Chlorverlust, ausgehend vom 311 m/z Peak, hin. Wenn man dies wiederum mit dem in der Literatur beschriebenen Photodegradationsweg von Furosemid vergleicht (Abbildung 7, Seite 16), so findet man auch dort Parallelen. So wird in der Literatur eine Dechlorierung von Furosemid zu 2-((furan-2-ylmethyl)amino)-5-Sulfamoylbenzoesäure beschrieben, welches ein mögliches Photoprodukt von Furosemid ist. Auf Grund der fehlenden Referenzsubstanz kann kein Vergleichsspektrum zur Verifizierung herangezogen werden. Die anderen neu gebildeten Massen wurden ebenfalls mittels Software auf ihre mögliche Elementarkomposition untersucht. Es konnten hier jedoch keine zuordenbaren Summenformeln gefunden werden.

5.3.8 Untersuchung der Photostabilität von Nifedipin mittels MS

Bei der photochemischen Untersuchung von Nifedipin mit Hilfe des UVA-Strahlers konnte eine Veränderung, nach einer Bestrahlungsdauer von ca. 3,5 Minuten, festgestellt werden. In Abbildung 57 ist das erhaltene Spektrum der unbestrahlten Nifedipinprobe dargestellt. Der $M+1$ Peak für Nifedipin bei 347 m/z ist gut zu erkennen.

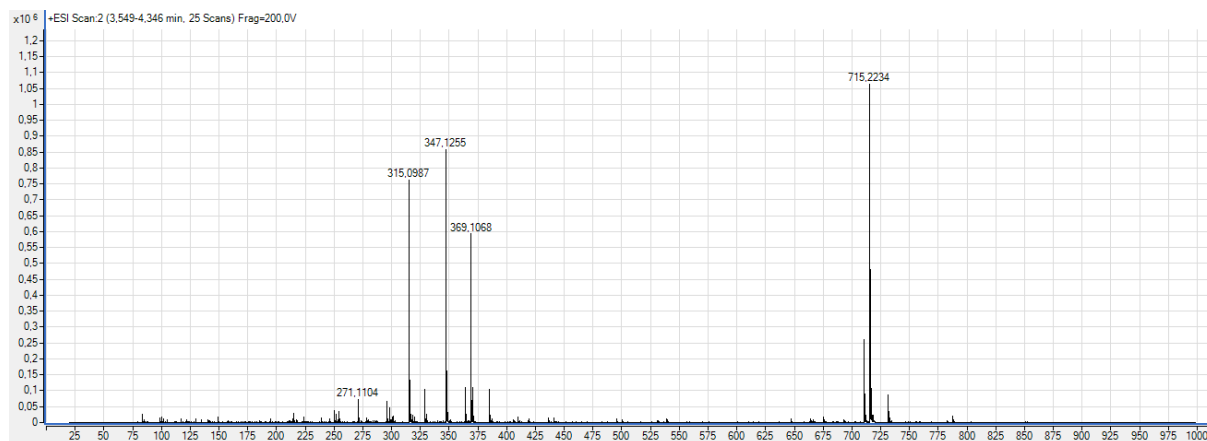


Abbildung 57: Nifedipin ESI-TOF-Spektrum

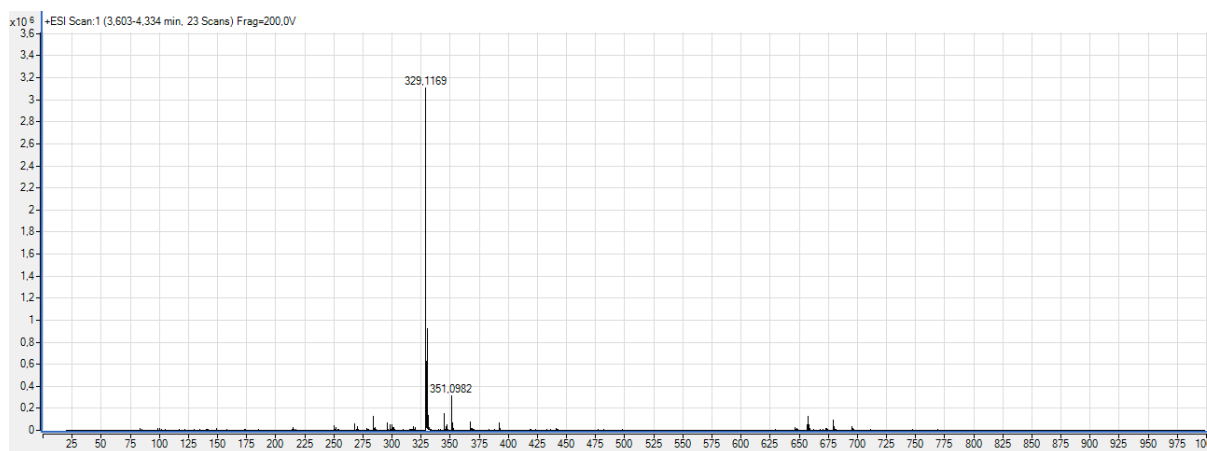


Abbildung 58: Nifedipin ESI-TOF-Spektrum direkt nach 3,5 Minuten UVA online Bestrahlung

Nach der Bestrahlung ist keiner der ursprünglichen Massenpeaks mehr vorhanden. Wie man an Hand der Abbildung 58 erkennt, wurde der lichtempfindliche Arzneistoff Nifedipin komplett umgesetzt. Sehr wahrscheinlich handelt es sich bei diesem detektierten Stoff um das Photoprodukt Dimethyl 2,6-dimethyl-4-(2-nitrosophenyl)pyridine-3,5-dicarboxylat (Abbildung 59), das erhaltene m/z Verhältnis kann, mittels Software, der Summenformel des Photoproduktes zugeordnet werden. Eine eindeutige Bestätigung konnte, mangels Referenzsubstanz, nicht erfolgen. Dieses Photoprodukt ist therapeutisch unwirksam. Es wird durch eine intramolekulare Redoxreaktion und Wasserabspaltung gebildet. Diese Reaktion verläuft über mehrere Zwischenschritte, bei denen intermediär Radikale gebildet werden, wie es auch in Kapitel 5.4.4 für Nifedipin gezeigt werden konnte (Görlitzer, Dobberkau et al. 1996).

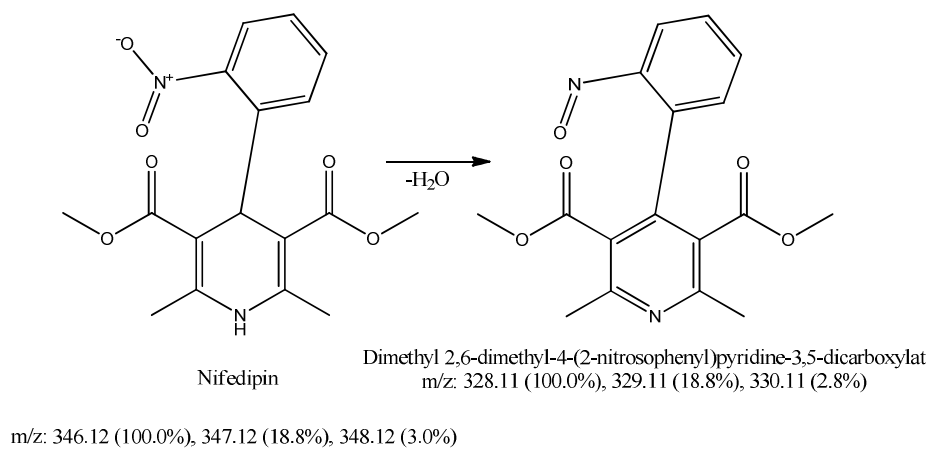


Abbildung 59: Lichtinduzierte intramolekulare Redoxreaktion von Nifedipin

5.3.9 Untersuchung der Photostabilität von Chlorpromazin mittels MS

Bei der Untersuchung von Chlorpromazin (CPZ) wurde der Fluss der Pumpe um die Hälfte reduziert, so dass die Verweil-, und damit die Bestrahlungsdauer im Reaktor auf sechs Minuten verlängert werden konnte. In Abbildung 60 ist das Spektrum der unbestrahlten CPZ-Probe dargestellt. Neben den M+1 Peak für CPZ bei 319m/z sind keine anderen aussagekräftigen Peaks zu erkennen.

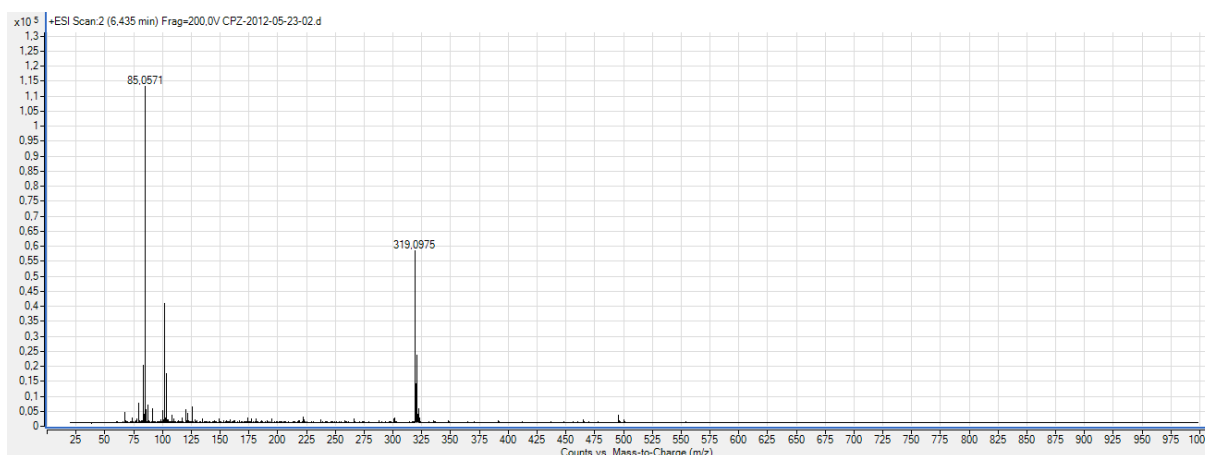


Abbildung 60: Chlorpromazin ESI-TOF-Spektrum

Im erhaltenen Spektrum, nach Bestrahlung der CPZ-Probe mit UVA-Licht im Photoreaktor, findet man, statt des 319 m/z Peaks, einen dominanten Peak bei 317 m/z wieder. Dies weist auf eine Wasserstoffabspaltung vom Chlorpromazinmolekül hin. Eine Radikalbildung durch Licht von CPZ konnte schon mit Hilfe der ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden (5.4.3). An Hand des m/z-Peaks bei 333 und der Auswertung der möglichen elementaren Zusammensetzung, kann die Bildung eines Sulfoxid des Chlorpromazin als Photoprodukt postuliert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass man mit der eingesetzten Messtechnik auch bei CPZ einige in der Literatur beschriebenen Photoprodukte zuweisen kann, jedoch fehlt auch hier eine Verifizierung mangels Referenzsubstanzen.

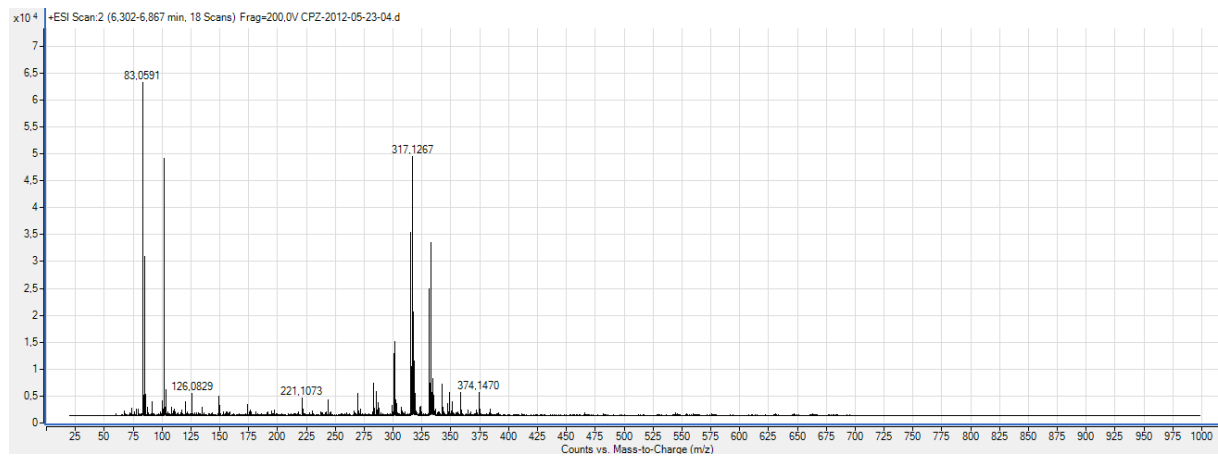


Abbildung 61: Chlorpromazin ESI-TOF-Spektrum direkt nach 6 Minuten UVA online Bestrahlung

5.3.10 Zusammenfassung der Untersuchungen der photochemischen Stabilität mit Hilfe der LC-MS

Mit der entwickelten Methode ist es möglich, direkt nach der Bestrahlung die entstandenen Produkte teilweise mit Hilfe vorhandener Literatur und der Auswertung der Massen über kalkulierten Elementarzusammensetzungen zu identifizieren und Hinweise auf die Abbauewege der untersuchten lichtempfindlichen Stoffe zu bekommen. Allerdings ist dies mit dem eingesetzten Detektor TOF nur eingeschränkt möglich. Das liegt daran, dass es bei dem eingesetzten ESI-TOF-Verfahren nur zu geringer Fragmentierung der Substanzen kommt und kein MS-MS möglich ist, um eine bessere Strukturaufklärung zu betreiben. Außerdem kann nur schwer differenziert werden, ob es sich bei den gefundenen Massenpeaks um die Molmassenpeaks+1 der photolytischen Abbauprodukte handelt oder um Addukte dieser, da im Gegensatz zu MS-MS keine Masse isoliert werden kann. Die entstandenen Photoprodukte wurden bewusst nicht aufgetrennt, um eine zeitnahe Analyse nach dem Bestrahlen zu gewährleisten und damit auch kurzlebige Photoprodukte mit zu erfassen. Dies ist mit dem eingesetzten Aufbau auch gelungen.

Die Messungen wurden alle im positiven Modus und bei gleichen Ionisationsbedingungen durchgeführt, um eine universelle Methode zu entwickeln. Die Ergebnisse zeigen, dass es auch bei den hier betrachteten Untersuchungen möglich ist, sinnvolle Ergebnisse zu erzielen. Es ist jedoch sicher möglich, die Bedingungen zu optimieren, wenn eine bestimmte Substanz untersucht werden soll, da man durch den Wechsel in den negativen Modus zu aussagekräftigeren Ergebnissen kommen kann.

5.4 Untersuchung zur Photochemischen Stabilität mit Hilfe der ESR

5.4.1 Einführung

Die Elektronen Spinresonanz Spektroskopie (ESR) ermöglicht eine Aussage über das Vorhandensein von paramagnetischen Zentren. Auf Grund der niedrigen minimal nachweisbaren Konzentration von paramagnetischen Zentren von ca. 10^{-9} M ist die ESR besonders geeignet, auch schon kleinste Änderungen im System hinsichtlich der Bildung von ungepaarten Elektronen zu detektieren. Wie in Abbildung 62 schematisch dargestellt, wurden die Proben direkt im Resonator von einer Lichtquelle bestrahlt, so dass es möglich war, in situ die Änderung des Systems auf Grund der Anregung von Licht direkt zu erfassen. Es kann auf Spin-Sonden verzichtet werden. Dies hat den großen Vorteil, dass neben den durch Licht induzierten Reaktionen keine anderen Reaktionen ablaufen.

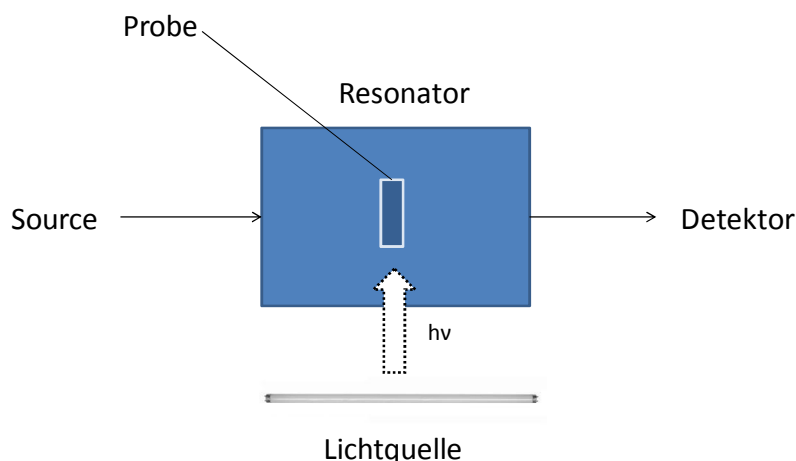


Abbildung 62: Schema zum Aufbau des ESR Versuches

Es wurden die Arzneistoffe Allopurinol, Amiodaron, Chlorpromazin, Doxycyclin, Furosemid, Nifedipin und Simvastatin untersucht. Sie alle gelten als phototoxisch oder photoallergen, bzw. sind photosensitive Reaktionen nach Arzneistoffgabe als Fallbeispiele bekannt. (Gould, Mercurio et al. 1995; Granados, Torre et al. 1998; Svensson, Cowen et al. 2001). Ein weiteres Auswahlkriterium war die Einbeziehung möglichst vieler verschiedener Arzneistoffklassen.

5.4.2 Untersuchung der paramagnetischen Eigenschaften von Allopurinol

Obwohl Allopurinol und sein Hauptmetabolit Oxypurinol antioxidative Eigenschaften besitzen und es verschiedene Untersuchungen zu den Radikalfängereigenschaften von Allopurinol in beschädigten Geweben gibt (Moorhouse, Grootveld et al. 1987; Viña, Gimeno et al. 2000), wird dennoch ein phototoxischer Effekt für Allopurinol in der Literatur postuliert.

Auf Grund dessen wurde Allopurinol auf die Bildung von Radikalen unter UVB Bestrahlung

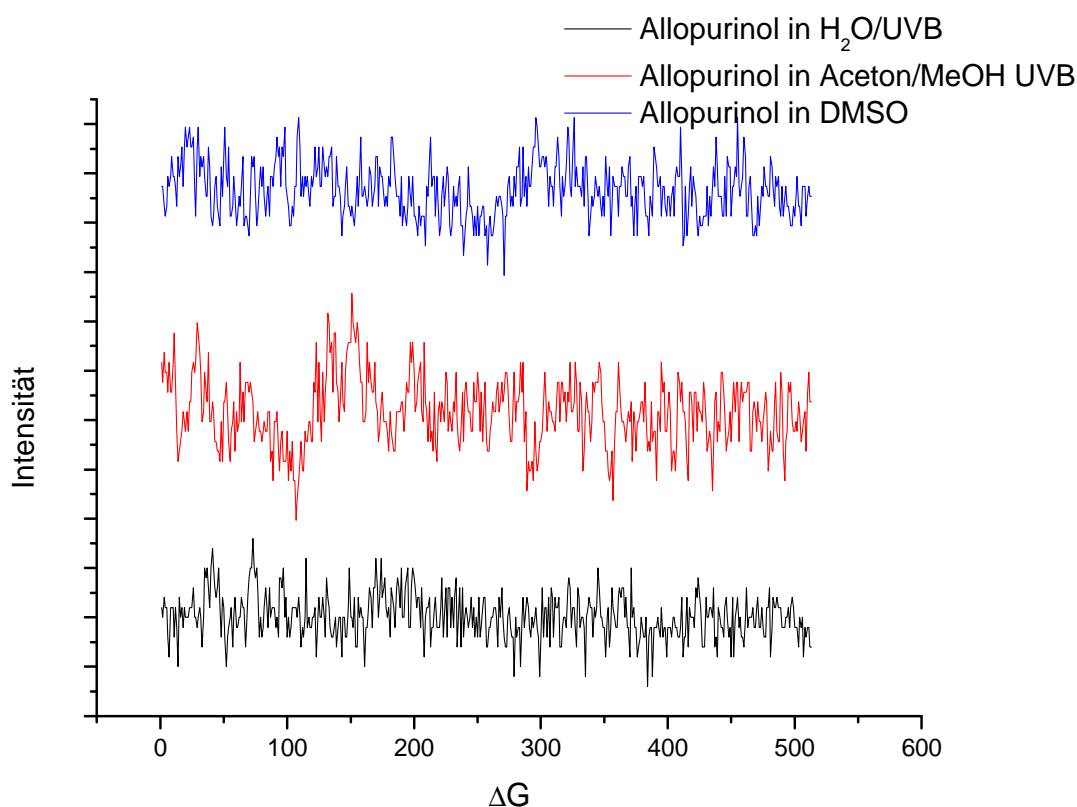


Abbildung 63: Allopurinol ESR-Spektren-Aufnahmen unter UVB-Bestrahlung

in unterschiedlichen Lösungsmitteln untersucht. Dazu wurde Allopurinol in Wasser, Methanol und einer Wasser/DMSO Mischung (1:1) gelöst und im ESR-Spektrometer vermessen. Zuerst wurde jeweils ein Spektrum der jeweiligen Probe aufgenommen. Im Anschluss wurden die verschiedenen Proben direkt in situ über zehn Minuten bestrahlt und jede Minute ein neues Spektrum aufgenommen. Jedoch kam es in keinem der eingesetzten Lösungsmittel in der Zeit zu einer Radikalbildung, siehe Abbildung 63.

In der Literatur wird beschrieben, dass man in vitro eine Photoinstabilität und Phototoxizität nur unter UVB, nicht aber unter UVA-Licht findet (Vargas, Rivas et al.). Dies lässt sich da-

durch erklären, dass Allopurinol auf Grund seiner Struktur hauptsächlich Licht im UVB-Bereich absorbiert und nicht im UVA-Bereich. Trotzdem wurde als Kontrolle eine wässrige Probe mit UVA-Licht bestrahlt. Auch hier konnte keine Radikalbildung beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigen also, dass Allopurinol allein unter UVA- oder UVB-Bestrahlung in den hier verwendeten Lösungsmitteln keine Radikale bildet. Sollte der phototoxische Effekt von Allopurinol über Radikalbildung erfolgen, müssen also noch andere Reaktanden beteiligt sein.

5.4.3 Untersuchung der paramagnetischen Eigenschaften von Chlorpromazin

Chlorpromazin gehört zu der Gruppe der Phenothiazide, welche dafür bekannt sind, dass sie sehr photoinstabil sind. In Gegenwart von Licht oder Oxidationsmittel bildet Chlorpromazin, wie die meisten chlorierten Phenothiazide Radikale (Gocke 1996; MASTI, SEETHARAMAPPA et al. 2002). Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass Chlorpromazin sowohl phototoxisch wirkt als auch photoallergische Reaktionen in der Haut auslöst (Epstein 1968).

In der Literatur wird beschrieben, dass es nach Bestrahlung mit Licht zu einer Eliminierung eines Elektrons und damit zur Radikalbildung kommen kann. Die Bestrahlung mit Licht im UVA-Bereich führt zu einer Chlorabspaltung und es bildet sich ein Promazyldradikal. Der photochemische Abbau von Chlorpromazin wurde im Kapitel 4.3.1 beschrieben.

Die Bestrahlung des Chlorpromazins erfolgte in wässriger Lösung mit Hilfe einer UVA-Lichtquelle. Bei der kontinuierlichen Bestrahlung mit UVA-Licht über 10 Minuten ist bereits nach einer Minute eine Radikalbildung zu erkennen. Die maximale Radikalkonzentration wird während der ersten und zweiten Minute nach Beginn der Bestrahlung erreicht. Nach drei Minuten überwiegt der Abbau des Radikals bereits seiner Neubildung, wie man gut in Abbildung 64 erkennen kann. Chlorpromazin bildet im Wässrigen also sehr schnell Radikale, die ein intermediäres Produkt darstellen, da die Peaks nach drei Minuten wieder kleiner werden. Auch wenn der Abfall der Kurve näherungsweise linear ist, darf man nicht von einer Kinetik 0. Ordnung ausgehen, da es sich um eine Mischkinetik handelt. Es werden neue Radikale gebildet, während diese weiterreagieren. Nach Cheng et al. verläuft die Radikalhydrolyse nach einer Kinetik 2. Ordnung ab. Ebenfalls ist die Radikalgenerierung endlich, da sich das Chlorpromazin verbraucht. Ab der fünften Minute scheint sich ein steady state innerhalb der Probe eingestellt zu haben, was Radikalneubildung und -abbau betrifft.

