

Stabilität und Penetrationsfähigkeit von pflanzlichen Stoffen in topischen  
Formulierungen

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-  
Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität Kiel

Pharmazeutisches Institut  
Abteilung Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie  
Kiel

vorgelegt von  
Timo Rode

Hamburg 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1999 bis November 2001 unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. h.c. B.W. Müller (Universität Kiel, Pharmazeutisches Institut, Abteilung Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie), Dr. H. Wenck und Dr. U. Schönrock in der Funktion Forschung Cosmed, Abteilung Forschung Wirkstoffe der Beiersdorf AG, Hamburg, erstellt.

- 1. Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. B.W. Müller
- 2. Korreferent: Prof. Dr. D. Heber

Tag der mündlichen Prüfung: 14. November 2001

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den 14. November 2001

T. H. Bauer  
(Dekan)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung</b>	<b>1</b>
1.1	Zielsetzung	1
1.2	Drogen und Extrakte	3
1.2.1	Camellia sinensis	3
1.2.2	Terminalia sericea	14
1.3	Cyclodextrine	19
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>23</b>
2.1	Auswahl geeigneter Extrakte mittels Dünnschichtchromatographie (TLC)	23
2.2	Überprüfung der Wirkstoffstabilität in Lösung mittels Dünnschichtchromatographie (TLC)	24
2.3	Ultraviolet-VIS Spektroskopie (UV-VIS)	24
2.4	Einwiegen der Rohstoffe für die Rezepturherstellung	25
2.5	Herstellung der Grüntee/Gelbholzextrakt Emulsionen vom Typ O/W und W/O im Labormaßstab ( $\leq 2$ kg)	27
2.6	Herstellung der Grüntee-Extrakt Emulsionen unter Luftausschluss vom Typ O/W und W/O im Technikummaßstab (2-5 kg)	28
2.7	Herstellung der W/O/W Grüntee-Emulsion im Technikummaßstab	29
2.8	Stabilität der Formulierungen	30
2.8.1	Rückmusterprüfung (RÜCK)	30
2.8.2	pH-Wert (PH)	31
2.8.3	Konsistenz (KO) bzw. Viskosität (VIS)	31
2.8.4	Schaukeltest (SCHT)	31
2.8.5	Stabilitätstest Creme/Lotion (STCL)	32
2.8.6	Kühlschrankmuster (+6 °C)	32
2.8.7	Eisschrankmuster (-10 °C)	32
2.9	Lagerung und Verpackung der Analytikmuster (Lagerstabilität der Wirkstoffe)	33

<b>2.10</b>	<b>Flüssigchromatographie-Massenspektroskopie Analytik (LC/MS)</b>	<b>33</b>
<b>2.11</b>	<b>Verteilungskoeffizient (log P<sub>ow</sub>)</b>	<b>34</b>
<b>2.12</b>	<b>Penetration an exzidiierter Schweinehaut (PEN)</b>	<b>36</b>
<b>2.13</b>	<b>Identifizierung der Sericosid-Kristalle mittels IR-Raman Spektroskopie</b>	<b>38</b>
<b>2.14</b>	<b>Bildung von Wirkstoff/Cyclodextrinkomplexen</b>	<b>39</b>
2.14.1	Herstellung der Sericosid/Cyclodextrinkomplexe (Pulver) unter Temperatureinfluss	40
2.14.2	Herstellung der Sericosid/Cyclodextrinkomplexe (Pulver) bei Raumtemperatur	40
2.14.3	Herstellung der Sericosid/Cyclodextrinkomplexe für die Emulsionsansätze	41
<b>2.15</b>	<b>Bestimmung der Komplexbildungskonstante (K<sub>m:n</sub>)</b>	<b>41</b>
2.15.1	Berechnung der Komplexbildungskonstante K <sub>m:n</sub>	41
2.15.2	Herstellung der Konzentrationsreihe zur Berechnung von K <sub>m:n</sub>	45
<b>2.16</b>	<b>Röntgendiffraktometrie (XRD)</b>	<b>46</b>
<b>2.17</b>	<b>Differential Scanning Calorimetry (DSC)</b>	<b>47</b>
<b>2.18</b>	<b>Thermogravimetrie (TGA)</b>	<b>47</b>
<b>2.19</b>	<b>Nuclear Magnetic Resonance Spektroskopie (<sup>13</sup>C-NMR)</b>	<b>48</b>
<b>2.20</b>	<b>Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF)</b>	<b>49</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>Detektion der Extraktinhaltsstoffe aus Camellia sinensis und Terminalia sericea mittels Dünnschichtchromatographie (TLC)</b>	<b>50</b>
3.1.1	Auswahl des Camellia sinensis Extraktes	50
3.1.2	Überprüfung der Lagerstabilität der Catechinderivate aus Camellia sinensis Extrakt in wässriger Lösung	53
3.1.3	Auswahl des Terminalia sericea Extraktes	56
3.1.4	Überprüfung der Lagerstabilität von Sericosid aus Terminalia sericea Extrakt in wässrig/ethanolischer Lösung	56