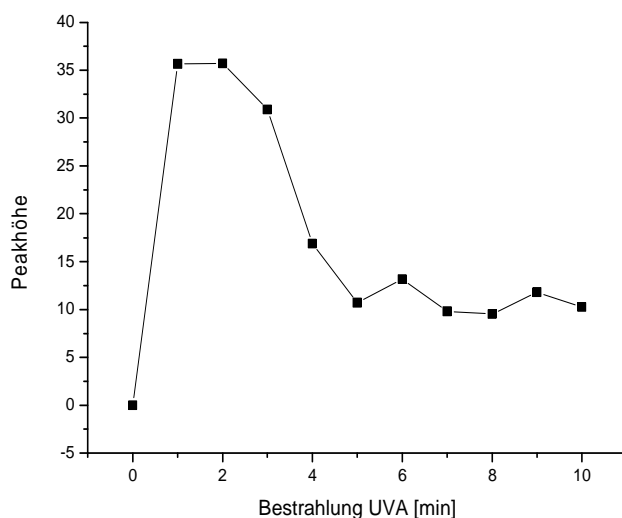


Abbildung 64: Radikalbildung durch Bestrahlung von Chlorpromazin mit Licht im UVA-Bereich

In einem weiteren Versuch wurde eine wässrige Chlorpromazin-Lösung drei Minuten lang mit UVA-Licht bestrahlt und anschließend vor Lichteinstrahlung geschützt. In Abbildung 65 kann man gut erkennen, dass das Radikal sofort mit Beginn der Bestrahlung gebildet wird. Jedoch besitzt das Radikal keine lange Lebenszeit, so dass schon zwei Minuten nach Ende der Bestrahlung keine Peaks mehr im ESR-Spektrum zu sehen sind. An Hand dieser Daten kann man erkennen, dass das gebildete Radikal eine Lebensdauer von 1-2 Minuten hat. Bei der hier gebildeten Radikalspezies könnte es sich um ein Promazyl-Radikal handeln, welches zu Promazin oder Promazinpolymeren weiterreagiert. Genauso kann das Promazyl-Radikal, anstatt Dimere oder Polymere zu bilden, auch mit anderen Molekülen kovalente Bindungen eingehen. Es reagiert zum Beispiel *in vitro* leicht mit Guanosinmonophosphat und kann somit leicht zu DNA-Schäden führen (Ciulla, Epling et al. 1986).

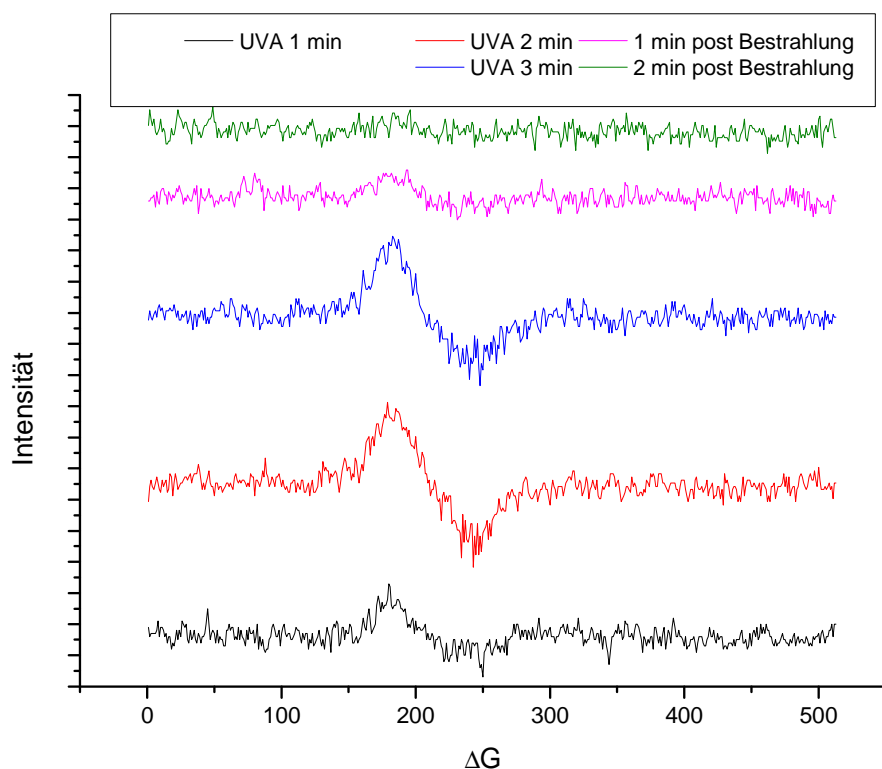


Abbildung 65: Chlorpromazin-Spektren während und nach der Bestrahlung mit UVA

Bei der Untersuchung von Chlorpromazin zeigt sich klar der Vorteil des Versuchsaufbaus. Dadurch, dass die Spektren simultan mit der Bestrahlung aufgenommen werden können und keine Spin-Sonden eingesetzt werden, kann die Kinetik der photochemischen Radikalbildung beobachtet werden und auch kurzlebige Radikale entziehen sich nicht der Detektion, wenn sie die Nachweisgrenze überschreiten.

5.4.4 Untersuchung der paramagnetischen Eigenschaften von Nifedipin

Nifedipin wurde auf Grund seiner schlechten Löslichkeit in Wasser in DMSO gelöst und anschließend kontinuierlich mit einer UVA Lichtquelle bestrahlt. Wie man in Abbildung 66 sehen kann, kommt es dabei zu einer Radikalbildung. Das erhaltene Spektrum zeigt, dass sich das gebildete Radikal am Stickstoff befindet, denn ein Stickstoffatom besitzt ein magnetisches Moment (Kernspin $I \neq 1$) und es kommt zur Wechselwirkung zwischen dem ungepaarten Elektron und dem Kern. Dies führt dazu, dass sich die Energieniveaus, in Abhängigkeit von der Kernquantenzahl aufspalten. Bei einem Stickstoffradikal führt das, wie hier zu erkennen

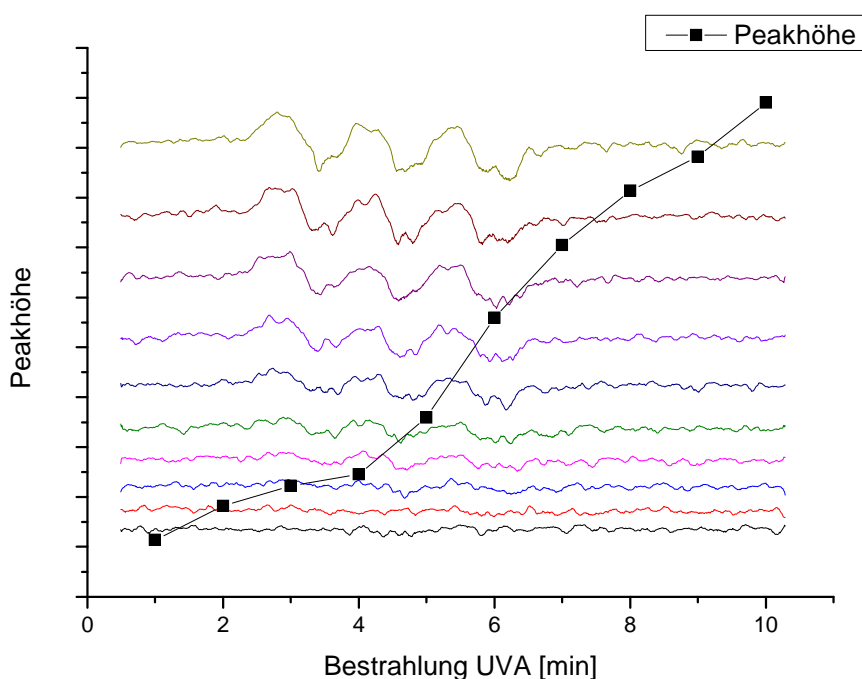


Abbildung 66: Nifedipin Spektren während der kontinuierlichen Bestrahlung mit UVA (ein Spektrum/Minute) inklusive graphische Darstellung des Peakhöhenverlaufs

(Abbildung 66), zu einem symmetrischen Spektrum aus drei Linien, also drei Übergängen.

Bei dem hier detektierten Stickstoff-Radikal handelt sich um ein Nitroxylradikal, welches typischerweise von Nifedipin unter UV-Bestrahlung gebildet wird (Staško, Brezová et al. 1994). An Hand des Kurvenverlaufs der Peakhöhe kann man erkennen, dass sich das Radikal

im Verlauf der 10 Minuten anreicht und im Gegensatz zu den Untersuchungen mit Chlorpromazin nicht so schnell weiterreagiert bzw. eine längere Lebensdauer hat.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurde eine weitere Probe wie folgt behandelt. Zuerst wurden ESR-Spektren über 2 min unter Ausschluss von Licht aufgenommen. Im Anschluss wurde die Probe drei Minuten mit UVA-Licht bestrahlt und anschließend wieder vor Licht geschützt. In Abbildung 67 kann man erkennen, dass unter Belichtung der Probe sofort die Radikalbildung einsetzt, jedoch ist nach Aussetzen der Bestrahlung noch ein kurzer Anstieg der Radikalkonzentration zu erkennen, auch wenn dieser deutlich geringer ist als unter der Belichtung. Vier Minuten nach Beendigung der Belichtung sinkt die Radikalkonzentration abrupt ab, das Ende der Lebenszeit scheint erreicht zu sein.

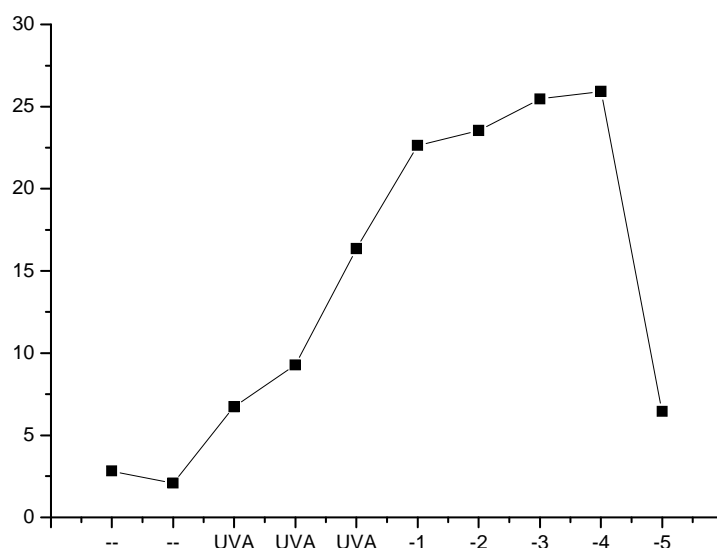


Abbildung 67: Nifedipin Kinetik

5.4.5 Untersuchung der paramagnetischen Eigenschaften von Amiodaron

Zur Untersuchung der photochemischen Radikalbildung von Amiodaron wurde es jeweils in DMSO und in einer Mischung Wasser/DMSO (1:1) gelöst. Die Lösungen wurden jeweils kontinuierlich zehn Minuten in situ mit UVA-Licht bestrahlt und gleichzeitig mit Hilfe der ESR-Spektroskopie analysiert. Dabei konnte keine Bildung eines paramagnetischen Elektrons beobachtet werden (Abbildung 68).

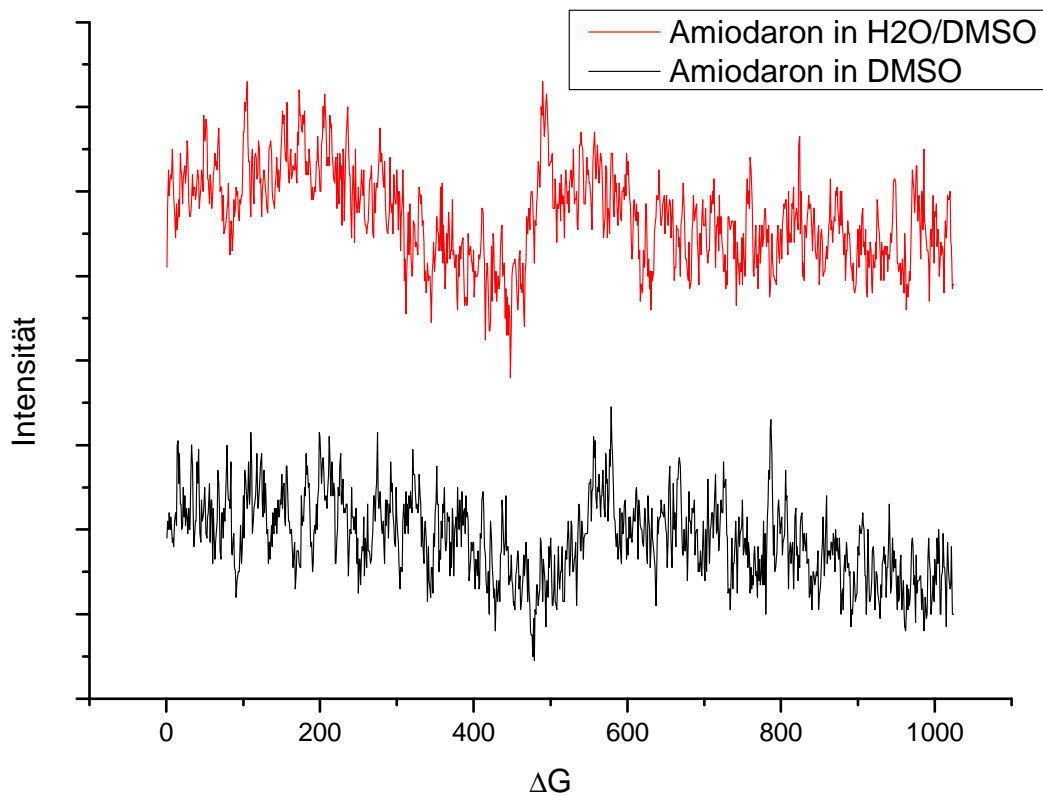
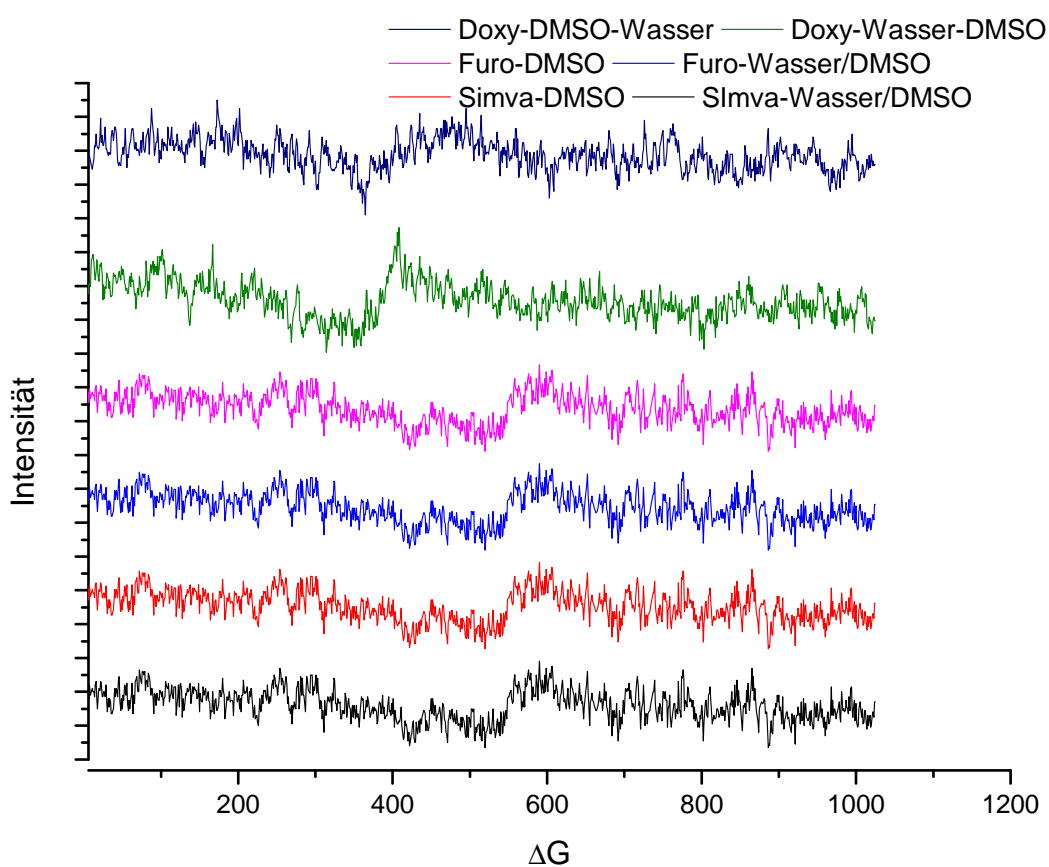


Abbildung 68: Dargestellt sind die über 10 Minuten aufsummierten Amiodaronspektren während der UVA Bestrahlung

Dies steht im Widerspruch zu der in der Literatur beschriebenen Bildung eines Arylradikals durch Deiodierung von Amiodaron, welche ebenfalls mit Hilfe der ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden konnte. Allerdings erfolgten die beschriebenen ESR-Untersuchungen erst nach der Bestrahlung von Amiodaron und jeweils mit Anwesenheit der Spinsonde 5,5-Dimethylpyrrolidin-N-oxid (DMPO) (Li and Chignell 1987; Boscá and Miranda 1998; Nicolescu, Comeau et al. 2007). Eine mögliche Ursache für das Ausbleiben der Arylradikalbildung könnte eine zu geringe Strahlungsintensität der Lichtquelle sein, so dass die zugeführte Energie nicht ausreichte, um eine Deiodierung von Amiodaron auszulösen. Auch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass durch den Einsatz von DMPO stabilere langlebige Radikale gebildet werden und damit eine andere Nachweisgrenze gesetzt wird.

5.4.6 Untersuchung der paramagnetischen Eigenschaften von Doxycyclin, Furosemid und Simvastatin

Doxycyclin, Simvastatin und Furosemid wurden ebenfalls je einmal in Wasser/DMSO (1:1) und einmal in DMSO gelöst und anschließend über 10 min mit UVA-Licht bestrahlt. Bei keiner der drei Substanzen konnte während der Bestrahlung eine Radikalbildung mit Hilfe der ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden, dies steht im Einklang mit den in der Literatur vorgefundenen Ergebnissen. Die Substanzen dienen als Negativ-Kontrolle, da sie sowohl unterschiedliche chemische Strukturen als auch unterschiedliche photochemische Eigenschaften repräsentieren.



5.4.7 Zusammenfassung

Die Untersuchungen zeigen, dass es möglich ist, die lichtinduzierte Radikalbildung direkt in situ mittels der ESR-Spektroskopie zu erfassen und zu verfolgen. Damit ist es möglich, eine potentielle Zellzerstörung über Bildung von Radikalen vorherzusagen (vergleiche Abbildung 2).

Nifedipin und Chlorpromazin zeigten die zu erwartenden Radikalbildungen, unterschieden sich aber in der Radikalbildungszeit wie auch in der Lebenszeit der gebildeten Radikale. Während Chlorpromazin schnell Radikale mit kurzer Lebensdauer bildet, konnte bei Nifedipin eine deutlich langsamere Radikalbildung, aber dafür eine längere Lebensdauer des Radikals nachgewiesen werden. Das zeigt, dass mit der hier entwickelten Methode eine Differenzierung hinsichtlich der Aktivität von Arzneistoffen unter Lichteinstrahlung in Bezug auf die Radikalbildung möglich ist, desweiteren ermöglicht die Methode das Erstellen von Reaktionskinetiken, da die Bildung des Radikals und der Zerfall direkt beobachtet werden können. Der große Vorteil dieses Aufbaus ist die Bestrahlung bei gleichzeitiger spektroskopischer Auswertung. Bei einer zeitlich getrennten Bestrahlung und spektroskopischen Auswertung müsste man wie oben schon beschrieben Spin-Sonden einsetzen und es wäre nicht mehr möglich, die entstandenen Radikale direkt zu beobachten. Außerdem ist es durch die direkte Erfassung der Radikale möglich, Aussagen zur Lokalisation des Radikals innerhalb des Moleküls zu machen, da z.B. wie bei Nifedipin gesehen Stickstoffradikale eine charakteristische Dreifach-Bande ausbilden.

Allopurinol, Doxycylin, Furosemid und Simvastatin zeigten die erwarteten negativen Ergebnisse und sicherten die Methode hinsichtlich falsch positiver Ergebnisse. Nur bei Amiodaron konnte die postulierte Radikalbildung nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es die entwickelte Methode ermöglicht, Arzneistoffe und auch andere Stoffe wie z.B. Metabolite, wenn sie als Substanz zur Verfügung stehen, auf Radikalbildung zu screenen. Es ist somit möglich, das photosensitive Potential über eine Typ-I-Reaktion vorherzusagen und einschätzen zu können, da es realisierbar ist, die Lebensdauer der Radikale direkt zu erfassen und so Aussagen über die Reaktivitäten zu tätigen.

5.5 Untersuchung zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch Arzneistoffe

5.5.1 Einführung

Der primäre Schritt eines Photosensitizers ist, die Energie aufzunehmen und über einen angeregten Zustand weiter zu reagieren. Dieser Schritt wurde durch die Untersuchung der Photostabilität abgedeckt. Jedoch muss nicht jeder Arzneistoff, der zu Photodegradation neigt, auch phototoxisch oder photoallergen sein. Deshalb müssen die Arzneistoffe auf weitere Eigenschaften untersucht werden. Mit der in Kapitel 5.4 beschriebenen Methode ist es möglich Arzneistoffe zu identifizieren, die über eine Typ I Reaktion zu photosensitiven Hautreaktionen führen können.

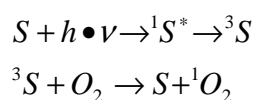
Eine weitere Eigenschaft, die viele Moleküle mit phototoxischen oder -sensitiven Eigenschaften besitzen, ist die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Onoue and Tsuda 2006). Diese ROS sind in der Lage, mit Zellmembranen zu reagieren und diese zu schädigen.

Daher ist der Nachweis der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch potentielle Photosensitizer während der Bestrahlung eine wirksame Möglichkeit zur Vorhersage von Phototoxizität.

Auf Grund dessen sollte die HPLC-Methode so modifiziert werden, dass ROS mitdetektiert werden konnten.

5.5.2 Nachweis von Singulett-Sauerstoff

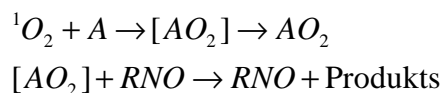
Im Allgemeinen geht man davon aus, dass Singulett-Sauerstoff (1O_2) von verschiedenen Photosensitizern (S) gebildet wird. Es wird angenommen, dass sich der Singulett-Sauerstoff durch einen Energietransfer zwischen dem angeregten Triplet-Zustand des Photosensitizers (3S) und einem Sauerstoffmolekül im Grund- oder Triplet-Zustand bildet (Gollnick 1968).



Formel 5-7

Da Singulett-Sauerstoff in Lösung eine sehr kurze Lebenszeit hat (Merkel and Kearns 1972) kann er nicht über seine eigene Absorption detektiert und muss deshalb mit Hilfe eines Surrogatparameters bestimmt werden. Dafür wurde eine Methode, die von Kraljić und El Moshni entwickelt wurde, eingesetzt (Kraljić and Moshni 1978). Hierbei wird der Untergang von p-Nitrosodimethylanilin (RNO) bei 440 nm detektiert. Bei diesem Nachweis reagiert

RNO nicht direkt mit dem Singulett-Sauerstoff, sondern mit einem Intermediär Produkt aus Imidazol und $^1\text{O}_2$. Ein annulares Peroxid $[\text{AO}_2]$ führt zur Abnahme von RNO. Imidazol fungiert hierbei als selektiver $^1\text{O}_2$ Akzeptor (A). In Abwesenheit von RNO reagiert das transannulare Peroxid durch Umlagerung oder Zerfall zu einem Endprodukt AO_2 .



Formel 5-8

5.5.2.1 Überprüfung von RNO

Um auszuschließen, dass RNO bei den gewählten Bedingungen mit Licht reagiert, wurde das Imidazol/RNO Gemisch in das „Zwei-Säulen-System“ injiziert und mehrfach für 10, 20 und 30 Minuten mit UVA-Licht bestrahlt.

Es wurden die gleichen chromatographischen Bedingungen gewählt, wie in Kapitel 5.2.3.1 zur Untersuchung der photochemischen Stabilität von Naproxen beschrieben.

5.5.2.2 Ergebnisse zur Photostabilitätsuntersuchung von RNO

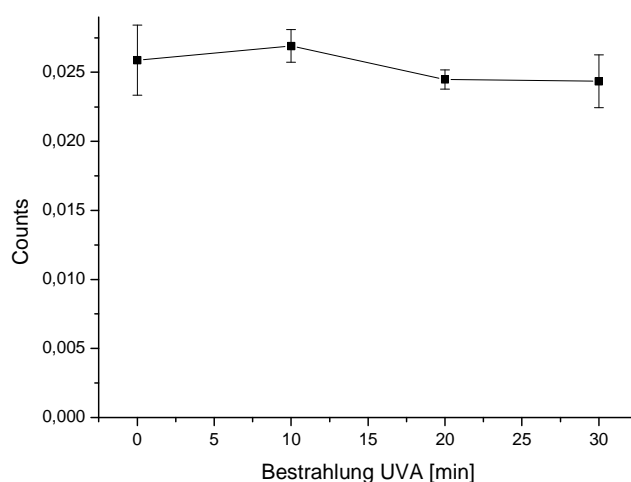


Abbildung 69: Photochemische Stabilität von RNO gegenüber UVA-Licht

Wie man in der Abbildung 69 sieht, zeigt RNO unter UVA Bestrahlung keinerlei Photodegradation und ist daher sehr gut geeignet für die hier zu erörternde Fragestellung. Auf eine Bestrahlung mit UVB kann verzichtet werden, da RNO keine Strahlung in diesem Wellenlängenbereich absorbiert.

5.5.3 Chromatographische Bedingungen zur Untersuchung der Bildung von $^1\text{O}_2$

Im Allgemeinen wurden für die jeweils getesteten Arzneistoffe, wenn nicht anders ausgewiesen, die gleichen Bedingungen gewählt, wie sie in Abschnitt 5.2. beschrieben sind.

5.5.4 Untersuchung von Ketoprofen hinsichtlich der Bildung von $^1\text{O}_2$

Ketoprofen wurde in Anwesenheit von RNO und Imidazol im wässrigen Phosphatpuffer für 0, 1, 3, 5 und 10 Minuten mit UVA-Licht und für 0, 5, 10, 15 und 20 Minuten mit UVB-Licht bestrahlt. In Abbildung 70 und Abbildung 71 ist der jeweils erhaltene Kurvenverlauf von RNO dargestellt. Es ist gut zu erkennen, dass die Peakflächen von RNO sowohl unter UVA als auch unter UVB abnehmen. Auch hier ist wieder eine stärkere Abnahme unter UVB-Belichtung vorzufinden, so sind nach 5 Minuten UVB-Belichtung nur noch 52% RNO vorhanden, während nach gleicher Zeit unter UVA-Bestrahlung noch 65% des ursprünglich injizierten RNO detektierbar sind.

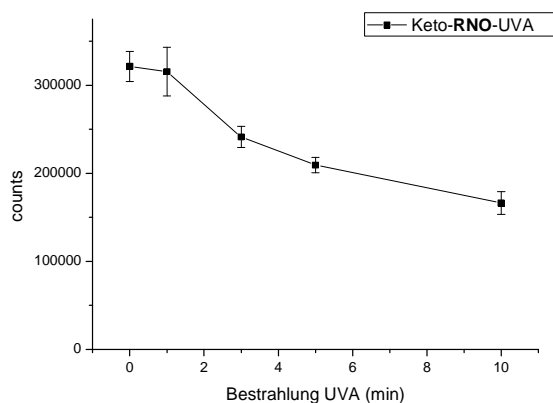


Abbildung 70: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht in Anwesenheit von Ketoprofen

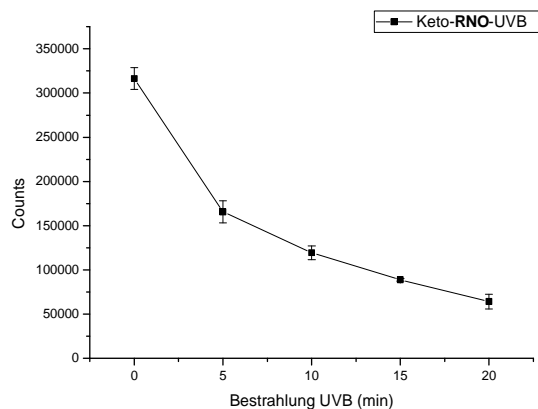


Abbildung 71: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVB-Licht in Anwesenheit von Ketoprofen

Dies steht im Einklang mit den gefundenen Ergebnissen bei der Untersuchung von Ketoprofen hinsichtlich seiner Photostabilität (5.2.2). Schon dort zeigte sich ein schnellerer Zerfall von Ketoprofen unter UVB-Bestrahlung. Vergleicht man jedoch die Photolyse von Ketoprofen mit dem Zerfall von RNO, so fällt auf, dass die RNO Degradation deutlich langsamer abläuft. Denn nach zwei Minuten Bestrahlung ist weder unter UVA noch unter UVB Ketoprofen signifikant nachzuweisen. Dies weist darauf hin, dass nicht Ketoprofen selbst, sondern eines seiner Photoprodukte den Singulett-Sauerstoff bildet.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich bei der Bestrahlung von Ketoprofen sowohl unter UVA-als auch unter UVB-Licht Singulett-Sauerstoff bildet und sich damit seine Phototoxizität begründet. Jedoch zeigten die Ergebnisse auch, dass sehr wahrscheinlich nicht Ketoprofen selbst toxisch wirkt, sondern eines seiner Abbauprodukte.

5.5.5 Untersuchung von Naproxen hinsichtlich der Bildung von $^1\text{O}_2$

In Abbildung 72 und Abbildung 73 sind die Ergebnisse der UVA- und UVB-Bestrahlung von RNO/Imidazol in Anwesenheit von Naproxen im wässrigen Phosphatpuffer dargestellt, desweiteren die Peakflächenänderungen von RNO, gemessen bei der Wellenlänge 440nm gegen die Belichtungszeit mit einer UVA und UVB-Quelle.

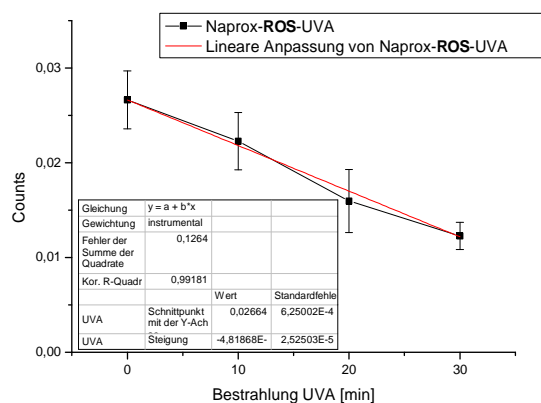


Abbildung 72: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht in Anwesenheit von Naproxen

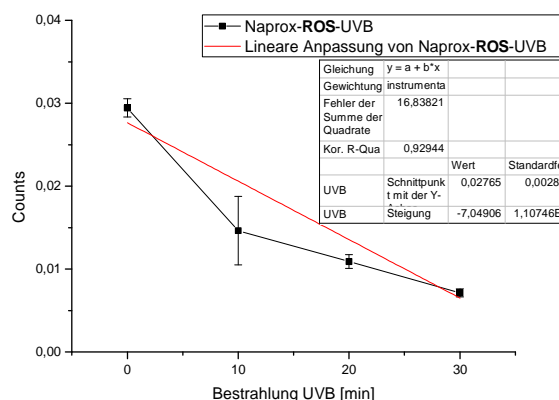


Abbildung 73: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVB-Licht in Anwesenheit von Naproxen

Mit zunehmender Belichtungsdauer werden die ermittelten Peakflächen für RNO sowohl unter UVA-, als auch unter UVB-Bestrahlung kleiner. Dabei ist der Kurvenverlauf unter UVA-Bestrahlung näherungsweise linear, während der Kurvenverlauf unter UVB-Bestrahlung nichtlinear ist. Auf Grund dessen unterscheiden sich die Steigungen der Graphen, so wird auch unter UVB schneller mehr Singulett-Sauerstoff gebildet. Zum Vergleich nach 10 Minuten UVA-Bestrahlung beträgt die Peakfläche von RNO 84%, während nach 10 Minuten UVB-Bestrahlung die Peakfläche von RNO noch 50% vom ermittelten Null-Wert beträgt. Ein ähnlicher Kurvenverlauf ist auch bei der Photodegradation von Naproxen zu sehen (5.2.3.2). Deswegen liegt die Annahme nahe, dass sich der Singulett-Sauerstoff direkt durch Naproxen bildet. Im Vergleich zu Ketoprofen wird jedoch Singulett-Sauerstoff langsamer gebildet, da bestrahltes Ketoprofen einen schnelleren RNO-Abbau induziert und der RNO-Abbau direkt

proportional zum gebildeten Singulett-Sauerstoff ist. Dies steht auch im Einklang damit, dass Ketoprofen der potentere Photosensitizer im Vergleich zu Naproxen gilt.

5.5.6 Untersuchung von Amiodaron hinsichtlich der Bildung von $^1\text{O}_2$

Zur Untersuchung der Phototoxizität von Amiodaron wurde dieses in Anwesenheit von RNO und Imidazol jeweils vier Mal für 0, 10, 20 und 30 Minuten im Photoreaktor mit UVA- bzw. UVB-Licht bestrahlt und anschließend chromatographiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 74 und Abbildung 75 dargestellt. Die detektierten Peakflächen von Amiodaron nehmen sowohl unter UVA- als auch unter UVB-Belichtung wie zu erwarten erst stark und dann langsam ab.

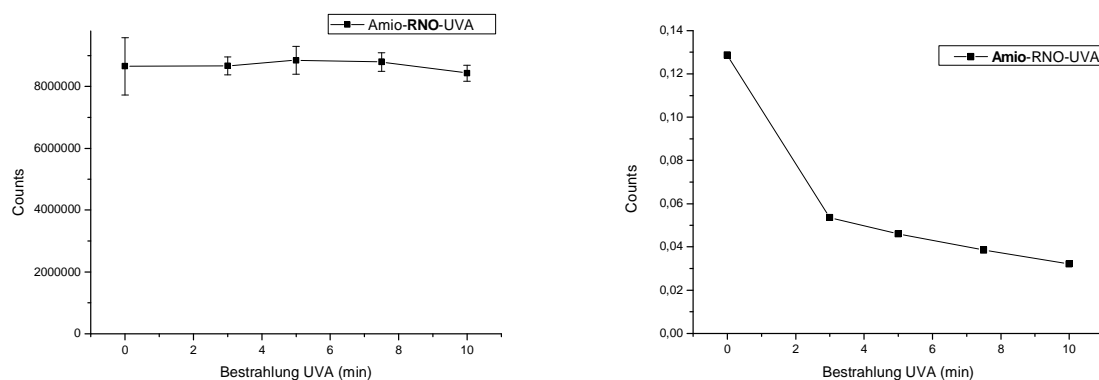


Abbildung 74: Peakflächen von RNO (links) und Amiodaron (rechts) in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht

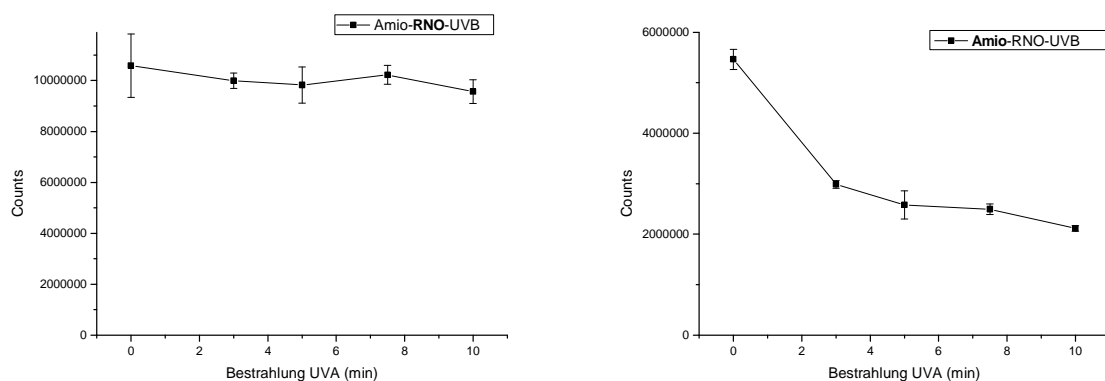


Abbildung 75: Peakflächen von RNO (links) und Amiodaron (rechts) in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVB-Licht

Die Peakflächen für RNO hingegen zeigen sowohl in Anwesenheit von Amiodaron unter UVA-, als auch unter UVB-Bestrahlung keine signifikanten Veränderungen.

Das heißt, dass Amiodaron, obwohl es gewisse strukturelle Ähnlichkeiten mit Ketoprofen und Naproxen aufweist, dennoch keinen Singulett-Sauerstoff bildet und eine benzophenonähnliche Grundstruktur nicht immer zu Singulett-Sauerstoff-Bildung unter Lichteinfluss führt. Die nicht vorhandene Bildung von $^1\text{O}_2$ heißt aber nicht, dass Amiodaron nicht auch phototoxisch sein kann, da die Bildung von $^1\text{O}_2$ nur ein möglicher chemischer Reaktionsweg zur Phototoxizität ist (Vergleich 4.1.2).

5.5.7 Untersuchung von Diclofenac hinsichtlich der Bildung von $^1\text{O}_2$

Diclofenac wurde in Anwesenheit von RNO und Imidazol mehrfach für 0, 3, 5, 7, 10 und 15 Minuten online mit UVA- und UVB-Licht bestrahlt. Die Konzentration von RNO wurde nach der chromatographischen Auftrennung bei 440 nm detektiert. Die so erhaltenen Peakflächen sind in Abbildung 76 und Abbildung 77 dargestellt.

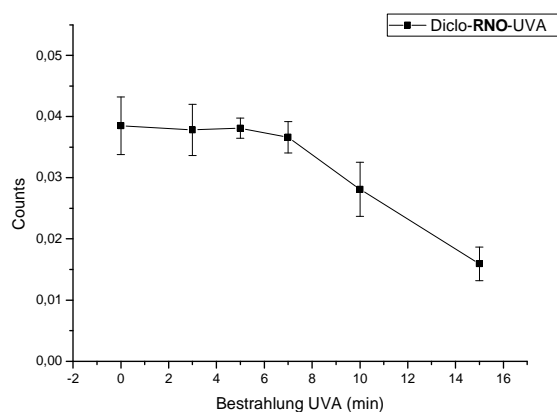


Abbildung 76: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht in Anwesenheit von Diclofenac

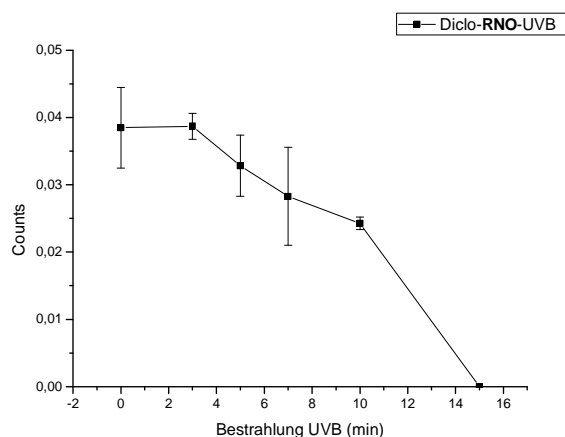


Abbildung 77: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVB-Licht in Anwesenheit von Diclofenac

Die detektierten Peakflächen von RNO nehmen erst im Laufe der Bestrahlungsdauer ab. Sowohl unter UVA- als auch unter UVB-Belichtung bildet sich zunächst ein Plateau aus und nach einer initialen Bestrahlung beginnt der Abbau von RNO. Hierbei ist die Plateauphase unter UVB-Bestrahlung deutlich kürzer als unter UVA-Bestrahlung. Da Diclofenac sowohl unter UVA- als auch unter UVB-Bestrahlung sofort photolytisch abgebaut wird, lässt sich daraus schließen, dass erst ein Abbauprodukt von Diclofenac den Singulett-Sauerstoff bildet.

Für Diclofenac lässt sich also genau wie für die beiden anderen untersuchten NSAIDs Naproxen und Ketoprofen eine Bildung von Singulett-Sauerstoff aufzeigen und somit das phototoxische Potential dieser Substanzen nachweisen. Obwohl alle drei strukturverwandt sind, zeigen sie doch Unterschiede hinsichtlich der Bildungsgeschwindigkeit von $^1\text{O}_2$.

5.5.8 Untersuchung von Hydrochlorothiazid hinsichtlich der Bildung von $^1\text{O}_2$

Hydrochlorothiazid ist als photosensitiver Arzneistoff bekannt und wurde ebenfalls mit Hilfe von RNO auf die Bildung von Singulett-Sauerstoff untersucht. Hierfür wurde HCT in Anwesenheit von RNO und Imidazol jeweils viermal für 0; 3; 5; 7,5 und 10 Minuten mit UVA bzw. 0; 1; 2; 3; 5 und 7,5 Minuten mit UVB-Licht bestrahlt. Die kürzeren Bestrahlungsintervalle wurden für UVB deshalb ausgewählt, weil die vorherigen Untersuchungen ergaben, dass HCT schneller photolytisch unter UVB-Bestrahlung abgebaut wird.

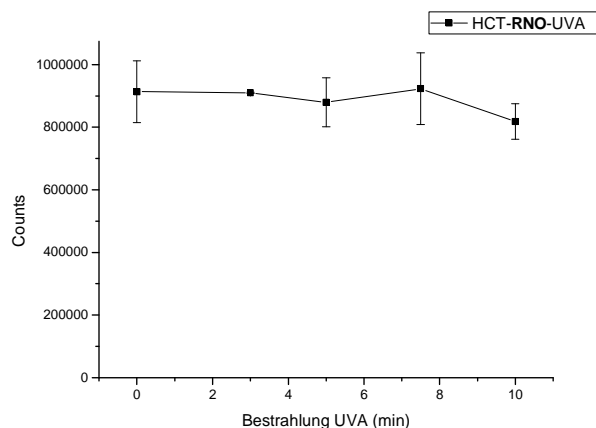


Abbildung 78: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht in Anwesenheit von HCT

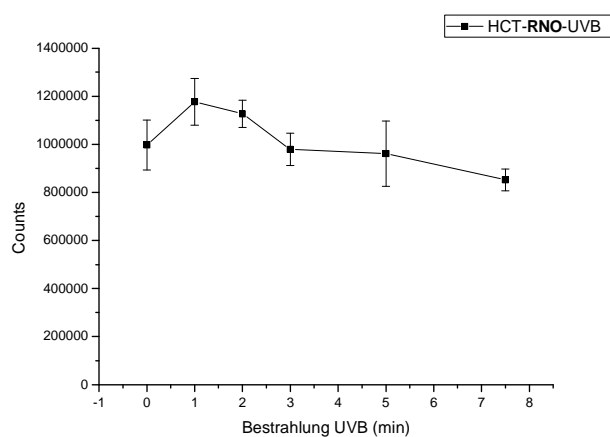


Abbildung 79: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVB-Licht in Anwesenheit von HCT

An Hand der erzielten Ergebnisse kann man sehen, dass es zu keiner signifikanten Änderung der RNO Konzentration kommt. Das heißt, HCT bildet keinen Singulett-Sauerstoff. Die photochemischen Reaktionen müssen ähnlich wie bei Amiodaron über einen anderen Weg ablaufen.

5.5.9 Untersuchung von Furosemid hinsichtlich der Bildung von $^1\text{O}_2$

Das Diuretikum Furosemid wurde in Anwesenheit von RNO und Imidazol jeweils vier Mal für 0; 1; 3; 5; 7,5 und 10 Minuten mit UVA- und analog dazu für 0; 1; 3; 5 und 7,5 Minuten mit UVB-Licht bestrahlt. Die Bestrahlung unter UVB wurde verkürzt, da die vorherigen Ergebnisse zeigten, dass Furosemid unter UVB-Bestrahlung einer schnelleren Photodegradation unterliegt.

In der Abbildung 80 sind die kinetischen Verläufe von RNO und Furosemid gegen die Belichtungsdauer dargestellt. Obwohl Furosemid einer eindeutigen Photodegradation unterliegt, sind keine deutlichen Unterschiede in den RNO-Konzentrationen zu sehen. Allerdings scheint es einen leichten Abfall zu geben. Deshalb wurden weitere Untersuchungen unternommen, in denen die Bestrahlungsdauer verlängert wurde. So wurde Furosemid in Anwesenheit von RNO/Imidazol vier Mal für 0, 10, 15, 20, 25 und 30 Minuten im Photoreaktor mit UVB-Licht und analog dazu für 0, 5, 10, 15 und 20 Minuten mit UVA-Licht bestrahlt.

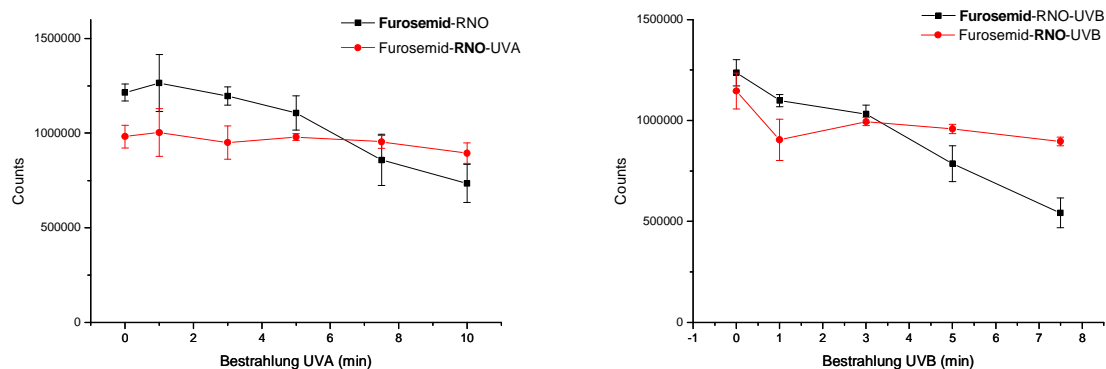


Abbildung 80: Peakflächen von RNO (rot) und Furosemid (schwarz) in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA (links) bzw. UVB-Licht (rechts)

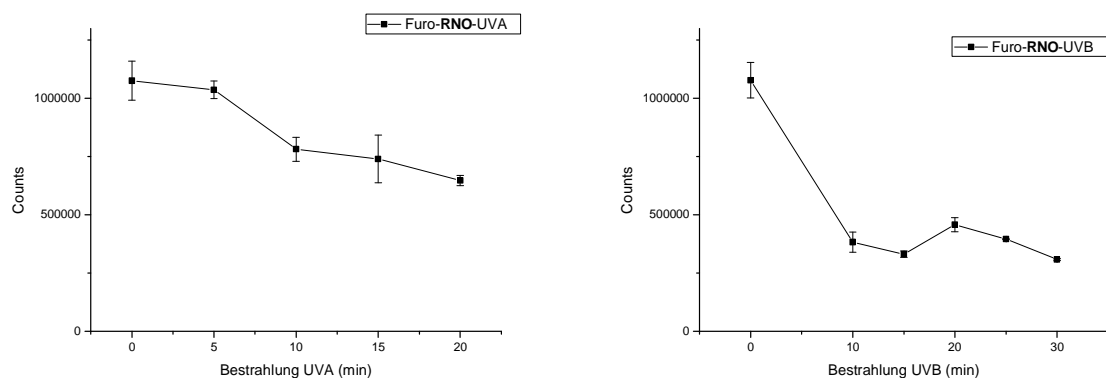


Abbildung 81: Peakflächen von RNO in Anwesenheit von Furosemid in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA (links) bzw. UVB-Licht (rechts)

Wie man in Abbildung 81 sehen kann, führt die Belichtungsverlängerung des Gemisches dazu, dass man einen deutlichen Abfall an RNO nachweisen kann. Während unter UVA-Bestrahlung der RNO-Gehalt annähernd linear verläuft, kommt es unter UVB-Bestrahlung zu einer exponentiellen Abnahme von RNO. Die verzögerte Singulett-Sauerstoff-Produktion lässt sich auf der einen Seite damit erklären, dass der Singulett-Sauerstoff nicht wie in 4.3.3

postuliert, direkt aus Furosemid, sondern erst aus einem späteren Photoprodukt von Furosemid, gebildet wird.

Desweiteren hat der Sauerstoffgehalt der Probe einen starken Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Singulett-Sauerstoffbildung, da sowohl Furosemid, als auch der Sauerstoff an der Reaktionskinetik beteiligt sind, so dass ein unterschiedlicher Kurvenverlauf auch auf einen unterschiedlichen Sauerstoffgehalt der Proben zurückzuführen sein kann.

5.5.10 Untersuchung von Doxycyclin hinsichtlich der Bildung von $^1\text{O}_2$

Doxycyclin wurde, wie die anderen Arzneistoffe, in Anwesenheit von RNO zur Bestimmung der Singulett-Sauerstoffbildung jeweils viermal mit variierenden Bestrahlungszeiten mit UVA und UVB-Strahlung belichtet. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 82 dargestellt.

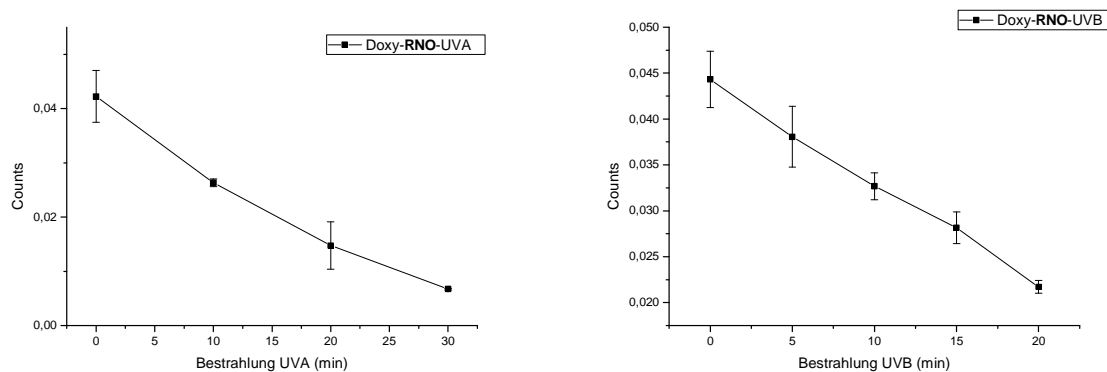


Abbildung 82: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA- (links) bzw. UVB-Licht (rechts) in Anwesenheit von Doxycyclin

Doxycyclin als potenter Photosensitizer zeigt dabei eine kontinuierliche Singulett-Sauerstoffbildung, sowohl unter UVA- als auch unter UVB-Bestrahlung. In diesem Fall scheint die Singulett-Sauerstoffbildung direkt mit dem Doxycyclinuntergang zu korrelieren. Außerdem zeigt sich, wie auch schon bei den vorher untersuchten Arzneistoffen, je nachdem in welchem Spektralbereich der jeweilige Arzneistoff Licht stärker absorbiert, dass die Bildung von $^1\text{O}_2$ bei Energiezufuhr in diesem Wellenlängenbereich stärker ist, sofern der Arzneistoff in der Lage ist $^1\text{O}_2$ zu bilden.

5.5.11 Untersuchung von Simvastatin hinsichtlich der Bildung von $^1\text{O}_2$

Für Simvastatin sind in der Literatur nur Patientenbeispiele für phototoxische Hautreaktionen beschrieben. Eine mögliche Ursache sucht man vergeblich. Deswegen ist die Untersuchung

auf eine mögliche Singulett-Sauerstoffbildung bei der Bestrahlung von Simvastatin von Interesse.