<b>3.2</b>	<b>UV- Spektren</b>	<b>58</b>
3.2.1	UV-Spektrum von <i>Camellia sinensis</i>	58
3.2.2	UV-Spektrum von <i>Terminalia sericea</i>	59
<b>3.3</b>	<b>Messung der Lagerstabilitäten der unstabilierten <i>Camellia sinensis</i> Extrakte mittels LC/MS</b>	<b>60</b>
3.3.1	Validierungsparameter	60
3.3.2	Lagerstabilitätsdaten	61
<b>3.4</b>	<b>Messung der Lagerstabilität des unstabilierten <i>Terminalia sericea</i> Extraktes mittels LC/MS</b>	<b>64</b>
3.4.1	Validierungsparameter	65
3.4.2	Lagerstabilitätsmessungen	65
<b>3.5</b>	<b>Stabilitätsverbessernde Maßnahmen bei <i>Camellia sinensis</i></b>	<b>67</b>
3.5.1	Vorversuche zur Erhöhung der Lagerstabilität der Catechinderivate durch Zusatz von Vitamin C	68
3.5.2	Einfluss von 0,2 %-0,6 % Vitamin C bei Herstellung und Lagerung unter Luftausschluss auf die Lagerstabilität der Catechine	69
3.5.3	Einfluss von Propylgallat (PG) und Butylhydroxytoluol (BHT) auf die Lagerstabilität der Catechine	72
3.5.4	Einfluss von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Chitosanderivaten auf die Lagerstabilität der Catechine	74
3.5.5	Lagerstabilität der Catechinderivate in einer W/O/W Emulsion	75
<b>3.6</b>	<b>Verteilungskoeffizient (<math>\log P_{OW}</math>)</b>	<b>77</b>
3.6.1	Verteilungskoeffizient ( $\log P_{OW}$ ) von <i>Camellia sinensis</i>	77
3.6.2	Verteilungskoeffizient ( $\log P_{OW}$ ) von <i>Terminalia sericea</i>	78
<b>3.7</b>	<b>Penetration am Schweinehautmodell</b>	<b>81</b>
3.7.1	<i>Camellia sinensis</i>	82
3.7.2	<i>Terminalia sericea</i>	85
<b>3.8</b>	<b>Löslichkeitsprobleme bei <i>Terminalia sericea</i> Extrakt</b>	<b>87</b>
3.8.1	Kristallbildung in Emulsionen	87
3.8.2	Identifizierung durch IR-Raman Spektroskopie	88
<b>3.9</b>	<b>Formulierungen mit Ethanol</b>	<b>89</b>
3.9.1	Löslichkeitsverbesserung durch Ethanolzugabe	89

<b>3.10</b>	<b>Verbesserung der Löslichkeit von Sericosid durch Komplexierung mit Cyclodextrinen</b>	<b>90</b>
3.10.1	Überprüfung der statistischen Substitution der alkylierten Cyclodextrinderivate mittels MALDI-TOF	90
3.10.2	Identifizierung des Isomers von Sericosid aus Terminalia sericea Extrakt mit Hilfe der <sup>13</sup> C-NMR	92
<b>3.11</b>	<b>Komplexierungsverhältnisse und Komplexbildungskonstanten</b>	<b>94</b>
3.11.1	Vorversuche zur Abschätzung des Komplexbildungsverhältnisses zwischen Sericosid und Cyclodextrinen	94
3.11.2	Bestimmung des Komplexierungsverhältnisses und der Komplexbildungskonstante von Extrakt/Cyclodextrin	95
<b>3.12</b>	<b>Analytik der Extrakt/Cyclodextrinkomplexe</b>	<b>107</b>
3.12.1	Röntgendiffraktometrie (XRD)	107
3.12.2	Differential Scanning Calorimetry (DSC)	112
3.12.3	Thermogravimetrie (TGA)	120
3.12.4	MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation Time Of Flight Mass Spectrometry)	122
<b>3.13</b>	<b>Penetration am Schweinehautmodell</b>	<b>127</b>
3.13.1	Penetration des Sericosid/γ-Cyclodextrinkomplexes	127
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>131</b>
<b>5</b>	<b>Summary</b>	<b>133</b>
<b>6</b>	<b>Chemikalien und Geräte</b>	<b>135</b>
<b>6.1</b>	<b>Extrakte</b>	<b>135</b>
6.1.1	Grüner Tee Konzentrat (INCI: Camellia sinensis)	135
6.1.2	Sericoside (INCI: Terminalia sericea)	135
<b>6.2</b>	<b>Cyclodextrine</b>	<b>136</b>
<b>6.3</b>	<b>Emulsionen (Pool-Rezepturen)</b>	<b>136</b>
6.3.1	Wasser in Öl Emulsion (W/O Creme)	137
6.3.2	Öl in Wasser Emulsion (O/W Creme)	137
6.3.3	Wasser in Öl in Wasser Lotion (W/O/W)	137
6.3.4	Wasser in Öl Lotion (O/W Lotion)	137

<b>6.4</b>	<b>Standards</b>	<b>138</b>
<b>6.5</b>	<b>Geräte, Chemikalien und Lösungsmittel nach Methoden</b>	<b>139</b>
6.5.1	Dünnschichtchromatographie (TLC)	139
6.5.2	UV-Vis Spektroskopie (UV-VIS)	140
6.5.3	Herstellung der Grüntee/Gelbholzextrakt Emulsionen im Labormaßstab ( $\leq 2$ kg)	140
6.5.4	Herstellung der Grüntee-Extrakt Emulsionen im Technikumsmaßstab (2-5 kg)	141
6.5.5	Lagerstabilitätsuntersuchungen	141
6.5.6	Verteilungskoeffizient ( $\log P_{OW}$ )	142
6.5.7	Penetration an exzidiierter Schweinehaut (PEN)	142
6.5.8	IR-Raman Spektroskopie	143
6.5.9	Herstellung der Sericosid/Cyclodextrinkomplexe zur Bestimmung der Komplexbildungskonstante $K_{m:n}$	143
6.5.10	Herstellung der Sericosid/Cyclodextrinkomplexe (Pulver)	144
6.5.11	Röntgendiffraktometrie (XRD)	144
6.5.12	Differential Scanning Kalorimetrie (DSC)	145
6.5.13	Thermogravimetrie (TGA)	145
6.5.14	Nuclear Magnetic Resonanz Spektroskopie ( $^{13}\text{C}$ -NMR)	145
6.5.15	Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation Time Of Flight Mass Spektroskopie (MALDI-TOF)	146
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>147</b>