Simvastatin wurde jeweils vier Mal in Anwesenheit von RNO/Imidazol für 0; 5; 7,5 und 10 Minuten mit UVA- und UVB-Licht im Photoreaktor online bestrahlt und anschließend chromatographisch aufgetrennt und detektiert. Die so erhaltenen Peakflächen für RNO sind in Abbildung 83 dargestellt. Es konnte keine Singulett-Sauerstoffbildung festgestellt werden. Das heißt, eine mögliche phototoxische Reaktion von Simvastatin muss über einen anderen Weg ablaufen. Allerdings darf nicht vergessen werden, dass Simvastatin im Körper verstoffwechselt wird und ein Metabolit von Simvastatin die Ursache für die gefundenen phototoxischen Reaktionen bei der Einnahme von Simvastatin sein kann.

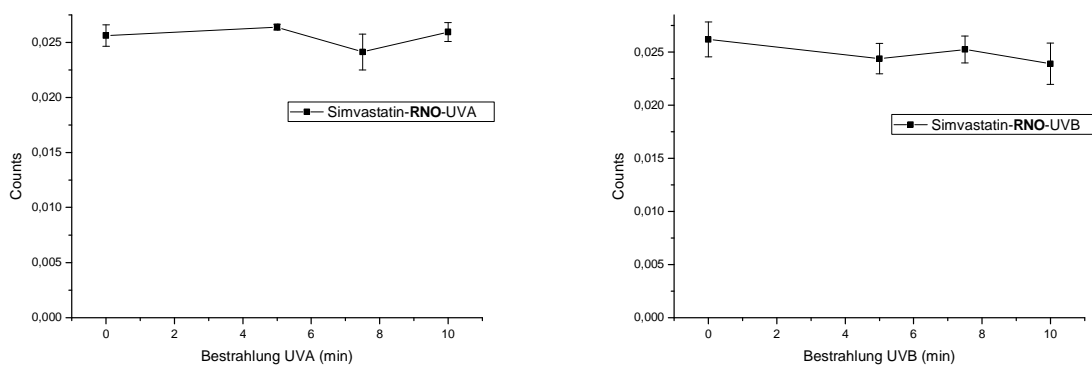


Abbildung 83: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA (links) bzw. UVB-Licht (rechts) in Anwesenheit von Simvastatin

5.5.12 Untersuchung von Nifedipin hinsichtlich der Bildung von $^1\text{O}_2$

Nifedipin gehört zur Gruppe der Calcium-Antagonisten und findet Einsatz in der Therapie von Bluthochdruck (Henry 1980). Es ist sowohl in der Lage, Strahlung im UVA- als auch im UVB Bereich zu absorbieren und ist dafür bekannt, dass es leicht einer Photolyse unterliegt, wenn es Licht $< 420\text{nm}$ ausgesetzt wird. Einige Fallberichte führten dazu, dass das Committee of Safety of Medicines (UK) Nifedipin als möglichen Photosensitizer einstuft (Gibbs, Traynor et al. 1992). Dass Nifedipin Radikale produziert, wurde schon in Kapitel 5.4.4 beschrieben. Hier soll die Bildung von Singulett-Sauerstoff nachgewiesen werden.

5.5.12.1 Chromatographische Bedingungen zur Untersuchung von Nifedipin

Als analytisches System kam für Nifedipin das „Ein-Säulen-System“ zum Einsatz. Während der Belichtung im wässrigen Phosphatpuffer wurde der Fluss jeweils für die Dauer der Bestrahlung angehalten. Der wässrigen Phase wurde zusätzlich 1% Tetramethylamoniumchlorid zugesetzt. Die chromatographische Auftrennung wurde mit Hilfe eines Wasser/Acetonitril Gradienten realisiert.

	Zeit	0	3	10	13	18
Pumpe1 (1ml/min)	Puffer	100	100	65	65	0
	Tetramethylamoniumchlorid %					
	Acetonitril %	0	0	35	35	100

Tabelle 13: Gradientenprofil für die Untersuchung von Nifedipin

5.5.12.2 Ergebnisse der Untersuchung von Nifedipin hinsichtlich der Bildung von 1O_2

Nifedipin wurde in Anwesenheit von RNO jeweils vier Mal für 0, 1, 2, 3 und 4 Minuten mit UVA-Licht bestrahlt, analog wurden Versuche mit UVB-Licht durchgeführt. Die Bestrahlungszeiten waren hier 0; 0,5; 1; 2; 3 und 4 Minuten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 84 dargestellt. Nicht dargestellt ist der Konzentrationsverlauf von Nifedipin, da bereits nach einer Minute Bestrahlung kein Nifedipin mehr nachzuweisen ist. Wie auch schon bei den Untersuchungen der Radikalbildung von Nifedipin unter Lichteinfluss findet man eine schnelle Photolyse von Nifedipin. Die Ergebnisse in Bezug auf die Bildung von Singulett-Sauerstoff zeigen Unterschiede je nach Wellenlängenspektrum des eingestrahlteten Lichtes. So ist keine RNO-Degradation unter UVA-Bestrahlung wiederzufinden, während es zu einem näherungsweise linearen Abbau von RNO unter UVB-Bestrahlung kommt. Dies weist darauf hin, dass eines der Photoprodukte von Nifedipin den Singulett-Sauerstoff bildet und dies nur unter UVB-Belichtung.

Für Nifedipin kann man zusammenfassend sagen, dass es sowohl über die Singulett-Sauerstoff-, als auch über die Radikalbildung photosensibilisierende Hautreaktionen verursachen kann.

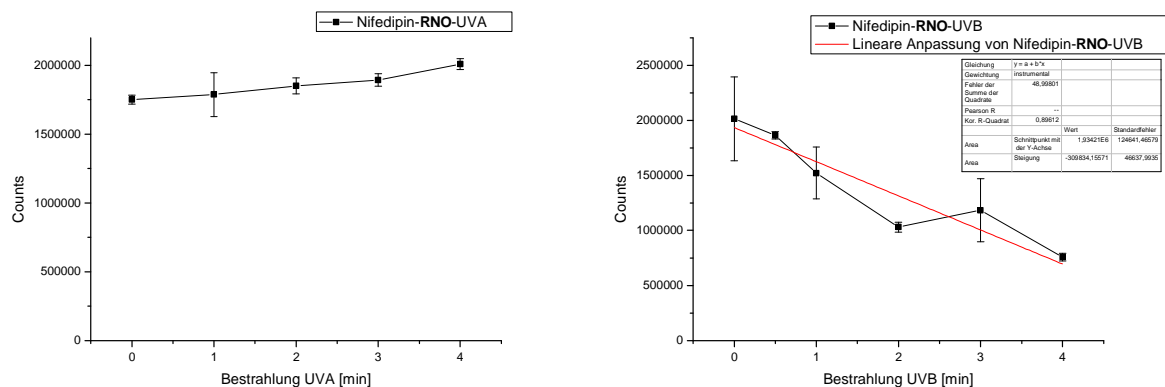


Abbildung 84: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA (links) bzw. UVB-Licht (rechts) in Anwesenheit von Nifedipin

5.5.13 Untersuchung von Lercarnidipin hinsichtlich der Bildung von 1O_2

Lercarnidipin ist ein Calciumkanalblocker der dritten Generation und besitzt genauso wie Nifedipin ein 1,4-Dihydropyridin-Grundgerüst. Deswegen liegt die Annahme nahe, dass es sich ähnlich wie Nifedipin verhält. Charakteristisch für Lercarnidipin ist die Seitenkette, welche die lipophilen Eigenschaften von Lercarnidipin beeinflusst.

5.5.13.1 Chromatographische Bedingungen zur Untersuchung von Lercarnidipin

Die chromatographischen Bedingungen sind auf Grund der Strukturverwandtschaft die gleichen wie bei Nifedipin (5.5.12.1).

5.5.13.2 Ergebnisse zur Untersuchung von Lercarnidipin hinsichtlich der Bildung von 1O_2

Lercarnidipin wurde jeweils viermal für 0, 1, 3, 5 und 7 Minuten mit UVA-Licht bestrahlt und analog dazu 0, 10, 30, 60 und 120 Sekunden mit UVB-Licht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 85 und Abbildung 86 dargestellt.

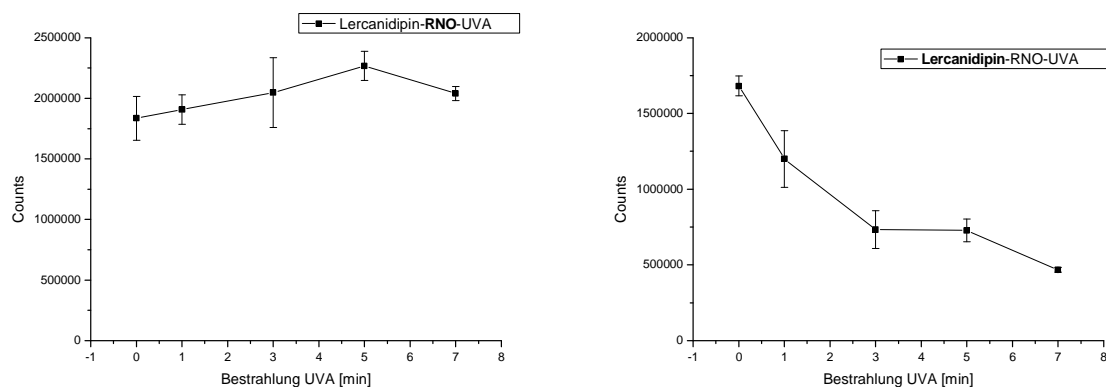


Abbildung 85: Peakflächen von RNO (links) und Lercarnidipin (rechts) in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht

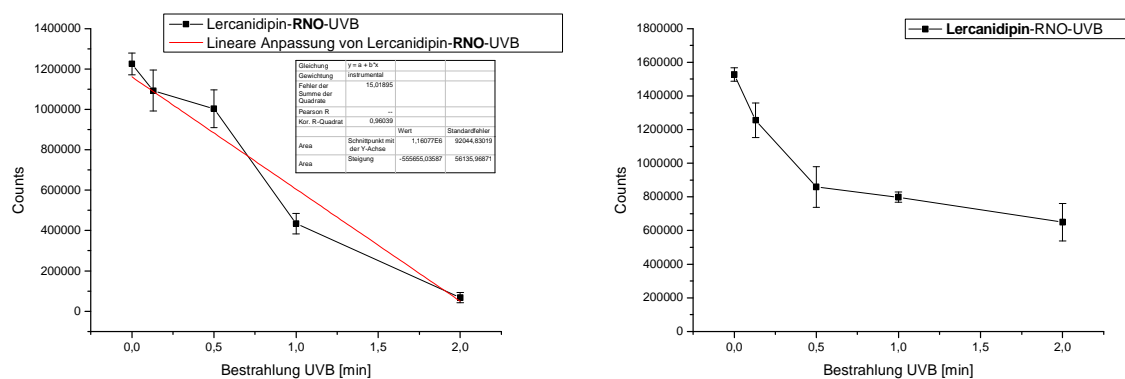


Abbildung 86: Peakflächen von RNO (links) und Lercarnidipin (rechts) in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVB-Licht

Lercarnidipin zeigt unter UVB-Bestrahlung einen schnelleren photolytischen Abbau als unter UVA-Bestrahlung. So sind nach 60 Sekunden unter UVB-Bestrahlung nur noch ca. 52% Lercarnidipin vorhanden, während nach gleicher UVA-Bestrahlung noch ca. 71% zu finden sind. Im Vergleich zu Nifedipin reagiert Lercarnidipin etwas träger gegenüber Licht, jedoch unterliegt es immer noch einer schnellen Photolyse. Die Modifikation der Seitenkette hat also auf die photochemischen Eigenschaften nur einen geringen bis keinen Einfluss. So ist es auch nicht verwunderlich, dass Lercarnidipin auch ähnliche Ergebnisse in der Singulett-Sauerstoffproduktion zeigt wie Nifedipin. Auch ist keine $^1\text{O}_2$ -Bildung unter UVA-Einstrahlung zu finden, während sich bei UVB-Bestrahlung $^1\text{O}_2$ bildet.

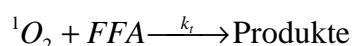
Diese Ergebnisse bestätigen für Nifedipin, dass eines der Photoprodukte den $^1\text{O}_2$ bildet, denn auch bei Lercarnidipin finden wir nur unter UVB einen Untergang von RNO. Die Bildung von $^1\text{O}_2$ direkt aus Lercarnidipin scheidet auf Grund der Tatsache aus, dass Lercarnidipin und

Nifedipin in der Lage sind, Licht im UVA-Bereich zu absorbieren. Da beide Arzneistoffe sehr ähnliche Ergebnisse zeigen, kann man davon ausgehen, dass das 1,4-Dihydropyridin-Grundgerüst nicht nur für die hohe Lichtempfindlichkeit, sondern auch für die $^1\text{O}_2$ -Bildung essentiell ist. Wenn man Untersuchungen von Onoue mit einbezieht, ist die $^1\text{O}_2$ nur bei 4-(2-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridinen zu finden (Onoue, Igarashi et al. 2008). Onoue untersuchte verschiedene 1,4-Dihydropyridin-Derivate und konnte nicht bei allen Stoffen eine Singulett-Sauerstoffproduktion finden, sondern nur bei 4-(2-Nitrophenyl)-1,4-dihydropyridinen. Allerdings verknüpfte er die gefundenen Ergebnisse nicht mit den vorhandenen chemischen Strukturgrundgerüsten.

5.5.14 Alternativer Nachweis für Singulett-Sauerstoff mit Hilfe von FFA

Neben RNO kann auch Furfurylalkohol (FFA) zur Bestimmung von $^1\text{O}_2$ im wässrigen Medium benutzt werden. Es findet vor allem Einsatz zur Bestimmung von $^1\text{O}_2$ in der Oberflächenwasser-Analytik (Haag and Hoigne 1986). FFA soll im Dunklen stabil sein und nur einen sehr geringen Untergang unter Lichteinfluss zeigen.

Im Wässrigen kann der durch $^1\text{O}_2$ verursachte oxidative Untergang von FFA nach Haag und Hoigne mit folgender Gleichung beschrieben werden:



5-9

Die Untersuchungen mit FFA sollen als Quervergleich zu RNO dienen und eine Einschätzung hinsichtlich der Anwendbarkeit von FFA und RNO geben. Auf Grund dieser Zielstellung wurden die drei Arzneistoffe Ketoprofen, Naproxen und Diclofenac mit Hilfe von FFA auf ihre $^1\text{O}_2$ -Bildung untersucht. Alle drei Arzneistoffe zeigten mit RNO positive Ergebnisse mit verschiedenen Kinetikverläufen.

5.5.14.1 Chromatographische Bedingungen der Untersuchung zur Bildung von $^1\text{O}_2$ mit Hilfe von FFA

Die chromatographischen Bedingungen der Untersuchung zu der Bildung von $^1\text{O}_2$ mit Hilfe von FFA als Trapping-Agent waren für alle untersuchten Arzneistoffe gleich. So wurde wieder das „Ein-Säulen-System“ eingesetzt und die Bestrahlung geschah im wässrigen Phosphatpuffer. Zur chromatographischen Auftrennung wurde ein wässriger Phosphatpuffer/ACN-Gradient eingesetzt. FFA wurde mit Hilfe des DADs bei 220 nm detektiert.

	Zeit	0	4	8	13	18
Pumpe1 (1ml/min)	Puffer %	100	100	75	45	45
	Acetonitril %	0	0	25	55	55

Tabelle 14: Gradientenprofil für die Untersuchung zur Bildung von $^1\text{O}_2$ mit Hilfe von FFA

5.5.14.2 Ergebnisse zur Photostabilitätsuntersuchung von FFA

FFA wird als stabil im Dunklen beschrieben, allerdings sind unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich seiner Photostabilität publiziert worden (Haag and Hoigne 1986; Xia, Li et al. 2009). Auf Grund dessen wurde FFA jeweils viermal für 0; 3; 5; 7,5 und 10 Minuten mit UVA- und UVB-Licht bestrahlt.

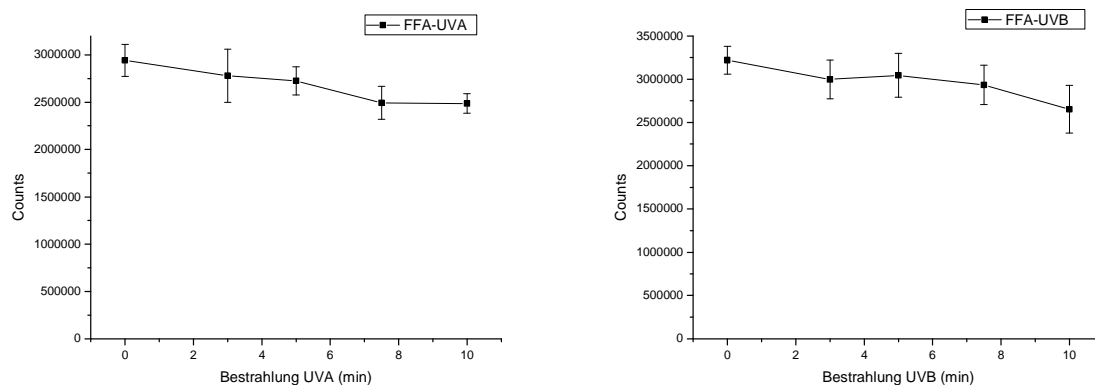


Abbildung 87: Photochemische Stabilität von FFA gegenüber UVA- (links) und UVB(rechts)-Licht

Die erhaltenen Peakflächen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer von FFA sind in Abbildung 87 dargestellt. Dem Verlauf ist zu entnehmen, dass es zu keinem signifikanten Abfall der FFA-Konzentration kommt. Allerdings ist ein klarer abfallender Trend der Kurve sowohl unter UVA-, als auch unter UVB-Bestrahlung zu erkennen.

5.5.14.3 Untersuchung zur lichtinduzierten Bildung von $^1\text{O}_2$ durch Ketoprofen mit Hilfe von FFA

Ketoprofen wurde in Anwesenheit von FFA viermal mit UVA- und UVB-Licht im Photoreaktor bestrahlt und anschließend chromatographiert. Die so erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 88 und Abbildung 89 dargestellt. Dabei zeigen sich ähnliche Ergebnisse wie bei der Untersuchung auf Singulett-Sauerstoffbildung mit Hilfe von RNO. FFA nimmt unter UVA-Bestrahlung von Ketoprofen nur gering ab, während es unter UVB-Bestrahlung zu einem deutlich schnelleren $^1\text{O}_2$ vermittelten Zerfall von FFA kommt. Wie auch schon bei den Ketoprofen Untersuchungen mit RNO setzt die $^1\text{O}_2$ erst ein, wenn Ketoprofen schon komplett photolytisch zersetzt ist.

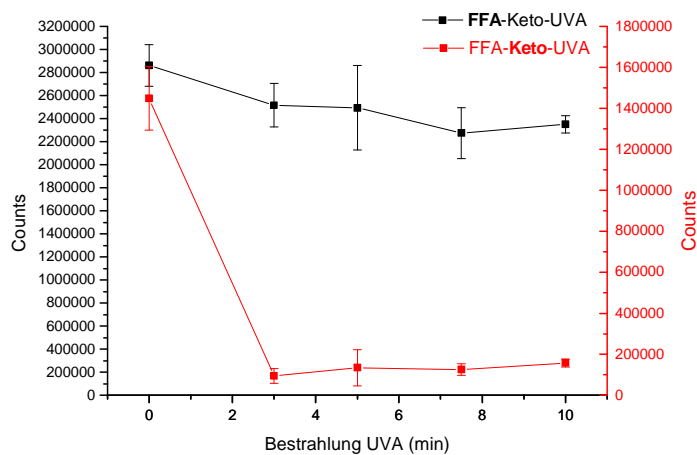


Abbildung 88: Peakflächen von FFA (schwarz) und Ketoprofen (rot) in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht

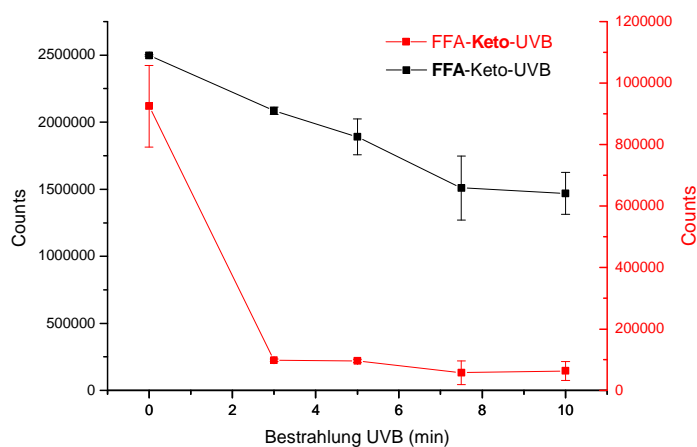


Abbildung 89: Peakflächen von FFA (schwarz) und Ketoprofen (rot) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer mit UVB-Licht

5.5.14.4 Untersuchung zur lichtinduzierten Bildung von $^1\text{O}_2$ durch Naproxen mit Hilfe von FFA

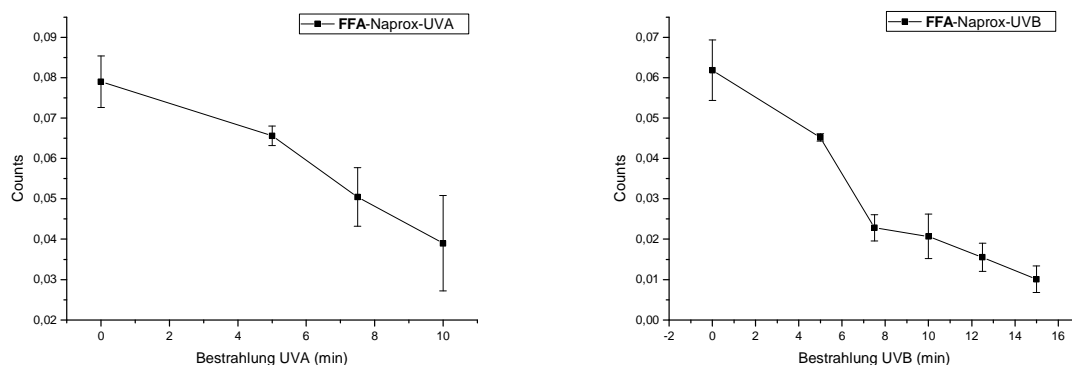


Abbildung 90: Peakflächen von FFA in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer in Anwesenheit von Naproxen (links UVA-Licht; rechts UVB-Licht)

Naproxen wurde in Anwesenheit von FFA online im Photoreaktor für 0; 5; 7,5 und 10 Minuten mit UVA-Licht bestrahlt und für 0; 5; 7,5; 10, 12 und 15 Minuten mit UVB-Licht. Die detektierten Peakflächen für FFA sind in Abbildung 90 dargestellt. Hierbei wurden, wie auch schon bei Ketoprofen, wieder vergleichbare Ergebnisse gefunden wie bei der Untersuchung der Singulett-Sauerstoffbildung mit Hilfe von RNO (5.5.5). Wieder zeigt sich eine stärkere $^1\text{O}_2$ Bildung unter UVB-Bestrahlung, die Kurvenverläufe sind ebenfalls vergleichbar zwischen RNO und FFA.

5.5.14.5 Untersuchung zur lichtinduzierten Bildung von $^1\text{O}_2$ durch Diclofenac mit Hilfe von FFA

Diclofenac zeigte bei der Untersuchung mit RNO auf $^1\text{O}_2$ -Bildung einen verzögerten Abbau. So konnte erst eine $^1\text{O}_2$ Bildung unter UVA nach 7,5 Minuten und bei UVB nach fünf Minuten gefunden werden. Auf Grund dessen sollte mit FFA noch einmal die $^1\text{O}_2$ Bildung bei kürzerer Bestrahlungsdauer untersucht werden. Hierfür wurde Diclofenac jeweils viermal in Anwesenheit von FFA für 0; 3; 5; 7,5 und 10 Minuten mit UVA-Licht und analog dazu für 0, 1, 2, 3 und 5 Minuten mit UVB-Licht bestrahlt.

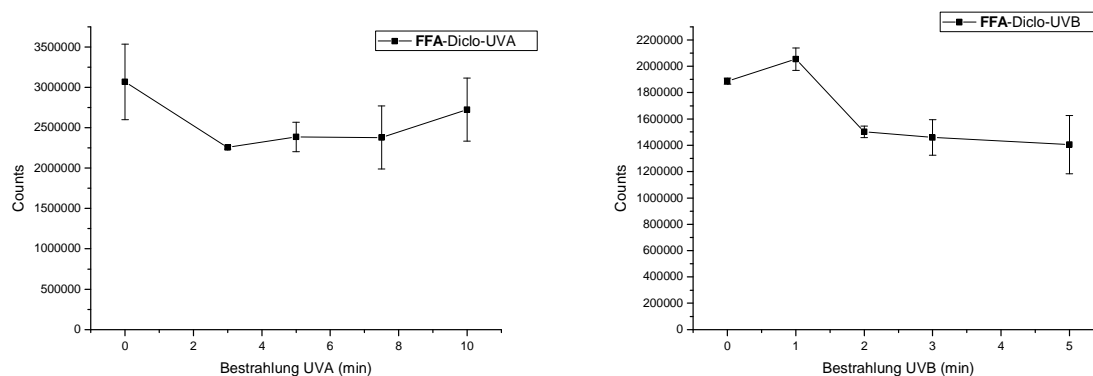


Abbildung 91: : Peakflächen von FFA in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer in Anwesenheit von Diclofenac (Diclo) (links UVA-Licht; rechts UVB-Licht)

Der Peakflächenverlauf unter Bestrahlung für FFA ist in Abbildung 91 dargestellt, hierbei zeigen sich ähnliche Ergebnisse, wie schon mit RNO gefunden. So kommt es unter UVA-Bestrahlung von Diclofenac nur zu einer geringer $^1\text{O}_2$ Bildung. Die Peakflächen von FFA bleiben nach einem initialen Abfall sogar stabil. Unter UVB-Bestrahlung kommt es ebenfalls zu keiner starken $^1\text{O}_2$ Bildung. Es ist zwar ein Trend im Abfall der FFA-Konzentration zu sehen, im Vergleich aber zu den FFA-Kinetiken von Naproxen und Ketoprofen, unter Bestrahlung ist dieser allerdings sehr gering. Diese Untersuchungen zeigen, dass Diclofenac nur im geringen Maße in der Lage ist $^1\text{O}_2$ zu bilden und somit nur über andere Wege phototoxisch wirken kann (vergleiche Seite 8 Abbildung 2).

5.5.15 Nachweis von Superoxid Anionenradikalen

Nicht nur Singulett-Sauerstoff als reaktive Sauerstoffspezies spielt eine große Rolle bei der Photosensitization des Typ II, sondern auch Superoxid Anionenradikale ($O_2^{\bullet-}$). Diese werden gebildet durch den Energietransfer von angeregten Photosensitizern auf molekularen Sauerstoff. Jene Superoxid-Anionenradikale sind dann in der Lage, zelluläre Schäden über verschiedene Reaktionswege auszulösen (Pathak and Joshi 1984).

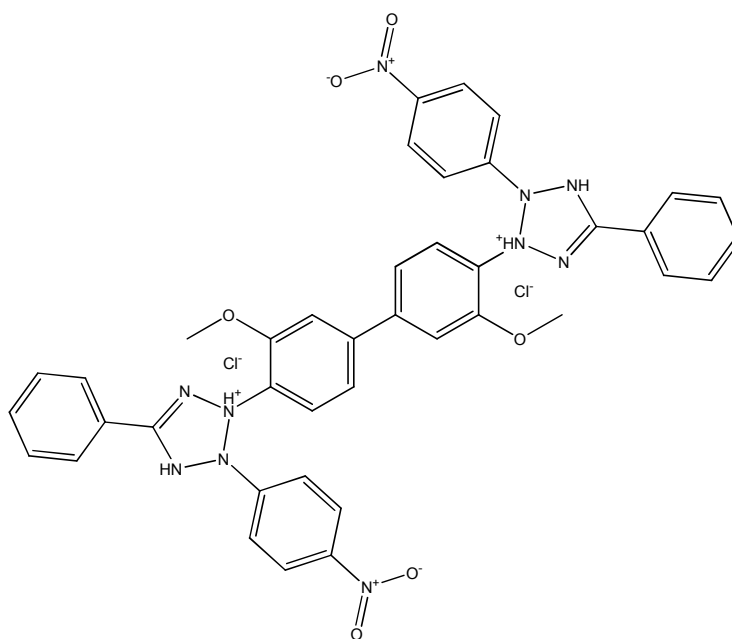
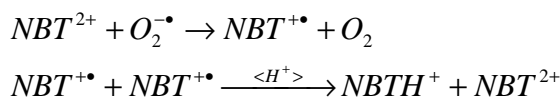
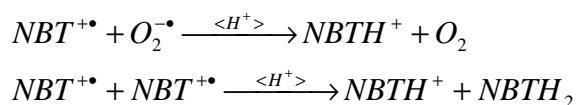


Abbildung 92: Nitroblau-Tetrazoliumchlorid

Eine Möglichkeit, die Superoxid Radikale nachzuweisen, sind Reaktionen mit Nitro-substituierten Aromaten, wie zum Beispiel Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT). NBT kann durch einen Ein-Elektron-Transfer von $O_2^{\bullet-}$ reduziert werden. Die Reduktion vom Dikation NBT^{2+} zum Diformazan geschieht über zwei Reaktionsschritte. Als erstes wird ein $NBT^{+\bullet}$ -Radikal gebildet, welches über Disproportionierung zu NBT^{2+} und Monoformazan ($NBTH^+$) reagiert.



Monoformazan (NBTH^+) ist ein stabiles Intermediär und besitzt ein Absorptionsmaximum bei 530 nm. Die Weiterreduktion des Monoformazan führt zur Bildung Diformazan (NBTH_2), dieses kann dann bei 560nm detektiert werden (Tarpey and Fridovich 2001).



5-11

5.5.16 Auswahl der Arzneistoffe sowie chromatographische Bedingungen bei deren Test auf $\text{O}_2^{\bullet-}$

Es wurden nicht alle Arzneistoffe, die auf Singulett-Sauerstoff-Bildung getestet wurden, ebenfalls auf $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Bildung getestet, sondern nur eine Auswahl an Arzneistoffen, um das Prinzip zu zeigen. Als Modellsubstanzen wurden Ketoprofen, Naproxen, Amiodaron, Furosemid, Diclofenac und Doxycyclin gewählt. Die ausgewählten Arzneistoffe bilden alle außer Amiodaron $\text{O}_2^{\bullet-}$, so dass die Untersuchungen zur Systemüberprüfung geeignet sind (Costanzo, Guidi et al. 1989; Onoue and Tsuda 2006).

5.5.16.1 Chromatographische Bedingungen der Untersuchung zur Bildung von $\text{O}_2^{\bullet-}$

Die chromatographischen Bedingungen zur Untersuchung auf mögliche lichtinduzierte $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Bildung waren für alle untersuchten Arzneistoffe gleich. Es wurde das „Ein-Säulen-System“ verwendet und dem wässrigen Phosphatpuffer 1% Tetramethylammoniumchlorid zugesetzt, damit NBT als Ionenpaar chromatographiert werden konnte. Die verwendeten chromatographischen Bedingungen sind in Tabelle 15 dargestellt. NBTH_2 wurde bei 560 nm detektiert. Während der Belichtung im wässrigen Phosphatpuffer wurde der Fluss jeweils für die Dauer der Bestrahlung angehalten.

	Zeit	0	3	10	13	18
Pumpe1 (1ml/min)	Puffer	100	100	65	65	0
	Tetramethylammoniumchlorid %					
	Acetonitril %	0	0	35	35	100

Tabelle 15: Gradientenprofil für die Untersuchung zur Bildung von $\text{O}_2^{\bullet-}$

5.5.16.2 Untersuchung zur lichtinduzierten Bildung von $O_2^{\bullet-}$ durch Ketoprofen

Ketoprofen wurde in Anwesenheit von NBT jeweils vier Mal für 5, 10, 15 und 20 Minuten mit UVA- und analog dazu für 0, 5, 10 und 15 Minuten mit UVB-Licht bestrahlt. Dabei produzierte Ketoprofen sowohl unter UVA- als auch unter UVB-Bestrahlung $O_2^{\bullet-}$ (Abbildung 93). Die $O_2^{\bullet-}$ -Bildung geschieht unter UVB- deutlich schneller als unter UVA-Bestrahlung, ähnlich wie bei den gefundenen Ergebnisse der Singulett-Sauerstoffbildung. Auffällig ist, dass die $O_2^{\bullet-}$ -Bildung unter UVA-Bestrahlung bis 15 Minuten näherungsweise linear verläuft und dann wieder leicht abfällt. Dies lässt darauf schließen, dass das gebildete NBTH₂ nicht stabil ist. Außerdem sind starke Schwankungen in der NBTH₂-Bildung und damit $O_2^{\bullet-}$ -Bildung zu sehen. Unter UVB-Bestrahlung entsteht deutlich schneller $O_2^{\bullet-}$, so ist nach 5 Minuten schon ein höherer Wert an NBTH₂ erreicht als der Mittelwert nach 15 Minuten UVA-Bestrahlung, allerdings stagniert die NBTH₂-Bildung danach.

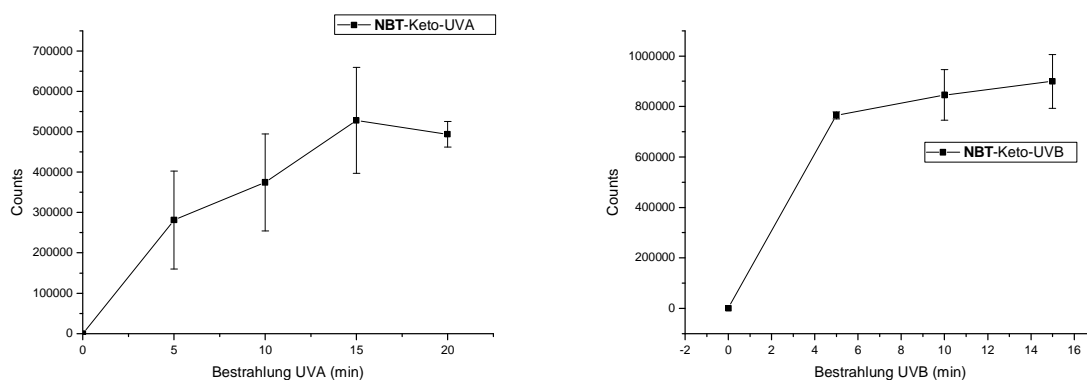


Abbildung 93: Peakflächen von NBTH₂ in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA (links) bzw. UVB-Licht (rechts) in Anwesenheit von Ketoprofen

5.5.16.3 Untersuchung zur lichtinduzierten Bildung von $O_2^{\bullet-}$ durch Naproxen

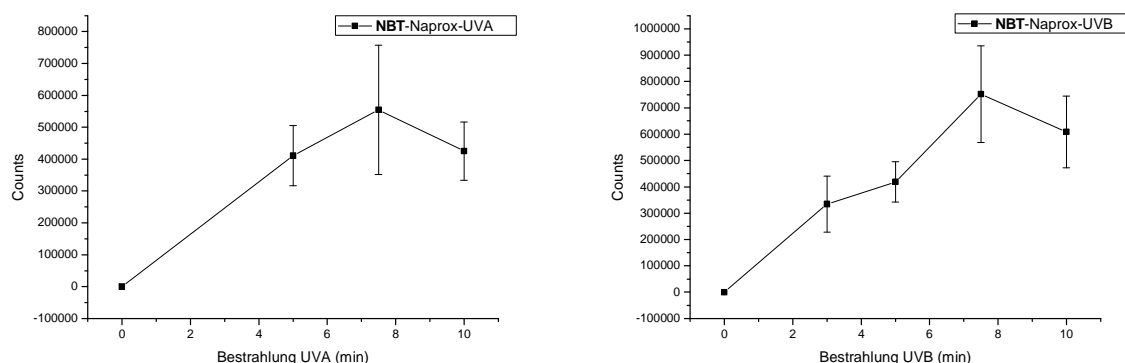


Abbildung 94: Peakflächen von NBTH₂ in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA- (links) bzw. UVB-Licht (rechts) in Anwesenheit von Naproxen

In Abbildung 94 sind die erhaltenen Peakflächen von NBTH₂ durch die Bestrahlung von NBT in Anwesenheit von Naproxen mit UVA- und UVB-Licht dargestellt. Wie auch bei Ketoprofen wurde jede Bestrahlung vier Mal durchgeführt. Die Bildung von $O_2^{\bullet-}$ verläuft unter UVA- und UVB-Bestrahlung sehr ähnlich. So kommt es bis zur Bestrahlungsdauer von 7,5 Minuten zu einem annähernd linearen Anstieg, danach kommt es zu einem Abfall der NBTH₂-Konzentration. Dies bestätigt die Annahme, dass NBTH₂ nicht stabil ist. Im Vergleich mit Ketoprofen bildet Naproxen deutlich schneller und stärker $O_2^{\bullet-}$, wie man an Hand der unterschiedlichen Anstiege der jeweiligen NBTH₂-Kurven sehen kann. Das heißt im Umkehrschluss auch, dass zumindestens in diesen beiden Fällen die $O_2^{\bullet-}$ -Bildung nicht mit der 1O_2 -Bildung direkt korreliert. Da Ketoprofen stärker 1O_2 bildet als Naproxen (Vergleiche 5.5.4 und 5.5.5).

5.5.16.4 Untersuchung zur lichtinduzierten Bildung von $O_2^{\bullet-}$ durch Amiodaron

Da Amiodaron nur unter UVB 1O_2 -Bildung zeigte (5.5.6), wurde Amiodaron nur mit UVB-Licht bestrahlt. Dabei konnte keine signifikante Bildung von NBTH₂ gefunden werden. Auch wenn es gelegentlich zu einem detektierbaren Signal kam, ist dies kein Beleg dafür, dass Amiodaron $O_2^{\bullet-}$ bildet. Dies steht auch im Einklang mit den bis dato publizierten Ergebnissen der photochemischen Eigenschaften von Amiodaron.

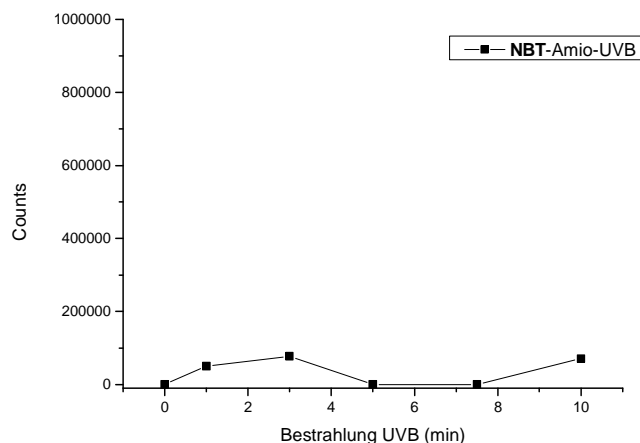


Abbildung 95: Peakflächen von NBTH₂ in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVB-Strahlung in Anwesenheit von Amiodaron

Die geringe Bildung von NBTH₂ muss auch nicht durch O₂^{•-} bedingt sein, denn die Reduktion von NBT ist nicht O₂^{•-} exklusiv. Auch andere Substanzen die ein Elektron übertragen, können zu einem NBT-Radikal führen.

5.5.16.5 Untersuchung zur lichtinduzierten Bildung von O₂^{•-} durch Diclofenac

Diclofenac wurde viermal für 0; 5; 10; 15 und 20 Minuten mit UVA-Licht, bzw. 0; 3; 5; 7,5 und 10 Minuten mit UVB-Licht bestrahlt. Die so erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 96 dargestellt.

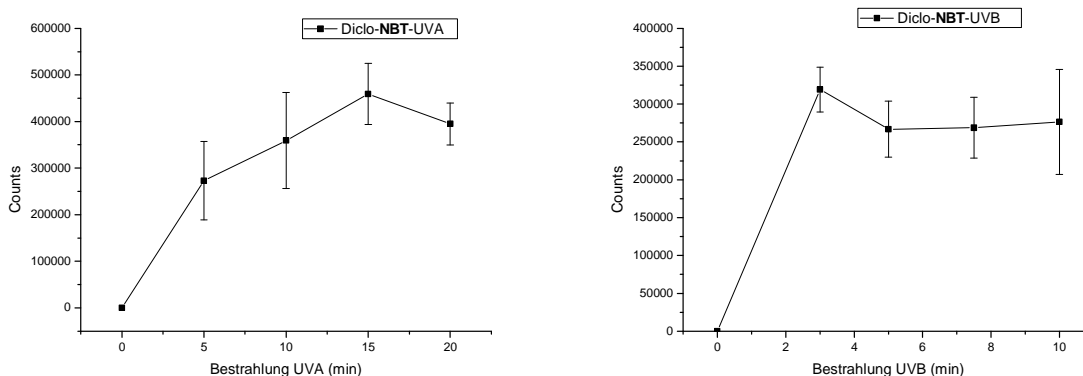


Abbildung 96: Peakflächen von NBTH₂ in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA- (links) bzw. UVB-Licht (rechts) in Anwesenheit von Diclofenac

Die gefundenen Ergebnisse weisen Ähnlichkeiten mit den erhaltenen Kurven für NBTH₂ unter Ketoprofen-Bestrahlung auf. So findet man unter UVA-Bestrahlung einen stetigen Anstieg, der nach einem Maximum nach 15 Minuten wieder abfällt, während unter UVB-Bestrahlung bereits nach viel kürzerer Zeit(hier nach drei Minuten) bereits ein Maximum erreicht ist. Danach scheint sich ein Gleichgewicht einzustellen, wenn man weiterhin davon ausgeht, dass NBTH₂ instabil ist. Das dies so ist, lässt sich auch an Hand der steigenden Streuung der Mittelwerte mit zunehmender Zeit ablesen.

5.5.16.6 Untersuchung zur lichtinduzierten Bildung von O₂[•] durch Furosemid

In Abbildung 97 sind die erhaltenen Ergebnisse für die mehrfache Bestrahlung (4x) von Furosemid in Anwesenheit von NBT dargestellt. Dabei konnte sowohl unter UVA- als auch unter UVB-Bestrahlung eine Bildung von NBTH₂ und damit O₂[•] gefunden werden. Wie auch schon bei den vorher untersuchten Arzneistoffen ist die Bildung von O₂[•] unter UVB-Bestrahlung schneller, außerdem fällt die Kurve nach Erreichen eines Maximums wieder ab.

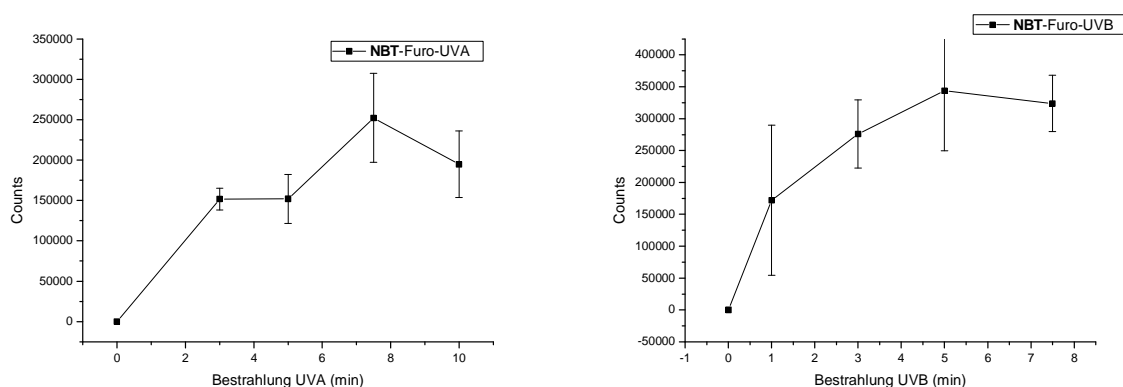


Abbildung 97: Peakflächen von NBTH₂ in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA- (links) bzw. UVB-Licht (rechts) in Anwesenheit von Furosemid

5.5.16.7 Untersuchung zur lichtinduzierten Bildung von O₂[•] durch Doxycyclin

Ähnlich wie bei Amiodaron wurde Doxycyclin nur mit UVB-Licht bestrahlt. Die mehrfache Bestrahlung von Doxycyclin mit UVB-Licht in Anwesenheit von NBT für 0; 1; 3; 5 und 7,5 Minuten führte nicht zum Nachweis von O₂[•] durch die Reduktion von NBT zu NBTH₂. Deswegen wurde auf eine Bestrahlung mit UVA-Licht verzichtet. In Abbildung 98 sind als Kontrolle die gefundenen Peakflächen für Doxycyclin dargestellt. Unter den gewählten Bedingungen kommt es zwar zur Photolyse von Doxycyclin, diese scheint aber nicht zur Bildung

von $O_2^{\bullet -}$ zu führen, auch wenn unter ähnlichen Bedingungen eine Bildung von 1O_2 bei Doxycyclin gefunden wurde.

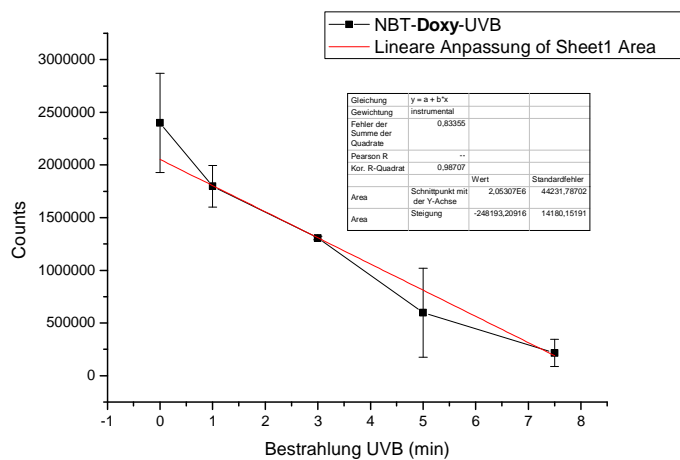


Abbildung 98: Peakflächen von Doxycyclin in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVB-Strahlung in Anwesenheit von NBT

5.5.17 Zusammenfassung der Untersuchungen zur Bildung von ROS von Arzneistoffen unter Lichteinfluss

Mit den entwickelten Methoden ist es möglich, das phototoxische Potential von Arzneistoffen über den Reaktionsweg der Bildung von Reaktiven Sauerstoff Spezies nachzuweisen. So konnte mit Hilfe von RNO und FFA die Bildung von $^1\text{O}_2$ verfolgt werden. Anhand der jeweiligen Zerfallskurve kann man Rückschlüsse auf die Stärke des phototoxischen Potentials ziehen. Denn je mehr ROS pro Zeiteinheit gebildet werden, desto größer die Gefahr der Zellschädigung. Diese Annahme wird auch dadurch bestätigt, weil die potenten Photosensitizer wie Ketoprofen, Furosemid und Doxycyclin die stärksten ROS-Bildungen zeigen. Außerdem ist es möglich, auf Grund der gefundenen Kinetiken der Arzneistoffe und deren Photoprodukte Aussagen zu machen, ob der Arzneistoff selbst $^1\text{O}_2$ produziert oder eines seiner Photoprodukte. Dies ist bei dem Nachweis auf $\text{O}_2^{\cdot-}$ nicht ohne weiteres möglich, da NBTH₂, welches detektiert wird, nicht direkt mit $\text{O}_2^{\cdot-}$ reagiert, sondern erst über mehrere Zwischenreaktionen gebildet wird (5.5.15).

Im Allgemeinen ist festzustellen, dass es mit Hilfe von NBT möglich ist, die Bildung von $\text{O}_2^{\cdot-}$ nachzuweisen und zu verfolgen, allerdings sind die Varianzen innerhalb der einzelnen Messpunkte sehr groß, so dass man nur einen Trend ausmachen kann. Generell konnte kein direkter Zusammenhang zwischen $^1\text{O}_2$ -Bildung und $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildung gefunden werden. So zeigte Ketoprofen zum Beispiel eine stärkere $^1\text{O}_2$ -Bildung als Naproxen, während Naproxen wiederum eine stärkere $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildung zeigte. Alle untersuchten Arzneistoffe, die $\text{O}_2^{\cdot-}$ bildeten, waren ebenfalls in der Lage, $^1\text{O}_2$ zu bilden, allerdings kann man auf Grund der geringen Stichprobenmenge keine zuverlässige Aussage über eine Korrelation zwischen den beiden ROS machen.

Durch den Einsatz von FFA und RNO konnten die Ergebnisse zur $^1\text{O}_2$ -Bildung gegenseitig bestätigt werden. Jedoch ist RNO FFA überlegen, da es bei 440 nm detektiert werden kann versus 220 nm bei FFA und damit selektiver ist. Der zweite und gewichtigere Vorteil von RNO gegenüber FFA ist, dass es keine Photodegradation gegenüber der eingesetzten Strahlung zeigt, während FFA einer leichten Photolyse unterliegt.

Durch die angewendeten Methoden kann das phototoxische Potential von Substanzen über ROS abgeschätzt werden. In Kombination mit der entwickelten ESR-Methode zur lichtinduzierten Radikalbildung von Substanzen ist der Großteil der möglichen Reaktionswege hin zur photosensitiven Hautreaktion abgedeckt. Nur ein möglicher Energietransfer vom Photosensitizer hin zu Biomolekülen kann so nicht erfasst werden (Vergleich Abbildung 2:

Schematische Darstellung über die möglichen Reaktionswege hin zur Photosensitivität (Moore 2002)).

5.6 Untersuchung des photochemischen Einflusses von Photosensitizer auf Biomoleküle

5.6.1 Einführung

Mit den in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Methoden sollte es möglich sein, die Reaktionswege über reaktive Sauerstoffspezies und radikalische Reaktionswege von Substanzen hin zu photosensitiven Hautreaktionen vorherzusagen. Allerdings ist es auch möglich, dass der Photosensitizer direkt über Energietransfer mit Biomolekülen reagiert. Auf Grund dessen sollten ausgewählte, als phototoxisch bekannte Substanzen in Anwesenheit von Proteinen mit Licht angeregt werden, um eine mögliche Reaktion mit Biomolekülen zu beobachten.

5.6.2 Calcitonin als Beispiel-Biomolekül

Calcitonin gehört zur Gruppe der Peptidhormone und wird in der Schilddrüse gebildet. Zum Einsatz kam das handelsübliche Calcitonin vom Lachs. Calcitonin greift in den Calciumstoffwechsel ein und ist ein Peptidhormon, das aus einer Kette von 32 Aminosäuren besteht. Es wurde als Beispiel-Biomolekül ausgewählt, da es im menschlichen Körper vorkommt. Es ist ein Polypeptid, das auch über Disulfidbrücken verfügt und damit durch Redoxreaktionen angreifbar ist.