# Abkürzungsverzeichnis

a.i.	Absolute Intensität
AJG	Arjunglucosid
ANCOL®	Ansatz Computer Labor System, BDF
API	Atmospheric Pressure Ionization
-10	Eisschranklagerung bei -10 °C
+6	Kühlschranklagerung bei +6 °C
+25	Lagerung bei +25 °C
+25 + Licht	Lagerung bei +25 °C im Glas bei Lichteinstrahlung
+40	Brutschranklagerung bei +40 °C
BHT	Butylhydroxytoluol
BSG	Bestimmungsgrenze (ng/ml)
c	Konzentration (mol/l)
C	(+)-Catechin
COLIPA	The European Cosmetic Toiletry And Perfumery Association
°C	Temperatur (°C)
d	Schichtdicke der Lösung (cm)
d <sub>R</sub>	Abstand der Kristallgitterebenen von einander (nm)
DC	Dünnschichtchromatographie
DS	Durchschnittlicher Substitutionsgrad
DSC	Differential Scanning Calorimetry
E	Extinktion (%)
EC	(-)-Epicatechin
ECG	(-)-Epicatechingallat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGC	(-)-Epigallocatechin
EGCG	(-)-Epigallocatechingallat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES	Electrospray
Glc-Cerase	Glucosyl Ceramidase
GCG	(-)-Gallocatechingallat
ΔG	Freie Reaktionsenthalpie (J)
HP-β	Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin
HP-γ	Hydroxypropyl-gamma-Cyclodextrin
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
ΔH	Reaktionsenthalpie (J)
I	Intensität des die Probenlösung verlassenen Messstrahls
I <sub>0</sub>	Intensität des eingestrahlenen Lichts



INCI	International Nomenclature Of Cosmetic Ingredients
IR	Infrarot
$k'$	Kapazitätsfaktor
$K_{M:N}$	Komplexbildungskonstante ( $\text{mol}^{-1}$ )
KO	Konsistenz
L	Ligand
$L_t$	Konzentration Komplexbildner ( $\text{mol/l}$ )
LC/MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
$LD_{50}$	letale Dosis, bei der 50 % der Versuchstiere eingehen
LDL	Low Density Lipoprotein
$L_m$	Lösungsmittel
Log	Logarithmus
$m, n$	Stoffmengen (Molzahlen)
$m/z$	Masse pro Ladung
M- $\beta$	Methyl-beta-Cyclodextrin
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation Time Of Flight Mass Spectrometry
MG	Molekulargewicht ( $\text{g/mol}$ )
MMP	Matrix-Metalloproteinase
Mo	Monat
MS	Massenspektrometer
$n$	Anzahl der Einzelmessungen
$n.$	nachweisbar
$n.n.$	nicht nachweisbar
$n_R:$	Anzahl der Glucopyranosemoleküle im Cyclodextrin
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NWG	Nachweisgrenze ( $\text{ng/ml}$ )
OECD	Organisation For Economic Cooperation And Development
O/W	Öl in Wasser Emulsion
ppm	Chemische Verschiebung in parts per million
P	statistische Sicherheit (%)
$P_{ow}$	Verteilungskoeffizient Octanol/Wasser
PEN	Penetration
PETP	Polyethylenterephthalat
PG	Propylgallat
PH	pH- Wert
R-Sätze	Gefahrenhinweise
R	substituiertes Restatom pro Molekül
$R_f$	Retention Faktor
RÜCK	Rückmusterprüfung
S	Substrat

S-Sätze	Sicherheitsratschläge
$S_0$	Sättigungslöslichkeit des freien Gastesmoleküls (mol/l)
SDS	Natriumdodecylsulfat
$S_E$	Sättigungslöslichkeit des Komplexbildners (mol/l)
$S_{rel}$	relative Standardabweichung (%)
$S_t$	Sättigungslöslichkeit des Gastes nach Zugabe von Komplexbildner (mol/l)
$S_x$	Standardabweichung
SCHT	Schaukelttest (-10 °C/ +40 °C)
SEV	Selektiver Elektronen Vervielfacher
S:N	Peak/ Rausch-Verhältnis
STCL	Stabilitätstest Creme-Lotion
$\Delta S$	Entropie ( $J \times K^{-1}$ )
$t_0$	Totzeit
$t_R$	Retentionszeit
T	Temperatur (K)
TGA	Thermogravimetrie
$\mu$	Magnetisches Moment
upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
VIS	Sichtbarer Bereich des Lichtes
V	Vertrauensbereich
Vit. C	Vitamin C
W/O	Wasser in Öl Emulsion
W/O/W	Wasser in Öl in Wasser Emulsion
WFR	Wiederfindungsrate (%)
X	Mittelwert
$X_R$	Anzahl der substituierten Restatome pro Molekül
XRD	Röntgendiffraktometrie
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\beta$	Beta Cyclodextrin
$\varepsilon$	Molarer Extinktionskoeffizient ( $l \times mol^{-1} \times cm^{-1}$ )
$\gamma$	Gamma Cyclodextrin
$\lambda$	Wellenlänge Lambda (nm)
$\nu_0$	Erregerfrequenzlinie
$\nu_R$	Rotationsfrequenzlinie
$\nu_{RA}$	Raman Frequenzen
$\nu_S$	Schwingungsfrequenzlinie
$\theta$	Braggscher Winkel (Theta)
$\omega$	Frequenz ( $s^{-1}$ )

# 1 Einführung

## 1.1 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines pflanzenextrakthaltigen Kosmetikums mit ausreichender Stabilität, Verträglichkeit und Wirksamkeit. Dabei galt es zu beweisen, dass der in kosmetischen Formulierungen eingearbeitete Wirkstoff pflanzlichen Ursprungs allein, d.h. ohne Einfluss der jeweiligen Formulierung wirksam ist. Die Arbeit war in die Entwicklung eines Phytokosmetikums mit nachweisbarer Wirksamkeit eingebunden [77]. Im Rahmen der Doktorarbeit wurde primär die Stabilität und die Verträglichkeit der Extrakte untersucht. Die gewonnenen Erkenntnisse lieferten die Basis für eine anstehende Entwicklung und Vermarktung eines wirksamen und hautverträglichen Phytokosmetikums.

Der Wunsch zur Entwicklung einer pflanzenextrakthaltigen Formulierung entstand aus folgenden Überlegungen: Das Gesundheitsbewusstsein der Bevölkerung hat in den letzten Jahren stetig zugenommen. Nicht nur die akute Behandlung von Krankheiten, auch die Vorsorge zur Vermeidung von Krankheiten bzw. Alterungserscheinungen gewinnt immer mehr an Bedeutung. Kosmetika dienen generell zur Vorbeugung von auftretenden Hautschädigungen, sei es durch gezielte äußere Umwelteinflüsse (Sonnenbrand), durch Hautirritation (Akne, trockne Haut) oder zur Vorbeugung von Alterungserscheinungen (Faltenbildung). Die steigenden Verkaufszahlen kosmetischer Produkte bestätigen dies [115]. Bisher besaßen kosmetische Produkte meist nur allgemein hautpflegende Eigenschaften. Die enthaltenen Stoffe pflanzlicher Herkunft dienten eher verkaufsfördernden Überlegungen. Publierte Daten zur Wirksamkeit topisch verwendeter Pflanzenextrakte liegen bisher nur vereinzelt vor [4,18,43,80,95,111].

In der kosmetischen Forschung besteht grundsätzlich ein hohes Interesse an antioxidativ und antiinflammatorisch wirkenden Substanzen. Allerdings besteht ein Mangel an Wirkstoffen pflanzlichen Ursprungs mit den oben genannten Wirksamkeiten. Die Auswahl der Pflanzen erfolgte nach der wissenschaftlich dokumentierten antioxidativen und antiinflammatorischen Wirksamkeit ihrer Inhaltsstoffe.

Eine möglichst hohe Konzentration an Wirkstoff in den jeweiligen Pflanzenextrakten ist somit Voraussetzung für eine Wirksamkeit in kosmetischen Produkten. Nach entsprechender Recherche wurde eine Auswahl verfügbarer Pflanzenextrakte aus zwei geeigneten Pflanzen auf ihre kosmetische Verwendungsmöglichkeit hin getestet:

Grüner Tee, *Camellia sinensis*, Theaceae

*Camellia sinensis* besitzt Inhaltsstoffe mit antioxidativen Potential und eignet sich zur Behandlung trockener Hautzustände. Damit bietet sich der Einsatz in zahlreichen kosmetischen Produkten wie Tagescremes, Lotionen etc. an.

Gelbholz, *Terminalia sericea*, Combretaceae

Die Pflanze *Terminalia sericea* enthält antiinflammatorisch wirksame Verbindungen. Einsatzgebiete sind Apres-Sun Produkte sowie Produkte zur Babypflege.