5.6.3 Photostabilität von Calcitonin

Zur Überprüfung der Photostabilität wurde Calcitonin im wässrigen Phosphatpuffer pH 7,2 sowohl mit UVA- als auch mit UVB-Licht bestrahlt. Zum Einsatz kam das „Zwei-Säulen-System“. Um eine optimale Trennung zu gewährleisten, wurde dem wässrigen Phosphatpuffer 0,5% Trifluoressigsäure (TFA) zugesetzt. Wie auch schon bei den vorherigen Untersuchungen wurde der Fluss für die Bestrahlung gestoppt. Nach einer Anreicherungszeit von vier Minuten auf der ersten Säule wurde Calcitonin über die zweite Säule mittels eines Gradientenchromatographiert und bei 214 nm ausgewertet. Diese Methode kam bei allen Untersuchungen mit Calcitonin zur Anwendung.

	Zeit [min]	0	4	17	30
Pumpe 1 (1 ml/min)	Puffer %	100	100	100	100
Pumpe 2 (1 ml/min)	(Puffer +0,5% TFA) %	97	97	70	55
	Acetonitril %	3	10	35	45

Tabelle 16: Gradienten und Schaltprofil zur Untersuchung von Calcitonin

Calcitonin wurde für 0, 5, 10 und 15 Minuten mit UVA-Licht und für 0, 5, 10 und 20 Minuten mit UVB-Licht bestrahlt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 99 dargestellt. Während es bei der Bestrahlung mit UVB-Licht zu keinem erkennbaren Abbau von Calcitonin kommt, kommt es nur zu einem leichten Anstieg der Peakflächen auf Grund der schon diskutierten Diffusionsvorgänge im Photoreaktor in Abhängigkeit zur Zeit. So ist ein initialer Abfall von Calcitonin nach fünf Minuten Bestrahlung zu sehen, allerdings kommt es zu keiner weiteren Abnahme mit steigender Bestrahlungsdauer.

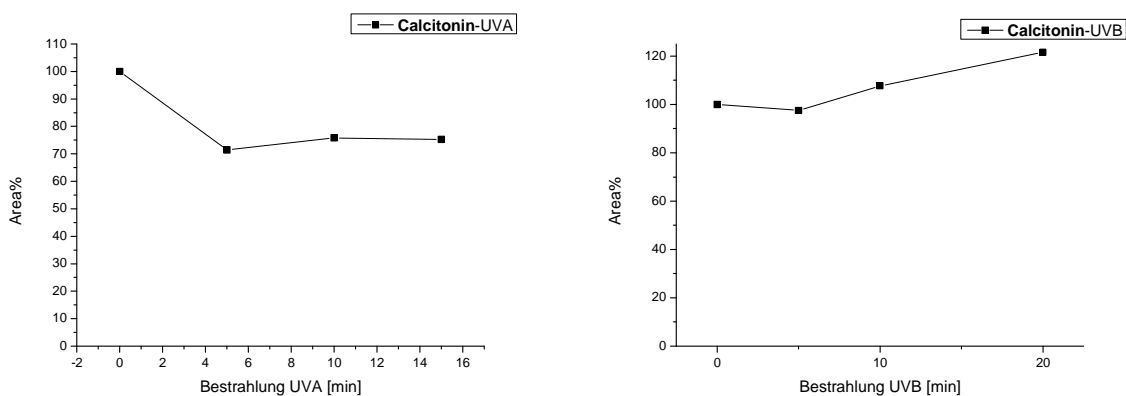


Abbildung 99: Peakflächen von Calcitonin in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer (links UVA-Licht; rechts UVB-Licht)

Da Calcitonin durch UVB-Licht gar nicht und durch UVA-Licht nur gering beeinflusst wurde, wird es als Testbiomolekül verwendet. Zum Nachweis der Reaktion von Calcitonin mit einem Photosensitizer, muss der Kurvenverlauf unter UVA-Bestrahlung signifikant verschieden zu dem dargestellten Verlauf in Abbildung 99 sein.

5.6.4 Bestrahlung von Ketoprofen in Anwesenheit von Calcitonin

Ketoprofen, welches sowohl in der Lage ist, Singulett-Sauerstoff als auch Superoxid Anionenradikale unter Lichteinwirkung zu bilden, wurde in Anwesenheit von Calcitonin für 0; 0,5; 1 und 2 Minuten mit UVA-Licht bestrahlt. Die erhaltenen Peakflächen für Calcitonin sind in Abbildung 100 dargestellt.

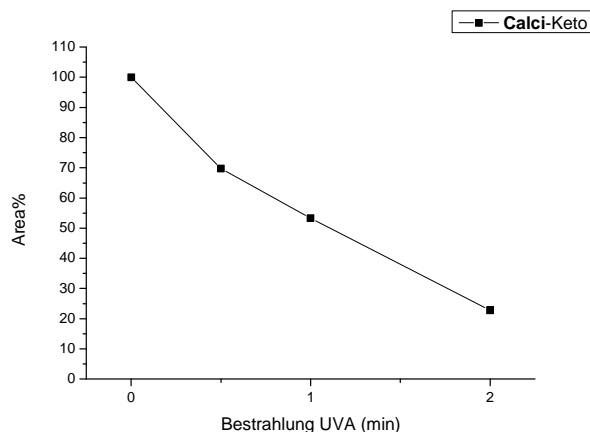


Abbildung 100: Peakflächen von Calcitonin in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht in Anwesenheit von Ketoprofen

Wie man am Verlauf der Konzentrationskurve von Calcitonin sehen kann, ist Ketoprofen bzw. eines seiner Photoprodukte in der Lage, Calcitonin anzugreifen und unter Lichteinfluss abzubauen. So sind nach einer Minute Bestrahlung nur noch 53% Calcitonin wiederzufinden und nach einer Bestrahlungsdauer von 2 Minuten nur noch 22%.

5.6.5 Bestrahlung von Naproxen in Anwesenheit von Calcitonin

Naproxen zeigte genau wie Ketoprofen in den vorhergegangenen Untersuchungen unter Lichteinfluss sowohl Singulett-Sauerstoff als auch Superoxid-Anionenradikale. Allerdings unterschieden sich beide NSAIDs in ihren jeweiligen Kinetiken, sowohl in ihrer Bildung an ROS als auch in ihrer Photostabilität.

Naproxen wurde für 0, 10 und 15 Minuten mit UVA-Licht und für 0, 5, 10 und 15 Minuten mit UVB-Licht in Anwesenheit von Calcitonin bestrahlt.

Wie man in Abbildung 101 sehen kann, kam es unter UVA-Einfluss zu keiner deutlichen Abnahme von Calcitonin, während es unter UVB-Einfluss zu einer kontinuierlichen Abnahme von Calcitonin kam.

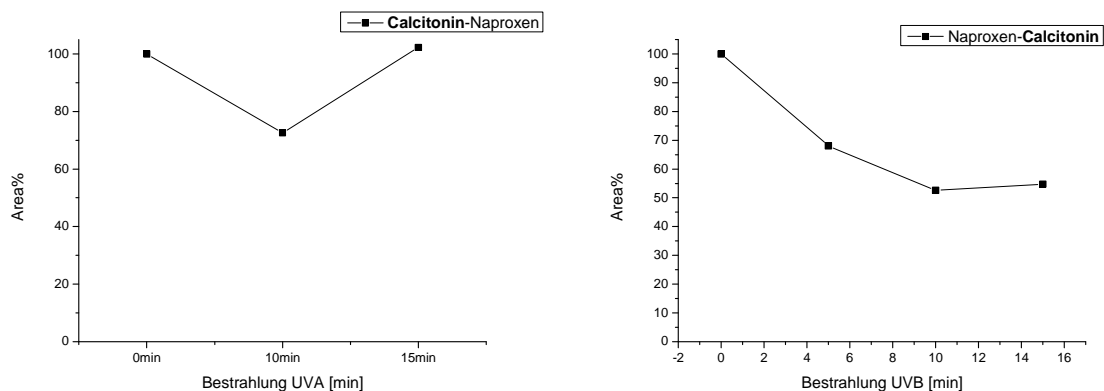


Abbildung 101: Peakflächen von Calcitonin in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht (links) und UVB-Licht (rechts) in Anwesenheit von Naproxen

Naproxen ist also genau wie Ketoprofen unter Lichteinfluss in der Lage, Calcitonin abzubauen, jedoch zeigte sich nur unter UVB Einfluss ein Abbau und er ist deutlich schwächer ausgeprägt als bei Ketoprofen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus der Untersuchung auf ROS-Bildung. So bildet auch dort Ketoprofen deutlich schneller und stärker reaktive Sauerstoffspezies. Es ist also davon auszugehen, dass die entstehenden ROS Calcitonin angreifen.

5.6.6 Bestrahlung von Diclofenac in Anwesenheit von Calcitonin

Diclofenac wurde in Anwesenheit von Calcitonin für 0, 20, 30, 60 und 180 Sekunden mit UVA-Licht und für 15, 30, 45 und 60 Sekunden mit UVB-Licht bestrahlt.

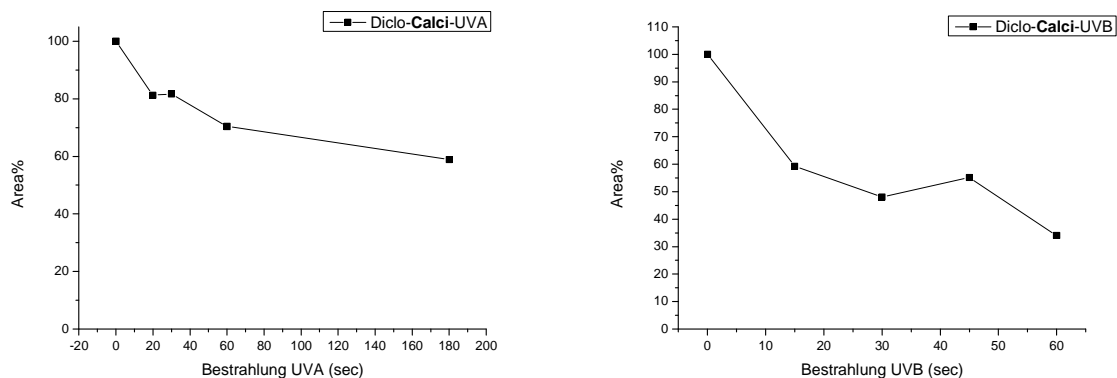


Abbildung 102: Peakflächen von Calcitonin in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht (links) und UVB-Licht (rechts) in Anwesenheit von Diclofenac

Wie man an Hand der dargestellten Peakflächen von Calcitonin in Abbildung 103 erkennen kann, wird Calcitonin sowohl unter UVB- als auch unter UVA-Licht vom angeregten Diclofenac oder einem seiner Photoprodukte abgebaut. Der Abbau geschieht unter UVB-Einwirkung deutlich schneller als unter UVA-Licht. Dies lässt sich damit erklären, dass, wie die vorherigen Ergebnisse zeigen, Diclofenac durch UVB-Licht stärker angeregt wird.

5.6.7 Bestrahlung von Nifedipin in Anwesenheit von Calcitonin

Im Gegensatz zu den vorher untersuchten Arzneistoffen bildet Nifedipin unter Lichteinfluss nicht nur ROS, sondern auch Radikale. Von daher ist zu erwarten, dass es zu anderen Ergebnissen kommt als bei den bisher untersuchten Arzneistoffen. Hierzu wurde Nifedipin in Gegenwart von Calcitonin für 0, 3, 5 und 7,5 Minuten mit UVA-Licht und für 0, 15, 30, 60 und 120 Sekunden mit UVB-Licht bestrahlt. Die erhaltenen Ergebnisse für Calcitonin sind in Abbildung 104 dargestellt.

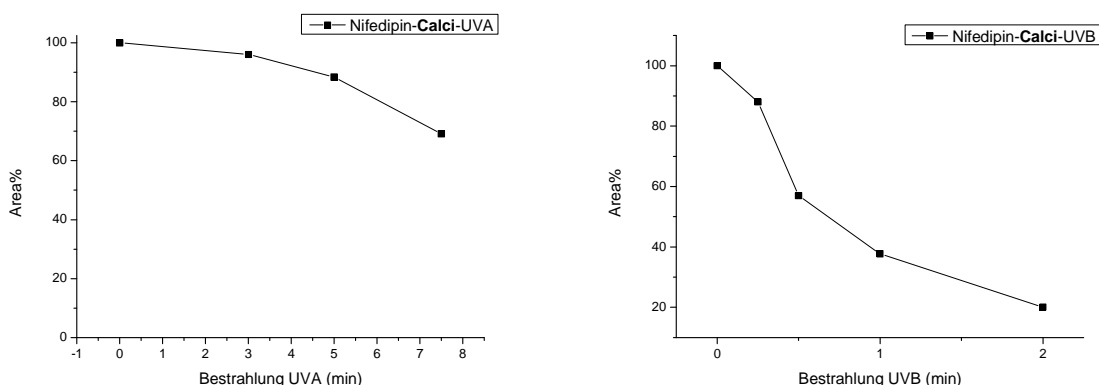


Abbildung 103: Peakflächen von Calcitonin in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht (links) und UVB-Licht (rechts) in Anwesenheit von Nifedipin

Unter UVA-Bestrahlung kommt es zu einem nur geringen Abbau von Calcitonin, der nicht aussagekräftig ist, wenn man bedenkt, dass Calcitonin unter alleiniger UVA-Bestrahlung ebenfalls eine leichte Abnahme zeigte. Ein anderes Bild ergibt sich jedoch unter UVB-Bestrahlung. Hier wird Calcitonin in Anwesenheit von Nifedipin sehr rasch abgebaut. So sind nach 30 Sekunden bereits nur noch ca. 57% ursprüngliches Calcitonin wiederzufinden und nach 60 Sekunden Bestrahlung nur noch 38%. Da die vorherigen Ergebnisse zeigten, dass Nifedipin unter UVA-Licht-Anregung ein Radikal bildet und es nur unter UVB-Licht zur ROS-Bildung bei Nifedipin kommt, liegt der Schluss nahe, dass Calcitonin vor allem durch

die ROS angegriffen wird. Bei einem Radikal vermittelten Abbau müsste sich ansonsten ebenfalls eine starke Verringerung der Peakfläche für Calcitonin unter UVA-Bestrahlung zeigen.

5.6.8 Bestrahlung von Doxycyclin in Anwesenheit von Calcitonin

Doxycyclin wurde in Anwesenheit von Calcitonin für 0, 5, 10, 15 und 20 Minuten mit UVA-Licht bestrahlt. Dabei zeigte sich, wie in Abbildung 104 dargestellt, dass Calcitonin vom durch Licht angeregten Doxycyclin nicht beeinflusst wird.

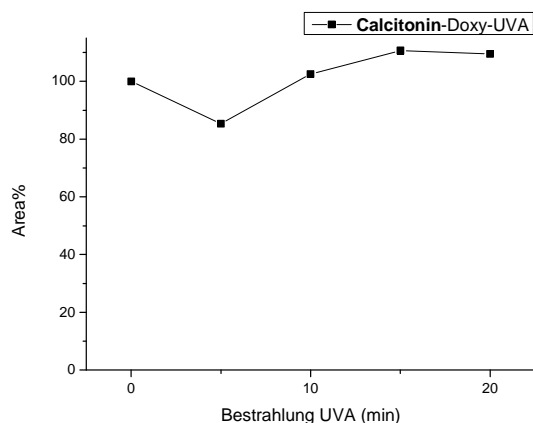


Abbildung 104: Peakflächen von Calcitonin in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht in Anwesenheit von Doxycyclin

Da Doxycyclin ein sehr potenter Photosensitizer ist, heißt dies im Umkehrschluss, dass ein negatives oder schwaches Ergebnis bei der Untersuchung des lichtinduzierten Angriffs auf Calcitonin nicht gleichzusetzen ist mit einem nicht vorhandenen phototoxischen Potential.

5.6.9 Bestrahlung von HCT in Anwesenheit von Calcitonin

Hydrochlorothiazid (HCT) kann auf verschiedene Wege als Photosensitizer wirken, auf der einen Seite über das freie Radikal und zum Anderen durch Bildung von Singulett-Sauerstoff. Auch zeigten Untersuchungen von Schröder 2006, dass HCT in der Lage ist, Tryptophan anzugreifen. Bei der Bestrahlung von HCT mit UVA-Licht in Anwesenheit von Calcitonin ließ sich dieses Ergebnis bestätigen.

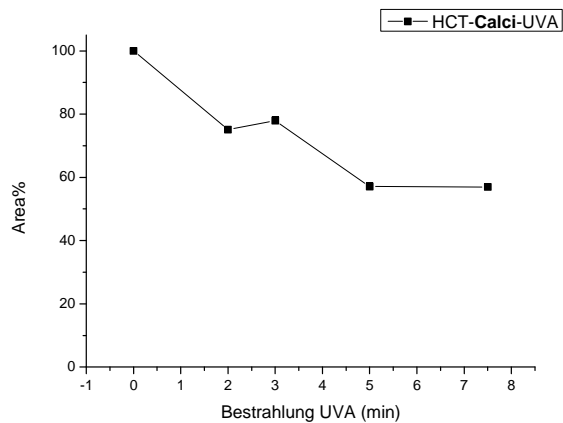


Abbildung 105: Peakflächen von Calcitonin in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht in Anwesenheit von HCT

So kann man in Abbildung 105 sehen, dass Calcitonin mit zunehmender Bestrahlungsdauer abnimmt. Ob dieser Abbau radikalvermittelt oder durch den gebildeten $^1\text{O}_2$ verursacht wird, lässt sich daraus nicht schließen.

5.6.10 Zusammenfassung der Untersuchungen des photochemischen Einflusses von Photosensitizern auf Biomoleküle

Es konnte nachgewiesen werden, dass die als phototoxisch geltenden Arzneistoffe mit Calcitonin reagieren. Dabei zeigten vor allem die Arzneistoffe einen starken vermittelten Abbau von Calcitonin, die eine starke ROS-Bildung zeigten. Das durch Licht induzierte, aus Nifedipin gebildete Radikal scheint keinen Einfluss auf Calcitonin zu haben. So erfolgt der Abbau von Calcitonin vor allem durch Redoxreaktion mit den reaktiven Sauerstoffspezies. Daher ist Calcitonin zur Testung auf photochemische Einflüsse durch Photosensitizer zwar geeignet, aber wie der Versuch mit Doxycyclin gezeigt hat, reagieren nicht alle Photosensitizer mit Calcitonin, so dass es zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann. Die Bestrahlung in Anwesenheit von Calcitonin kann also nur eine Ergänzung zu den anderen Verfahren sein und reicht allein nicht aus.

6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit, das photochemische Verhalten von Arzneistoffen gegenüber Licht und das damit verbundene photosensibilisierende Potential mittels instrumenteller Methoden einzuschätzen, wurde erfolgreich erreicht.

Dies geschah mit Hilfe der Weiterentwicklung einer bestehenden HPLC-Methode. So ist es jetzt möglich die Bildung von ROS bei der online Bestrahlung von Arzneistoffen mittels verschiedener Surrogat-Parameter zu detektieren und eine Kinetik zu erstellen. Die Bildung von Singulett-Sauerstoff unter Lichteinfluss wurde mit Hilfe von FFA und RNO an verschiedenen Arzneistoffen untersucht, dabei zeigten Ketoprofen, Furosemid und Doxycyclin die stärksten $^1\text{O}_2$ -Bildungen. Darüber hinaus ist es mit der erstellten Methode möglich festzustellen, ob der $^1\text{O}_2$ direkt vom Arzneistoff gebildet wird oder erst von einem seiner Photoprodukte. Die Bildung von Superoxidanionen wurde mit Hilfe von NBT ebenfalls online nachgewiesen.

Damit ist man in der Lage ein photosensibilisierendes Potential eines Arzneistoffes über eine Typ-II-Reaktion nach Foote vorhersagen zu können. Um ein photosensibilisierendes Potential eines Arzneistoffes über eine Typ-I-Reaktion vorhersagen zu können, wurde eine ESR-Methode entwickelt, indem der Arzneistoff in-situ bestrahlt und simultan ein Spektrum aufgenommen wurde. Anhand der untersuchten Arzneistoffe konnte gezeigt werden, dass es möglich ist eine Radikalbildung verursacht durch Licht zu detektieren und über die Zeit zu verfolgen. Damit können Aussagen über die Reaktivität und Lebensdauer der gebildeten Radikale getroffen werden. Außerdem ist man in der Lage zu detektieren, an welchem Atom sich das Radikal gebildet hat. Folglich ist es möglich zu unterscheiden, ob ein Arzneistoff über eine Typ-I- oder Typ-II-Reaktion phototoxisch wirkt oder sogar über beide Reaktionswege.

Ergänzend zu diesen Ergebnissen wurde das Verhalten der bestrahlten Arzneistoffe gegenüber Biomolekülen untersucht, als Modellmolekül wurde Calcitonin verwendet. Dabei zeigte sich, dass vor allem die Arzneistoffe die auch über eine ausgeprägte ROS-Bildung verfügen, einen starken Abbau von Calcitonin verursachen. Festzustellen war auch, dass nicht alle bekannten Photosensitizer, wie unter anderem Doxycyclin, einen Abbau von Calcitonin verursachen.

Durch das Kombinieren des Photoreaktors mit einem LC-ESI-TOF-System war es möglich entstandene Photoprodukte nachzuweisen und teilweise in der Literatur beschriebene Photoprodukte zuzuordnen. Ausgehend von diesen Ergebnissen verspricht eine Weiterentwicklung der Methode hingehend zum Einsatz eines MS-MS Detektors viel Potential, da damit sowohl die Nachweisgrenzen herabgesetzt werden würden, als es auch möglich ist die neugebildeten

Photoprodukte zu identifizieren und so Photoreaktionswege für verschiedene Substanzen zu erstellen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass im Vordergrund der entwickelten Methode ein Screening auf photoxisches oder photoallergenes Potential von Arzneistoffen oder anderen Substanzen steht. Durch die Nutzung dieser Screening-Methode ist es möglich bereits bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe ein phototoxisches oder photoallergenes Potential vorherzusagen und darüber hinaus auch über deren photochemischen Wirkungsmechanismus Aussagen zu tätigen.

7 Summary

The aim of this work to evaluate the photochemical behavior of drugs and their associated photosensitizing potential by instrumental methods was successfully achieved.

In this investigation, an HPLC method was developed, which makes it possible to determinate reactive oxygen species generated from photoirradiated drugs. This was achieved by using various surrogate parameters to detect and create kinetics for the reactive oxygen species. The formation of singlet oxygen under the influence of light was studied with the help of FFA and RNO to various drugs. In the process ketoprofen, furosemide and doxycycline showed the strongest $^1\text{O}_2$ formation. Furthermore, it is possible to determine with this method whether the $^1\text{O}_2$ is formed directly by the drug or by one of its photoproducts. The formation of superoxide was detected using NBT.

The described method allows predicting the photosensitive/phototoxic potential of a drug through a type II reaction. In order to predict the photosensitizing potential of a drug through a type I reaction an electron paramagnetic resonance method was developed. In the developed method, the drug was irradiated during simultaneous spectrum recordings. The result of the drug investigations showed, that it is possible to detect light-induced free radical formation over the time, thus, giving insights into the reactivity and durability of the radicals formed. Moreover, it is possible to determine the position at which the free radical is formed. Accordingly, it is possible to distinguish whether a drug reacts phototoxic via a type I or type II reaction.

In addition to these results, the behavior of irritated drugs in presence of biomolecules has been studied. Calcitonin has been used as a model molecule. It was found that especially the drugs which also showed a pronounced formation of reactive oxygen species, lead to a degradation of calcitonin. Not all tested photosensitizers, such as doxycycline, showed a degradation of calcitonin.

By combining the photoreactor with an LC-ESI-TOF system, resulting photoproducts were determined. These photoproducts could partially be assigned to the photodegradation products described in the literature. The results promise a further development of the method using an MS-MS detector to have a lot of potential, since both, the detection limit is reduced, and it is also possible to identify the newly formed photoproducts. Therefore, it should be possible to create photo-reaction pathways.

The main purpose of the developed method is the screening of the photosensitive and phototoxic potential of drugs and other substances. Through the use of this screening method, it will be possible to predict the phototoxic or photoallergic potential of pharmaceutical substances in early stage of development. Furthermore, statements about the photochemical mechanism of the drug can be made.

8 Experimenteller Teil

8.1 Chemikalien

Aceton	Fluka
Acetonitril	VWR
Acetonitril	Fisher Chemical
Allopurinol	Aluid-Pharma
Amiodaron	Aluid-Pharma
Calcitonin	Merck
Cetirizin	Aluid-Pharma
Chlorpromazinhydrochlorid	RodlebenPharma
Diclofenac-Natrium	Caelo
Doxycyclin	Aluid-Pharma
Eisen(II)sulfat Heptahydrat	Merck
Eisen(III)sulfat	Merck
Ethanol	Fluka
Furfurylalkohol	Merck
Furosemid	Aluid-Pharma
Hydrochlorothiazid	Fagron
Imidazol	Merck
Insulin	Merck
Kaliumchlorid-Lösung 3M	Fluka, Buchs (Schweiz)
Ketoprofen	Berlin-Chemie
Lercarnidipin	Berlin-Chemie
Loratadin	Aluid-Pharma
Methanol	VWR
Methanol	Fisher Chemical
Naproxen	Berlin-Chemie
Natriumhydroxid	Fluka
Nifedipin	Bayer
o-Phenanthrolin-Hydrochlorid	Fluka
Oxalsäure-Dihydrat	Merck
Phosphorsäure 85%	Fluka
p-Nitrosodimethylanilin	Merck
Pufferlösung pH 2,00	Mettler Toledo, Steinbach
Pufferlösung pH 4,00	Mettler Toledo, Steinbach
Pufferlösung pH 7,00	Mettler Toledo, Steinbach
Salzsäure 32%	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck
Simvastatin	Aluid-Pharma

8.2 Chromatographische Systeme

8.2.1 Ein-Säulen-System

Interface:	D-7000 Interface (Merck/ Hitachi)
Pumpe 1:	L-6200A Intelligent Pump (Merck/ Hitachi)
Detektor:	L-4500 Diode-Array Detektor

8.2.2 Zwei-Säulen-System

Interface:	D-7000 Interface (Merck/ Hitachi)
Pumpe 1:	L-6200A Intelligent Pump (Merck/ Hitachi)
Pumpe 2:	L-6200A Intelligent Pump (Merck/ Hitachi)
Detektor:	L-4500 Diode-Array Detektor

8.2.3 Säulenschaltung

Die Säulenschaltung setzt sich zusammen aus zwei 10 Port Schaltventilen (Modell E36-230, VICI AG Valco International), die in einen Jet Stream II Plus Säulenofen integriert sind. Das Umschalten der Ventile erfolgte vollautomatisch mit Hilfe des Interface und der Software der HPLC-Anlage.

8.2.4 LC-MS-System

Die Proben wurden mit einem Agilent 6210 ESI-TOF, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, gemessen. Die Sprayspannung betrug 4 kV. Das Desolvatisierungsgas wurde auf 15 psi (1 bar) gesetzt. Die Skimmer-Spannung betrug 65V, die des Fragmentors 200V.

8.3 Chromatographische Säulen

Phenomenex AquaTM, RP 18, 30 x 4,6mm, 5µm

Phenomenex Onyx monolythic C18 50 x 4,6 mm

8.4 Photoreaktor

Der Photoreaktor besteht aus folgenden Einzelteilen:

Aluminiumröhre (Länge 50 cm, Durchmesser 12 cm)

2 Kunststoffaufsätze gewinkelt

Heizlüfter der Firma ewt Klima 341 S

Temperaturfühler (Conrad Elektronik)

Die Reaktionsschleife besteht aus gehäckeltem Tefzel, 10 m x 0,254 mm

Lampen: Waldmann PUVA 8 Watt (288 mm)

Waldmann UV 21 8 Watt (288 mm)

Die Lampen wurden durch eine Schrankunterbauleuchte 8 W der Firma Conrad betrieben.

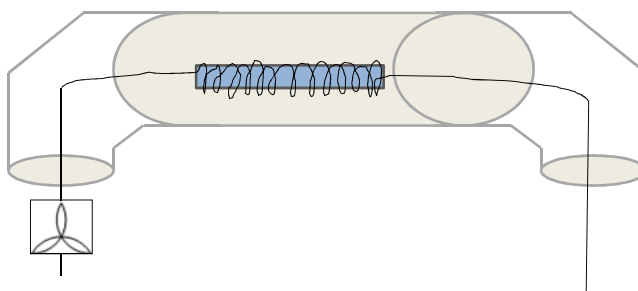


Abbildung 106: Skizze des Photoreaktors

8.5 Weiter Geräte

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 Pipettenspitze	Eppendorf-Netheler-Hinz
Digital pH Meter pH 525	WTW
pH-Einstabmesskette Typ-Nr. N 6280	Schott Geräte
LaboStar™	Siemens

8.6 Darstellung der Probelösungen

8.6.1 Bestimmung der Strahlungsintensität

Zur Bestimmung der Strahlungsintensität wurden folgende Lösungen hergestellt:

- 1) 0,12% Phenantrolin-Lösung
60mg o-Phenantrolin wurden in 60 ml Reinstwasser gelöst.
- 2) 1 M NaAcetat-Lösung
186,08g Natrimactetat wurden in 1L Reinstwasser gelöst
- 3) Fe(III)-Lösung ($6 \times 10^{-3} \text{M}$)
54mg Oxalsäure
250,7 mg Eisen(III)sulfat
10 ml 0,05 M Schwefelsäure
Ad 100 ml Reinstwasser
- 4) Fe(II)-Lösung ($4 \times 10^{-4} \text{M}$)
11,128 mg Eisen(II)sulfat
10 ml 0,05 M Schwefelsäure
ad 100 ml Reinstwasser

Die Bestrahlung der Fe(II)-Lösung erfolgte im Durchfluss. Hierzu wurden 20µl der Probe in das System injiziert und Δt bestrahlt. Nach Passage des Photoreaktors wurde die Probe in einem 2,0 ml Kolben aufgefangen und jeweils 500µl 0,12% Phenantrolin-Lösung und 500µl 1 M NaAcetat-Lösung hinzugegeben. Anschließend wurde die Probe auf 2,0 ml mit Wasser

aufgefüllt. Nach einer Wartezeit von 15 Minuten wurde die Probe jeweils dreimal bei 511 nm photometrisch vermessen.

Mit Hilfe der Fe(II)sulfat-Lösung, der 0,12% Phenantrolin-Lösung und 1 M NaAcetat-Lösung wurde eine Kalibrierungsgerade erstellt.

8.6.2 Untersuchung der Photostabilität

Darstellung der verschiedenen Probelösungen:

Ketoprofen	150µg/ml in wässrigem Phosphatpuffer
Naproxen	66,6µg/ml in wässrigem Phosphatpuffer
Amiodaron	300µg/ml in wässrigem Phosphatpuffer
Diclofenac	400µg/ml in wässrigem Phosphatpuffer
Hydrochlorothiazid	30µg/ml in wässrigem Phosphatpuffer
Furosemid	30µg/ml in wässrigem Phosphatpuffer
Doxycyclin	250µg/ml in wässrigem Phosphatpuffer; angelöst in verdünnter HCl, pH-Wert der Probelösung wurde am Ende auf 7,2 einge- stellt.
Simvastatin	300µg/ml in wässrigem Phosphatpuffer; angelöst in Acetonitril
H1-Antihistaminika	668µg/ml Cetirizin in wässrigem Phosphat- puffer; angelöst in Methanol 110µg/ml Loratadin in wässrigem Phosphat- puffer; angelöst in Methanol
Allopurinol	25µg/ml in wässrigem Phosphatpuffer

8.6.3 Untersuchung der photochemischen Stabilität mit Hilfe der LC-MS

Darstellung der verschiedenen Probelösungen:

Ketoprofen	50µg/ml in Wasser
Naproxen	25µg/ml in Wasser
Amiodaron	5 µg/ml in Wasser
Diclofenac	100µg/ml in Wasser
Furosemid	50µg/ml in Wasser
Nifedipin	50µg/ml in Wasser; angelöst in Aceton
Chlorpromazin	10µg/ml in Wasser

8.6.4 Untersuchung zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies mit Hilfe von RNO

Darstellung der verschiedenen Probelösungen:

Ketoprofen	150µg/ml Ketoprofen + 100µM RNO + 100µM Imidazol in wässrigem Phosphatpuffer
Naproxen	66,6µg/ml Naproxen + 50µM RNO + 50µM Imidazol in wässrigem Phosphatpuffer
Amiodaron	300µg/ml Amiodaron + 100µM RNO + 100µM Imidazol in wässrigem Phosphatpuffer
Diclofenac	400µg/ml Diclofenac + 150µM RNO + 150µM Imidazol in wässrigem Phosphatpuffer
Hydrochlorothiazid	30µg/ml HCT + 100µM RNO + 100µM Imidazol in wässrigem Phosphatpuffer

Furosemid	40µg/ml + 100µM RNO + 100µM Imidazol in wässrigem Phosphatpuffer
Doxycyclin	250µg/ml Doxycyclin + 150µM RNO + 150µM Imidazol in wässrigem Phosphatpuf- fer; Doxycyclin angelöst in verdünnter HCl, pH-Wert der Probelösung wurde am Ende auf 7,2 eingestellt.
Simvastatin	300µg/ml Simvastatin + 50µM RNO + 50µM Imidazol in wässrigem Phosphatpuf- fer; angelöst in Acetonitril
Nifedipin	180µg/ml Nifedipin+ 25µM RNO + 25µM Imidazol in Wasser; Nifedipin angelöst in Aceton
Lercarnidipin	200µg/ml Lercarnidipin + 12,5µM RNO + 12,5µM Imidazol in Wasser

8.6.5 Nachweis von Superoxid Anionenradikalen

Darstellung der verschiedenen Probelösungen:

Ketoprofen	150µg/ml Ketoprofen + 582,66 µg/ml NBT in wässrigem Phosphatpuffer
Naproxen	60µg/ml Naproxen in + 582,66 µg/ml NBT wässrigem Phosphatpuffer
Amiodaron	300µg/ml in wässrigem Phosphatpuffer
Diclofenac	200µg/ml Diclofenac + 582,66 µg/ml NBT in wässrigem Phosphatpuffer
Furosemid	120µg/ml Furosemid + 582,66 µg/ml NBT in wässrigem Phosphatpuffer
Doxycyclin	500µg/ml Doxycyclin + 582,66 µg/ml NBT in wässrigem Phosphatpuffer; angelöst in verdünnter HCl, pH-Wert der Probelösung wurde am Ende auf 7,2 eingestellt.

8.6.6 Alternativer Nachweis für Singulett-Sauerstoff mit Hilfe von FFA

Darstellung der verschiedenen Probelösungen:

Furfurylalkohol (FFA)	3,3µl/ml in Wasser
Ketoprofen	100µg/ml Ketoprofen + 3,3µl/ml FFA in wässrigem Phosphatpuffer
Naproxen	100µg/ml Naproxen + 3,3µl/ml FFA in wässrigem Phosphatpuffer
Diclofenac	100µg/ml Diclofenac + 3,3µl/ml FFA in wässrigem Phosphatpuffer

8.6.7 Untersuchung des photochemischen Einflusses von Photosensitizer auf Biomoleküle

Darstellung der verschiedenen Probelösungen:

Calcitonin	0,1 mg/ml Calcitonin in wässrigem Phosphatpuffer
Ketoprofen	75µg/ml Ketoprofen + 175µg/ml Calcitonin in wässrigem Phosphatpuffer
Naproxen	50µg/ml Naproxen + 100µg/ml Calcitonin in wässrigem Phosphatpuffer
Diclofenac	400µg/ml Diclofenac + 200µg/ml Calcitonin in wässrigem Phosphatpuffer
Hydrochlorothiazid	50µg/ml HCT + 200µg/ml Calcitonin in wässrigem Phosphatpuffer
Doxycyclin	250µg/ml + 100µg/ml Calcitonin in wässrigem Phosphatpuffer; Doxycyclin angelöst in verdünnter HCl, pH-Wert der Probelösung

wurde am Ende auf 7,2 eingestellt.

Nifedipin 200µg/ml Nifedipin+ 300µg/ml Calcitonin in wässrigem Phosphatpuffer; Nifedipin angelöst in Aceton

8.7 Phosphatpuffer

Der Phosphatpuffer wurde hergestellt, indem zu 900ml Reinstwasser 0,490g konzentrierte Phosphorsäure 85% hinzugegeben wurde. Anschließend wurde der pH-Wert mit Hilfe einer 0,5 mol/L Natriumhydroxid-Lösung mittels einer Glaselektrode auf pH 7,2 eingestellt und auf 1000,0 ml mit Reinstwasser aufgefüllt.

9 Lebenslauf

10 Anhang

Spektrum der Standardsonne nach COLIPA (Körperpflege 1995) inklusive der Umrechnung von der Bestrahlungsstärke [$\mu\text{Wcm}^{-2}\text{nm}^{-1}$] in den Photonenfluss [$\text{Es}^{-2}\text{cm}^{-2}\text{nm}^{-1}$] (Parlar 2000)

Wellenlänge [nm]	Bestrahlungsstärke [$\mu\text{Wcm}^{-2}\text{nm}^{-1}$]	Photonenfluss [$\text{Es}^{-2}\text{cm}^{-2}\text{nm}^{-1}$]	Wellenlänge [nm]	Bestrahlungsstärke [$\mu\text{Wcm}^{-2}\text{nm}^{-1}$]	Photonenfluss [$\text{Es}^{-2}\text{cm}^{-2}\text{nm}^{-1}$]
290	3,09E-04	7,49E-16	346	53,4	1,54E-10
292	0,00285	6,95E-15	348	53,7	1,56E-10
294	0,0292	7,17E-14	350	55,9	1,63E-10
296	0,128	3,17E-13	352	58,9	1,73E-10
298	0,337	8,39E-13	354	61,3	1,81E-10
300	0,864	2,17E-12	356	60,6	1,80E-10
302	0,236	5,95E-13	358	53,8	1,61E-10
304	4,35	1,10E-11	360	56,4	1,70E-10
306	7,19	1,84E-11	362	60	1,81E-10
308	9,68	2,49E-11	364	64,8	1,97E-10
310	13,4	3,47E-11	366	71,8	2,20E-10
312	17,5	4,56E-11	368	76,2	2,34E-10
314	21,3	5,59E-11	370	76,6	2,37E-10
316	24,3	6,42E-11	372	75	2,33E-10
318	27,9	7,41E-11	374	66,1	2,07E-10
320	31,4	8,39E-11	376	66,6	2,09E-10
322	33,2	8,93E-11	378	74,6	2,36E-10
324	36,1	9,77E-11	380	75,4	2,39E-10
326	44,5	1,21E-10	382	64,2	2,05E-10
328	50,1	1,37E-10	384	58,5	1,88E-10
330	53,2	1,47E-10	386	62,6	2,02E-10
332	53,3	1,48E-10	388	67,2	2,18E-10
334	52,3	1,46E-10	390	75,7	2,47E-10
336	50,4	1,41E-10	392	71,6	2,34E-10
338	49,9	1,41E-10	394	65,5	2,16E-10
340	53,9	1,53E-10	396	68,1	2,25E-10
342	55,9	1,60E-10	398	80,1	2,66E-10
344	53,5	1,54E-10	400	101	3,38E-10

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : Jablonski Schemata.....	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung über die möglichen Reaktionswege hin zur Photosensitivität (Moore 2002).....	8
Abbildung 3: Photochemischer Abbau von Chlorpromazin (Gocke 1996).....	10
Abbildung 4: Photochemische Reaktionen von Benzophenonen.....	11
Abbildung 5: Photodegradation von Ketoprofen	13
Abbildung 6: Photodegradation von Amiodaron.....	14
Abbildung 7:Schematische Darstellung der Photodegradation von Furosemid	16
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Photodegradation von Naproxen (Moore 2002)	18
Abbildung 9: Reduktionskette von molekularem Sauerstoff	18
Abbildung 10: Darstellung der Energieniveaus eines ungepaarten Elektrons als Funktion des angelegten magnetischen Feld B (Weil and Bolton 2007)	22
Abbildung 11: Apparativer Aufbau des HPLC online System mit Säulenschaltung.....	23
Abbildung 12: Apparativer Aufbau des HPLC online System mit einer Säule.....	24
Abbildung 13: Spektren des von den eingesetzten Lampen emittierten Lichtes.....	25
Abbildung 14 : Kalibriergerade zur Absorption von Fe^{2+} mit 0,12% Phenantrolin-Lösung.....	28
Abbildung 15 Bildung von Fe^{2+} nach Bestrahlung der Aktinometerlösung im Durchfluss in einer PTFE-Kapillare mit UVA/UVB.....	29
Abbildung 16 Photoenflux der Standardsonne in Abhängigkeit der Wellenlänge im Vergleich zu dem ermittelten Photonenflux der eingesetzten UVA- und UVB-Quelle * 100.....	33
Abbildung 17: Abbau von Ketoprofen unter UVA-Bestrahlung	36
Abbildung 18: Abbau von Ketoprofen unter UVB-Bestrahlung	37
Abbildung 19: Chromatogramme von Ketoprofen ohne und mit Bestrahlung	38
Abbildung 20: DAD-Spektren der markierten Peaks in Abbildung 19	39
Abbildung 21: Photolytischer Abbau von Naproxen unter UVA- und UVB-Bestrahlung	40
Abbildung 22: Chromatogramm von Naproxen nach 10 Minuten UVA-Bestrahlung	41
Abbildung 23: DAD-Plot von Naproxen nach 10 minütiger UVA-Bestrahlung	41
Abbildung 24: Abbau von Amiodaron unter UVA-Bestrahlung.....	43
Abbildung 25: Abbau von Amiodaron unter UVB-Bestrahlung	43
Abbildung 26: Chromatogramme von der injizierten Diclofenac-Lösung unbestrahlt und nach fünf.minütiger UVA-Bestrahlung.....	45

Abbildung 27: Photolytischer Abbau von Diclofenac unter UVA, inklusive Konzentrationsverlauf von Photoprodukt 1 und 2.....	46
Abbildung 28: Kinetik von Diclofenac unter UVB-Bestrahlung	46
Abbildung 29: DAD-Plot von einer wässrigen Diclofenac Probe nach UVA-Bestrahlung.....	47
Abbildung 30: DAD-Plot von einer wässrigen Diclofenac Probe nach UVB-Bestrahlung	47
Abbildung 31: Photolyse einer wässrigen Hydrochlorothiazid-Lösung gepuffert bei pH 7,2 unter Belichtung mit UVA	49
Abbildung 32: Photolyse einer wässrigen Hydrochlorothiazid-Lösung gepuffert bei pH 7,2 unter Belichtung mit UVB	49
Abbildung 33: Abbau von Furosemid unter UVA-Bestrahlung	51
Abbildung 34: Abbau von Furosemid unter UVB-Bestrahlung	52
Abbildung 35: Doxy mit UVA belichtet.....	54
Abbildung 36: Doxy mit UVB belichtet	54
Abbildung 37: Chromatogramm von Doxycyclin nach 10 min UVB-Bestrahlung detektiert bei 254 nm.....	55
Abbildung 38: Photodegradation von Simvastatin in wässriger Lösung in Abhängigkeit von UVA- und UVB-Bestrahlung.	57
Abbildung 39: Chromatogramme von Simvastatin unbestrahlt und bestrahlt mit UVA und UVB. Detektionsquellenlänge ist 238 nm.	58
Abbildung 40: DAD-Plot von Simvastatin nach 10 Minuten UVB-Bestrahlung.....	59
Abbildung 41: Chromatogramme (geglättet) zur Untersuchung der Stabilität von Simvastatin gegenüber thermischen Einflüssen	60
Abbildung 42: Peakflächen von Loratadin und Cetirizin in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht	61
Abbildung 43: Peakflächen von Loratadin und Cetirizin in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVB-Licht	62
Abbildung 44: Peakflächen von Allopurinol in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA bzw. UVB-Licht	63
Abbildung 45: Ketoprofen ESI-TOF-Spektrum.....	67
Abbildung 46: ESI-TOF-Spektrum direkt nach 3,5 Minuten UVA online Bestrahlung von Ketoprofen.....	67
Abbildung 47: Naproxen ESI-TOF-Spektrum	68
Abbildung 48: ESI-TOF-Spektrum direkt nach 3,5 Minuten UVA online Bestrahlung von Naproxen	69
Abbildung 49: modifiziertes ESI-TOF-Spektrum; das erhaltenen Spektrum aus Abbildung 47 wurde von dem ESI-TOF-Spektrum in Abbildung 48 abgezogen	69
Abbildung 50: Amiodaron ESI-TOF-Spektrum	70
Abbildung 51: ESI-TOF-Spektrum direkt nach 3,5 Minuten UVA online Bestrahlung von Amiodaron	70

Abbildung 52: Diclofenac ESI-TOF-Spektrum.....	71
Abbildung 53: ESI-TOF-Spektrum direkt nach 3,5 Minuten UVA online Bestrahlung von Diclofenac	71
Abbildung 54: modifiziertes ESI-TOF-Spektrum; das erhaltenen Spektrum aus Abbildung 52 wurde von dem ESI-TOF-Spektrum in Abbildung 53 abgezogen	72
Abbildung 55: Furosemid ESI-TOF-Spektrum.....	72
Abbildung 56: ESI-TOF-Spektrum direkt nach 3,5 Minuten UVA online Bestrahlung von Furosemid.....	73
Abbildung 57: Nifedipin ESI-TOF-Spektrum.....	74
Abbildung 58: Nifedipin ESI-TOF-Spektrum direkt nach 3,5 Minuten UVA online Bestrahlung.....	74
Abbildung 59: Lichtinduzierte intramolekulare Redoxreaktion von Nifedipin.....	75
Abbildung 60: Chlorpromazin ESI-TOF-Spektrum.....	76
Abbildung 61: Chlorpromazin ESI-TOF-Spektrum direkt nach 6 Minuten UVA online Bestrahlung.....	77
Abbildung 62: Schema zum Aufbau des ESR Versuches.....	79
Abbildung 63: Allopurinol ESR-Spektren-Aufnahmen unter UVB-Bestrahlung	80
Abbildung 64: Radikalbildung durch Bestrahlung von Chlorpromazin mit Licht im UVA-Bereich über die Zeit.....	82
Abbildung 65: Chlorpromazin-Spektren während und nach der Bestrahlung mit UVA	83
Abbildung 66: Nifedipin Spektren während der kontinuierlichen Bestrahlung mit UVA (ein Spektrum/Minute) inklusive graphische Darstellung des Peakhöhenverlaufs.....	84
Abbildung 67: Nifedipin Kinetik	85
Abbildung 68: Dargestellt sind die über 10 Minuten aufsummierten Amiodaronspektren während der UVA Bestrahlung	86
Abbildung 69: Photochemische Stabilität von RNO gegenüber UVA-Licht.....	90
Abbildung 70: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht in Anwesenheit von Ketoprofen	91
Abbildung 71: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVB-Licht in Anwesenheit von Ketoprofen	92
Abbildung 72: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht in Anwesenheit von Naproxen.....	93
Abbildung 73: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVB-Licht in Anwesenheit von Naproxen.....	93
Abbildung 74: Peakflächen von RNO (links) und Amiodaron (rechts) in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht.....	94
Abbildung 75: Peakflächen von RNO (links) und Amiodaron (rechts) in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVB-Licht	94

Abbildung 76: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht in Anwesenheit von Diclofenac	95
Abbildung 77: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVB-Licht in Anwesenheit von Diclofenac	96
Abbildung 78: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht in Anwesenheit von HCT.....	97
Abbildung 79: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVB-Licht in Anwesenheit von HCT.....	97
Abbildung 80: Peakflächen von RNO (rot) und Furosemid (schwarz) in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA (links) bzw. UVB-Licht (rechts).....	98
Abbildung 81: Peakflächen von RNO in Anwesenheit von Furosemid in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA (links) bzw. UVB-Licht (rechts).....	98
Abbildung 82: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA- (links) bzw. UVB-Licht (rechts) in Anwesenheit von Doxycyclin	99
Abbildung 83: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA (links) bzw. UVB-Licht (rechts) in Anwesenheit von Simvastatin	100
Abbildung 84: Peakflächen von RNO in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA (links) bzw. UVB-Licht (rechts) in Anwesenheit von Nifedipin.....	102
Abbildung 85: Peakflächen von RNO (links) und Lercarnidipin (rechts) in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht	103
Abbildung 86: Peakflächen von RNO (links) und Lercarnidipin (rechts) in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVB-Licht	103
Abbildung 87: Photochemische Stabilität von FFA gegenüber UVA- (links) und UVB(rechts)-Licht	106
Abbildung 88: Peakflächen von FFA (schwarz) und Ketoprofen (rot) in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht.....	107
Abbildung 89: Peakflächen von FFA (schwarz) und Ketoprofen (rot) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer mit UVB-Licht	107
Abbildung 90: Peakflächen von FFA in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer in Anwesenheit von Naproxen (links UVA-Licht; rechts UVB-Licht).....	108
Abbildung 91: : Peakflächen von FFA in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer in Anwesenheit von Diclofenac (Diclo) (links UVA-Licht; rechts UVB-Licht).....	109
Abbildung 92: Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	110
Abbildung 93: Peakflächen von NBTH ₂ in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA (links) bzw. UVB-Licht (rechts) in Anwesenheit von Ketoprofen	112
Abbildung 94: Peakflächen von NBTH ₂ in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA- (links) bzw. UVB-Licht (rechts) in Anwesenheit von Naproxen.....	113

Abbildung 95: Peakflächen von NBTH ₂ in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVB-Strahlung in Anwesenheit von Amiodaron.....	114
Abbildung 96: Peakflächen von NBTH ₂ in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA- (links) bzw. UVB-Licht (rechts) in Anwesenheit von Diclofenac	114
Abbildung 97: Peakflächen von NBTH ₂ in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA- (links) bzw. UVB-Licht (rechts) in Anwesenheit von Furosemid	115
Abbildung 98: Peakflächen von Doxycyclin in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVB-Strahlung in Anwesenheit von NBT	116
Abbildung 99: Peakflächen von Calcitonin in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer (links UVA-Licht; rechts UVB-Licht)	120
Abbildung 100: Peakflächen von Calcitonin in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht in Anwesenheit von Ketoprofen.....	121
Abbildung 101: Peakflächen von Calcitonin in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht (links) und UVB-Licht (rechts) in Anwesenheit von Naproxen	122
Abbildung 102: Peakflächen von Calcitonin in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht (links) und UVB-Licht (rechts) in Anwesenheit von Diclofenac	122
Abbildung 103: Peakflächen von Calcitonin in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht (links) und UVB-Licht (rechts) in Anwesenheit von Nifedipin.....	123
Abbildung 104: Peakflächen von Calcitonin in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht in Anwesenheit von Doxycyclin	124
Abbildung 105: Peakflächen von Calcitonin in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer mit UVA-Licht in Anwesenheit von HCT	125
Abbildung 106: Skizze des Photoreaktors.....	133

12 Literaturverzeichnis

- Abe, T., J. Mayuzumi, et al. (1980). "Seasonal Variations in Skin Temperature, Skin pH, Evaporative Water Loss and Skin Surface Lipid Values on Human Skin." Chemical & pharmaceutical bulletin **28**(2): 387-392.
- Anderson, R. R. and J. A. Parrish (1981). "The Optics of Human Skin." J Investig Dermatol **77**(1): 13-19.
- Artuso, T., J. Bernadou, et al. (1991). "MECHANISM OF DNA CLEAVAGE MEDIATED BY PHOTOEXCITED NON-STEROIDAL ANTIINFLAMMATORY DRUGS." Photochemistry and photobiology **54**(2): 205-213.
- Balasubramanian, D., X. Du, et al. (1990). "The reaction of singlet oxygen with proteins, with special reference to crystallins." Photochemistry and photobiology **52**(4): 761-768.
- Bandyopadhyay, U., D. Das, et al. (1999). "Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis." CURRENT SCIENCE-BANGALORE- **77**: 658-666.
- Beck, G., K. Kessler, et al. (1990). "Synthesis and biological activity of new HMG-CoA reductase inhibitors. 1. Lactones of pyridine- and pyrimidine-substituted 3, 5-dihydroxy-6-heptenoic (-heptanoic) acids." Journal of medicinal chemistry **33**(1): 52-60.
- Becker, H. G. O. B., H.; Dietz, F.; Rehorek, D.; Roewer, G.; Schiller, K.; Timpe, H.J. (1991). Einführung in die Photochemie; Becker, H.G.O. (ed.), 3. Auflage. Berlin, Deutscher Verlag der Wissenschaften.
- Becker, L., B. Eberlein-König, et al. (1996). "Phototoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: in vitro studies with visible light." Acta dermato-venereologica **76**(5): 337.
- Bjellerup, M. and B. Ljunggren (1994). "Differences in phototoxic potency should be considered when tetracyclines are prescribed during summer-time. A study on doxycycline and lymecycline in human volunteers, using an objective method for recording erythema." British Journal of Dermatology **130**(3): 356-360.
- Blackshear, J. and H. Randle (1991). Reversibility of blue-gray cutaneous discoloration from amiodarone.
- Boscá, F. and M. A. Miranda (1998). "New Trends in Photobiology (Invited Review) Photosensitizing drugs containing the benzophenone chromophore." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **43**(1): 1-26.
- Boscá, F., M. A. Miranda, et al. (1994). "Photochemical and photobiological properties of ketoprofen associated with the benzophenone chromophore." Photochemistry and photobiology **60**(2): 96-101.
- Bowman, W. and J. Demas (1976). "Ferrioxalate actinometry. A warning on its correct use." The Journal of Physical Chemistry **80**(21): 2434-2435.
- Brinkman, U., P. Welling, et al. (1981). "Liquid chromatography of demoxepam and phenothiazines using a post-column photochemical reactor and fluorescence detection." Journal of Chromatography A **217**: 463-471.
- Budac, D. and P. Wan (1992). "Photodecarboxylation: mechanism and synthetic utility." Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry **67**(2): 135-166.
- Buehler, E. (1985). "A rationale for the selection of occlusion to induce and elicit delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. A prospective test." Current problems in dermatology **14**: 39.
- BURRY, J. N. and J. R. LAWRENCE (1976). "Phototoxic blisters from high frusemide dosage." British Journal of Dermatology **94**(5): 495-499.