## 1.2 Drogen und Extrakte

### 1.2.1 *Camellia sinensis*

Stammpflanze: *Camellia sinensis*

Familie: Theaceae



***Camellia sinensis***

#### 1.2.1.1 Allgemeines

Grüner Tee hat in den letzten Jahren als Nahrungsergänzungsmittel beträchtlich an Bedeutung gewonnen. Auch in der kosmetischen- und pharmazeutischen Industrie hat grüner Tee verstärkt Beachtung gefunden. Wie Rotwein und Kakao besitzt grüner Tee einen hohen Gehalt an Polyphenolen, die für verschiedene gesundheitliche Wirkungen verantwortlich gemacht werden. Diskutiert werden anticancerogene, antioxidative und kardioprotektive Wirkungen, sowie eine Antikarieswirkung [1,12,45,62].

Für die topische Anwendung ist hiervon nur die antioxidative Wirkung von Bedeutung. Ferner ist in Studien eine Veränderung der Ceramid-Biosynthese und Zusammensetzung in der Haut beobachtet worden, die zur Behandlung von trockenen Hautzuständen bzw. Altershaut von Vorteil ist.

### 1.2.1.2 Merkmale und Gewinnung

Bei *Camellia sinensis* handelt es sich um einen immergrünen, reich verzweigten Strauch, der baumartig wächst [62]. Anbaugebiete sind u.a. Indien, China, Sri Lanka und Japan. Da *Camellia sinensis* eine Kulturpflanze ist, hat sie kein natürliches Vorkommen. Über die Entstehung bzw. Herkunft der Pflanze gibt es keine einheitlichen Angaben [62].

Bei der Tee- Ernte wird nicht die gesamte Pflanze, sondern nur deren Blätter (*Theae folium*) genutzt. Hierbei gibt es die unterschiedlichsten Pflückqualitäten. Da die jüngsten Teeblätter die beste Qualität besitzen, wird u.a. unterschieden nach:

Imperial: nur das Oberste, noch nicht entfaltete Blatt wird verwendet (Pekospitze),

Fein: Pekospitze und 2 Blätter werden gepflückt;

Grob: Pekospitze und 3 Blätter werden gepflückt.

Die so gewonnenen Blätter können auf verschiedene Weise aufbereitet werden. So erhält man entweder den fermentierten schwarzen Tee (*Theae nigrae folium*) oder den unfermentierten grünen Tee (*Theae viridis folium*). Keine Bedeutung für den Welthandel besitzt der halbfermentierte Oolongtee, der innen grün und außen schwarz ist [53,59,105].

Die Fermentation des Tees erfolgt durch blatteigene Enzyme. Sie wird beim Grüntee dadurch gehemmt, das vor dem Rollen der Blätter das frische Material mit gespanntem Wasserdampf behandelt wird [150]. Dadurch wird die Oxidation der austretenden Inhaltsstoffe der Pflanzensäfte zu rotbraunen Substanzen verhindert, und die Teeblätter behalten ihre grüne Farbe. Am Ende werden die Blätter noch mit Heißluft getrocknet.

Hauptproduktionsländer für den europäischen Markt sind China und Japan, wobei China den größten Anteil liefert. Bekannte Teesorten sind u.a. Chinese, Gunpowder, Japan Sencha und Gyokuro. Die Ernte erfolgt in den tropischen Gebieten wie Sri Lanka und Indien das ganze Jahr über, in den gemäßigten Zonen wie Japan saisonal. Die Ernte beginnt nach dem 3. Jahr der Anpflanzung. Den höchsten Ertrag erhält man im Durchschnitt im 6.-7. Jahr. In tropischen Gebieten kann alle 7-10 Tage gepflückt werden.

### 1.2.1.3 Inhaltsstoffe

Hauptinhaltsstoffe des Grünen Tees sind Purinalkaloide (Methylxanthine) und Polyphenole. Daneben können noch Aminosäuren, Carotinoide, Saponine, Mineralstoffe, sowie flüchtige Stoffe nachgewiesen werden [10,70,107,122,150].