- Buxton, G. V., C. L. Greenstock, et al. (1988). "Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals." Phys. Chem. Ref. Data **17**: 513-886.
- Cadet, J., J. L. Ravanat, et al. (2006). "Singlet oxygen oxidation of isolated and cellular DNA: product formation and mechanistic insights." Photochemistry and photobiology **82**(5): 1219-1225.
- Canudas, N. and C. Contreras (2002). "Isolation and identification of the photodegradation products of the photosensitizing antidepressant drug clomipramine. Phototoxicity studies on erythrocytes." Pharmazie **57**(6): 405-408.
- Cheng, H. Y., P. H. Sackett, et al. (1978). "Reactions of chlorpromazine cation radical with physiologically occurring nucleophiles." Journal of Medicinal Chemistry **21**(9): 948-952.
- Ciulla, T. A., G. A. Epling, et al. (1986). "PHOTOADDITION OF CHLORPROMAZINE TO GUANOSINE-5'-MONOPHOSPHATE." Photochemistry and Photobiology **43**(6): 607-613.
- Condorelli, G., G. De Guidi, et al. (1993). "Photosensitizing action of nonsteroidal antiinflammatory drugs on cell membranes and design of protective systems." Coordination chemistry reviews **125**(1-2): 115-127.
- Cosa, G., M. Lukeman, et al. (2009). "How drug photodegradation studies led to the promise of new therapies and some fundamental carbanion reaction dynamics along the way." Accounts of chemical research **42**(5): 599-607.
- Costanzo, L., G. De Guidi, et al. (1989). "Molecular mechanism of naproxen photosensitization in red blood cells." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **3**(2): 223-235.
- Costanzo, L., G. D. Guidi, et al. (1989). "MOLECULAR MECHANISM OF DRUG PHOTSENSITIZATION-II. PHOTOHEMOLYSIS SENSITIZED BY KETOPROFEN." Photochemistry and photobiology **50**(3): 359-365.
- Dat, J., S. Vandenabeele, et al. (2000). "Dual action of the active oxygen species during plant stress responses." Cellular and Molecular Life Sciences **57**(5): 779-795.
- Davies, M. J. (2004). "Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen." Photochem. Photobiol. Sci. **3**(1): 17-25.
- Dean, R., S. Fu, et al. (1997). "Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation." Biochemical Journal **324**(Pt 1): 1.
- Diffey, B., T. Daymond, et al. (1983). "Phototoxic reactions to piroxicam, naproxen and tiaprofenic acid." Rheumatology **22**(4): 239-242.
- Drugge R, D. H. (2003). "Electronic textbook of dermatology. botanical dermatology – phytophotodermatitis." from <http://www.telemicine.org/botanical/bot5htm>.
- Encinas, S., F. Bosca, et al. (1998). "Phototoxicity Associated with Diclofenac: A Photophysical, Photochemical, and Photobiological Study on the Drug and Its Photoproducts." Chem. Res. Toxicol. **11**(Copyright (C) 2013 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 946-952.
- Epstein, J., I. K. C. Photomedicine, et al. (1989). *Science of Photobiology*, Plenum Press, New York and London.
- Epstein, J. H. (1983). "Phototoxicity and photoallergy in man." Journal of the American Academy of Dermatology **8**(2): 141-147.
- Epstein, S. (1968). "Chlorpromazine Photosensitivity: Phototoxic and Photoallergic Reactions." Arch Dermatol **98**(4): 354-363.

- Eriksson, J., J. Svanfelt, et al. (2010). "A photochemical study of diclofenac and its major transformation products." Photochem. Photobiol. **86**(Copyright (C) 2013 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 528-532.
- Escousse, A., M. J. Jean-Pastor, et al. (2002). "Retrospective of national pharmacovigilance surveys on drug-induced bullous, vesicular eruptions: methods and results." Therapie **57**(Copyright (C) 2013 U.S. National Library of Medicine.): 269-272.
- Filipescu, N. and F. L. Minn (1968). "Photoreduction of benzophenone in isopropyl alcohol." Journal of the American Chemical Society **90**(6): 1544-1547.
- Fitzpatrick, T., M. Pathak, et al. (1963). "Abnormal reactions of man to light." Annual review of medicine **14**(1): 195-214.
- Foote, C. S. (1991). "DEFINITION OF TYPE I and TYPE II PHOTSENSITIZED OXIDATION." Photochemistry and Photobiology **54**(5): 659-659.
- Frost, P., G. D. Weinstein, et al. (1972). "Phototoxic potential of minocycline and doxycycline." Arch Dermatol **105**(Copyright (C) 2013 U.S. National Library of Medicine.): 681-683.
- Gibbs, N. K., N. J. Traynor, et al. (1992). "< i> In vitro</i> phototoxicity of nifedipine: Sequential induction of toxic and non-toxic photoproducts with UVA radiation." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **13**(3): 275-288.
- Gocke, E. (1996). "Review of the genotoxic properties of chlorpromazine and related phenothiazines." Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology **366**(1): 9-21.
- Gollnick, K. (1968). "Type II photooxygenation reactions in solution." Adv. Photochem **6**(1).
- Gomes, L. F., I. M. Cuccovia, et al. (1993). "Permeation of superoxide anion through the bilayer of vesicles of a synthetic amphiphile." Biochim Biophys Acta **10**(1): 78-82.
- González, E. and S. González (1996). "Drug photosensitivity, idiopathic photodermatoses, and sunscreens." Journal of the American Academy of Dermatology **35**(6): 871-885.
- Görlitzer, K., P.-M. Dobberkau, et al. (1996). "Fünfring-Analoga von Nifedipin. 2. Mitteilung: Zur Photochemie von 2, 6-Dimethyl-1, 4-dihydropyridin-3, 5-dicarbonsäuredimethylestern mit 4-(2-Nitro-3-furyl)-und 4-(2-Nitro-3-thienyl)-Substituenten." Pharmazie **51**(6): 392-396.
- Goskowicz, M. O., S. F. Friedlander, et al. (1994). "Endemic "Lime" Disease: Phytophotodermatitis in San Diego County." Pediatrics **93**(5): 828-830.
- Gould, J. W., M. G. Mercurio, et al. (1995). "Cutaneous photosensitivity diseases induced by exogenous agents." Journal of the American Academy of Dermatology **33**(4): 551-573.
- Granados, M., C. Torre, et al. (1998). "Chronic actinic dermatitis due to simvastatin." Contact dermatitis **38**(5): 294-295.
- Gutierrez-Gonzalez, E., L. Rodriguez-Pazos, et al. (2011). "Photosensitivity induced by naproxen." Photodermatol., Photoimmunol. Photomed. **27**(Copyright (C) 2013 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 338-340.
- Haag, W. R. and J. Hoigne (1986). "Singlet oxygen in surface waters. 3. Photochemical formation and steady-state concentrations in various types of waters." Environmental science & technology **20**(4): 341-348.
- Halliwell, B. and J. Gutteridge (1984). "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease." Biochemical Journal **219**(1): 1.
- Harber, L. C., A. M. Lashinsky, et al. (1959). "Photosensitivity due to chlorothiazide and hydrochlorothiazide." N Engl J Med **261**(Copyright (C) 2013 U.S. National Library of Medicine.): 1378-1381.

- HASAN, T., I. E Kochevar, et al. (1984). "Amiodarone phototoxicity to human erythrocytes and lymphocytes." Photochemistry and photobiology **40**(6): 715-720.
- Hatchard, C. and C. Parker (1956). "A new sensitive chemical actinometer. II. Potassium ferrioxalate as a standard chemical actinometer." Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences **235**(1203): 518-536.
- Henry, P. D. (1980). "Comparative pharmacology of calcium antagonists: nifedipine, verapamil and diltiazem." The American journal of cardiology **46**(6): 1047-1058.
- Heydenreich, G., T. Pindborg, et al. (1977). "Bullous dermatosis among patients with chronic renal failure on high dose frusemide." Acta Medica Scandinavica **202**(1-6): 61-64.
- Hippeli, S. and E. F. Elstner (1999). "Transition metal ion-catalyzed oxygen activation during pathogenic processes." FEBS letters **443**(1): 1-7.
- Holme, S., A. Pearse, et al. (2002). "Chronic actinic dermatitis secondary to simvastatin." Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine **18**(6): 313-314.
- Istvan, E. (2003). "Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view." Atherosclerosis Supplements **4**(1): 3-8.
- Körperpflege, I. (1995). "und Waschmittel eV; Die Methode zur Bestimmung des Lichtschuttfaktors, 1." Auflage, Frankfurt am Main, Druck-Konzept.
- Kraljić, I. and S. E. Mohsni (1978). "A new method for the detection of singlet oxygen in aqueous solutions." Photochemistry and Photobiology **28**(4-5): 577-581.
- Levy, M. L., K. S. Barron, et al. (1990). "Naproxen-induced pseudoporphyria: a distinctive photodermatitis." J Pediatr **117**(Copyright (C) 2013 U.S. National Library of Medicine.): 660-664.
- Lew, B.-L., C.-R. Haw, et al. (2004). "Cutaneous drug eruption from cetirizine and hydroxyzine." J Am Acad Dermatol **50**(Copyright (C) 2013 U.S. National Library of Medicine.): 953-956.
- Li, A. S. W. and C. F. Chignell (1987). "SPECTROSCOPIC STUDIES OF CUTANEOUS PHOTSENSITIZING AGENTS—IX. A SPIN TRAPPING STUDY OF THE PHOTOLYSIS OF AMIODARONE AND DESETHYLAMIODARONE." Photochemistry and Photobiology **45**(2): 191-197.
- Ljunggren, B. and G. Bojs (1991). "A case of photosensitivity and contact allergy to systemic tricyclic drugs, with unusual features." Contact dermatitis **24**(4): 259-265.
- Ljunggren, B. and H. Möller (1978). "Drug phototoxicity in mice." Acta dermato-venereologica **58**(2): 125.
- Loet, X. L. (1989). "Safety of Ketoprofen in The Elderly: A Prosective Study on 20,000 Patients." Scandinavian Journal of Rheumatology **18**(S83): 21-27.
- Magnusson, B. (1980). "Identification of contact sensitizers by animal assay." Contact dermatitis **6**(1): 46-50.
- Marnett, L. J. (2000). "Oxyradicals and DNA damage." Carcinogenesis **21**(3): 361-370.
- Martin Jr, J. P., K. Colina, et al. (1987). "Role of oxygen radicals in the phototoxicity of tetracyclines toward Escherichia coli B." Journal of bacteriology **169**(6): 2516-2522.
- MASTI, S. P., J. SEETHARAMAPPA, et al. (2002). "Spectrophotometric determination of cerium (IV) using a phenothiazine derivative." Analytical sciences **18**(2): 167-169.
- Matsumoto, N., A. Akimoto, et al. (2010). "Comparative study of skin phototoxicity with three drugs by an in vivo mouse model." The Journal of toxicological sciences **35**(1): 97.

- Matzke, T. J., D. J. Mann, et al. (2007). "Bullous amyloidosis presenting as naproxen-induced photosensitivity." Int J Dermatol **46**(Copyright (C) 2013 U.S. National Library of Medicine.): 284-286.
- Mauget-Faysse, M., M. Quaranta, et al. (2001). "Incidental retinal phototoxicity associated with ingestion of photosensitizing drugs." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **239**(Copyright (C) 2013 U.S. National Library of Medicine.): 501-508.
- Mayne, J. T., N. J. Johnson, et al. (1997). "A study of the phototoxic potential of trovafloxacin in BALB/c mice." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **39**(suppl 2): 67-73.
- Merkel, P. B. and D. R. Kearns (1972). "Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. Experimental and theoretical study of electronic-to-vibrational energy transfer." Journal of the American Chemical Society **94**(21): 7244-7253.
- Mielcarek, J., M. Naskrent, et al. (2009). "Photochemical properties of simvastatin and lovastatin induced by radiation." Journal of thermal analysis and calorimetry **96**(1): 301-305.
- Moon, P. (1940). "Proposed standard solar-radiation curves for engineering use." Journal of the Franklin Institute **230**(5): 583-617.
- Moore, D. (1996). "Standardization of photodegradation studies and kinetic treatment of photochemical reactions." Photostability of Drugs and Drug Formulations. Bristol, PA: Taylor & Francis: 63-82.
- Moore, D. E. (2002). "Drug-induced cutaneous photosensitivity: incidence, mechanism, prevention and management." Drug safety **25**(5): 345-372.
- Moorhouse, P. C., M. Grootveld, et al. (1987). "Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers." FEBS letters **213**(1): 23-28.
- Morimoto, K., A. Kawada, et al. (2006). "Photosensitivity to simvastatin with an unusual response to photopatch and photo tests." Contact dermatitis **33**(4): 274-274.
- Motten, A. G., G. R. Buettner, et al. (1985). "SPECTROSCOPIC STUDIES OF CUTANEOUS PHOTSENSITIZING AGENTS—VIII. A SPIN-TRAPPING STUDY OF LIGHT INDUCED FREE RADICALS FROM CHLORPROMAZINE and PROMAZINE." Photochemistry and Photobiology **42**(1): 9-15.
- Murov, S. L., G. L. Hug, et al. (1993). Handbook of photochemistry, CRC Press.
- Nicodem, D. E. and O. Aquilera (1983). "Standardization of the potassium ferrioxalate actinometer over the temperature range 5–80 C." Journal of Photochemistry **21**(2): 189-193.
- Nicolescu, A. C., J. L. Comeau, et al. (2007). "Aryl radical involvement in amiodarone-induced pulmonary toxicity: Investigation of protection by spin-trapping nitrones." Toxicology and Applied Pharmacology **220**(1): 60-71.
- Norins, A. L. (1959). "Chlorothiazide drug eruption involving photosensitization." AMA Arch Derm **79**(Copyright (C) 2013 U.S. National Library of Medicine.): 592.
- Ogilby, P. R. (2010). "Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun." Chem. Soc. Rev. **39**(8): 3181-3209.
- Onoue, S., N. Igarashi, et al. (2008). "In vitro phototoxicity of dihydropyridine derivatives: A photochemical and photobiological study." European Journal of Pharmaceutical Sciences **33**(3): 262-270.
- Onoue, S., Y. Seto, et al. (2009). "Drug-induced phototoxicity; an early in vitro identification of phototoxic potential of new drug entities in drug discovery and development." Current Drug Safety **4**(2): 123-136.

- Onoue, S. and Y. Tsuda (2006). "Analytical Studies on the Prediction of Photosensitive/Phototoxic Potential of Pharmaceutical Substances." Pharm. Res. **23**(Copyright (C) 2013 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 156-164.
- Oppenländer, T. (1988). "A comprehensive photochemical and photophysical assay exploring the photoreactivity of drugs." Chimia **42**(10): 331-342.
- Paillous, N. and M. Verrier (1988). "Photolysis of amiodarone, an antiarrhythmic drug." Photochemistry and photobiology **47**(3): 337-343.
- Parlar, S. (2000). Untersuchungen zur photochemischen Stabilität mittels Durchflußreaktoren (hv-HPLC), Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I.
- Pathak, M. A. and P. C. Joshi (1984). "Production of active oxygen species ($^{1}O_2$ and O_2^{-}) by psoralens and ultraviolet radiation (320–400 nm)." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **798**(1): 115-126.
- Plaetzer, K., T. Kiesslich, et al. (2003). "The modes of cell death induced by PDT: an overview." Medical Laser Application **18**(1): 7-19.
- Poulsen, J., K. Birks, et al. (1986). "Crocheted PTFE reactors for post-column photochemistry in HPLC." Chromatographia **22**(7): 231-234.
- Przybilla, B., U. Schwab-Przybilla, et al. (1987). "Phototoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs demonstrated in vitro by a photo-basophil-histamine-release test." Photodermatology **4**(Copyright (C) 2013 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 73-78.
- Radschuweit, A., H. H. Rüttinger, et al. (2001). "UV-Induces Formation of Hydrogen Peroxide Based on the Photochemistry of Ketoprofen." Photochemistry and photobiology **73**(2): 119-127.
- Raeder, E. A., P. J. Podrid, et al. (1985). "Side effects and complications of amiodarone therapy." American heart journal **109**(5): 975-983.
- Rao, S. (2008). Biospektrum : Neue monolithische Trennsäulen für die Analyse von Biomolekülen. Spektrum, Heidelberg.
- Rayne, S., K. Forest, et al. (2009). "Mechanistic aspects regarding the direct aqueous environmental photochemistry of phenol and its simple halogenated derivatives. A review." Environment international **35**(2): 425-437.
- Rosenbaum, M. B., P. A. Chiale, et al. (1976). "Clinical efficacy of amiodarone as an antiarrhythmic agent." Am J Cardiol **38**(Copyright (C) 2013 U.S. National Library of Medicine.): 934-944.
- Sautereau, A. M., C. Tournaire, et al. (1992). "Interactions of amiodarone with model membranes and amiodarone-photoinduced peroxidation of lipids." Biochemical pharmacology **43**(12): 2559-2566.
- Schempp, C. M., E. Schöpf, et al. (2002). "Durch Pflanzen ausgelöste toxische und allergische Dermatitis (Phyto dermatitis)." Der Hautarzt **53**(2): 93-97.
- Schmitz, G. and T. Langmann (2006). "Pharmacogenomics of cholesterol-lowering therapy." Vascular pharmacology **44**(2): 75-89.
- Schröder, S. (2007). Phototoxisches und photoallergisches Potential von Arzneistoffen– Entwicklung einer in vitro Screening-Methode, Freie Universität Berlin, Universitätsbibliothek.
- Schwabe, U. (2010). Arzneiverordnungs-Report 2010. U. Schwabe and D. Paffrath, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Selvaag, E. (1997). "Clinical drug photosensitivity. A retrospective analysis of reports to the Norwegian Adverse Drug Reactions Committee from the years 1970-1994." Photodermatology, photoimmunology & photomedicine **13**(1-2): 21-23.
- Selvaag, E., H. Anholt, et al. (1996). "Phototoxicity due to sulphonamide derived oral antidiabetics and diuretics: investigations in a cell culture model." Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine **12**(1): 1-6.
- Shimoda, K., T. Ikeda, et al. (2000). "Possible relationship between phototoxicity and photodegradation of sitafloxacin, a quinolone antibacterial agent, in the auricular skin of albino mice." Toxicological sciences **56**(2): 290-296.
- Spielmann, H., L. Müller, et al. (2000). The second ECVAM workshop on phototoxicity testing.
- Staško, A., V. Brezová, et al. (1994). "Reactive radical intermediates formed from illuminated nifedipine." Free Radical Biology and Medicine **17**(6): 545-556.
- Stein, K. R. and N. S. Scheinfeld (2007). "Drug-induced photoallergic and phototoxic reactions."
- Svec, F. and T. B. Tennikova (2003). Monolithic materials: preparation, properties, and applications, Elsevier Science Limited.
- Svensson, C. K., E. W. Cowen, et al. (2001). "Cutaneous drug reactions." Pharmacological reviews **53**(3): 357-379.
- Tamat, S. R. and D. E. Moore (1983). "Photolytic decomposition of hydrochlorothiazide." J. Pharm. Sci. **72**(Copyright (C) 2013 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 180-183.
- Tanaka, N., H. Kobayashi, et al. (2001). "Peer Reviewed: Monolithic LC Columns." Analytical Chemistry **73**(15): 420 A-429 A.
- Tarpey, M. M. and I. Fridovich (2001). "Methods of detection of vascular reactive species nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite." Circulation research **89**(3): 224-236.
- Thekaekara, M. P. and A. J. Drummond (1971). "Standard values for the solar constant and its spectral components." Nature **229**(1): 6-9.
- Twitchett, P., P. Williams, et al. (1978). "Photochemical detection in high-performance liquid chromatography and its application to cannabinoid analysis." Journal of Chromatography A **149**: 683-691.
- Vargas, F., I. Martinez Volkmar, et al. (1998). "Photodegradation and phototoxicity studies of furosemide. Involvement of singlet oxygen in the photoinduced hemolysis and lipid peroxidation." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **42**(3): 219-225.
- Vargas, F., C. Rivas, et al. "In vitro studies of the dual properties of Allopurinol anti-and photo-oxidants Mechanisms."
- Vassallo, P. and R. G. Trohman (2007). "Prescribing amiodarone. An evidence-based review of clinical indications." JAMA, J. Am. Med. Assoc. **298**(Copyright (C) 2013 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1312-1322.
- Viña, J., A. Gimeno, et al. (2000). "Mechanism of Free Radical Production in Exhaustive Exercise in Humans and Rats; Role of Xanthine Oxidase and Protection by Allopurinol." IUBMB Life **49**(6): 539-544.
- Wagai, N. and K. Tawara (1991). "Important role of oxygen metabolites in quinolone antibacterial agent-induced cutaneous phototoxicity in mice." Archives of toxicology **65**(6): 495-499.

- Weil, J. A. and J. R. Bolton (2007). Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications, Wiley.
- Weiner, I. and G. Mudge (1990). "Diuretics and other agents employed in the mobilization of edema fluid." The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York: Pergamon: 713-731.
- Wood, P. D. and R. W. Redmond (1996). "Triplet State Interactions between Nucleic Acid Bases in Solution at Room Temperature: Intermolecular Energy and Electron Transfer." Journal of the American Chemical Society **118**(18): 4256-4263.
- Xia, X., G. Li, et al. (2009). "Effects of fulvic acid concentration and origin on photodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solution: Importance of active oxygen." Environmental Pollution **157**(4): 1352-1359.
- Zavoisky, E. (1945). "Spin-magnetic resonance in paramagnetics." J. Phys. USSR **9**(245): 299-304.
- Zelickson, A. S. and H. C. Zeller (1964). "A new and unusual reaction to chlorpromazine." JAMA: the journal of the American Medical Association **188**(4): 394-396.
- Zurcher, K. and A. Krebs (1970). "Cutaneous side effects of systemic drugs with special reference to recently introduced medicaments. I." Dermatologica **141**(Copyright (C) 2013 U.S. National Library of Medicine.): 119-129.