Eine Untergruppe der Polyphenole bilden die Flavonoide, die sich wiederum in verschiedene Untergruppen unterteilen lassen. Eine wichtige Untergruppe stellen die Catechine dar [46,66]. Catechine bilden beim Grüntee den Hauptanteil (ca. 25 %) der Polyphenole [62] und lassen sich unterteilen in:

- (-)-Epicatechin (EC), ca. 1-3 %
- (-)-Epicatechingallat (ECG), ca. 3-6 %
- (-)-Epigallocatechin (EGC), ca. 3-6 %
- (-)-Epigallocatechingallat (EGCG), ca. 9-13 %
- (+)-Catechin C, ca., 1-2 %

Der Catechingehalt ist in der Pekospitze am höchsten (ca. 26 %) und nimmt nach unten in der Blattfolge ab (3. Blatt ca. 17 %). Im unteren Stengelteil werden durchschnittlich nur noch 5 % Catechine gefunden. Zur Beurteilung der Qualität eines zu untersuchenden Extraktes ist unbedingt erforderlich, neben der Art des verwendeten Auszugsmittels die Qualität der zu extrahierenden Droge zu kennen.

Das Alter der Droge bei der Extraktion spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle. So nimmt der Catechingehalt mit zunehmenden Alter der Pflanze besonders auf Kosten des (-)-Epigallocatechingallats (EGCG) ab.

Der Catechingehalt eines exemplarisch untersuchten Grüntee-Extraktes ist in Tabelle 1.1 aufgelistet. Es handelt es sich um einen in Methanol extrahierten, sprühtrockneten Extrakt der Firma Dragoco (Holzminden) mit folgenden chemischen und physikalischen Eigenschaften:

Hellbraunes, gelbliches Pulver mit krautigem Geruch,  $\lambda_{\max}(\text{Wasser}) = 270 \text{ nm}$ , in Wasser und Ethanol löslich.

Durch die Extraktion mit Methanol anstatt mit Wasser ist es möglich, einen hohen Catechingehalt bei gleichzeitiger Verminderung der Extraktfarbe (hellbraun bis gelb anstatt dunkelbraun) zu erhalten. Somit wird die Eigenfärbung der extrakthaltigen Endformulierung stark reduziert.

Tab.1.1: Prozentuale Zusammensetzung der Catechinderivate eines exemplarisch untersuchten , Grüntee-Extraktes der Fa. Dragoco (Holzminden)

<i>Inhaltstoffe</i>	<i>Anteil (%)</i>
(+)-Catechin	0,6
(-)-Epigallocatechin	8,8
(-)-Epigallocatechingallat	13,4
(-)-Epicatechin	3,3
(-)-Epicatechingallat	3,3
(-)-Gallocatechingallat	1,8

Die Abbildungen 1.1-1.6 zeigen die Strukturformeln der Catechinderivate aus Tab.1.1

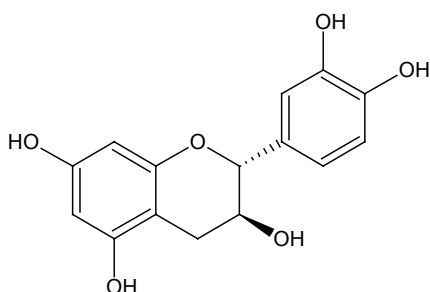


Abb.1.1:(+)-Catechin

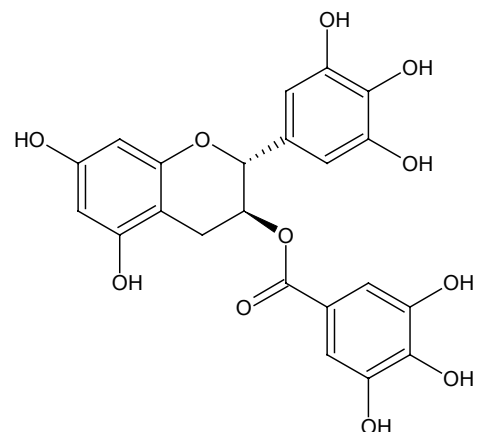


Abb.1.2:(+)-Gallocatechingallat



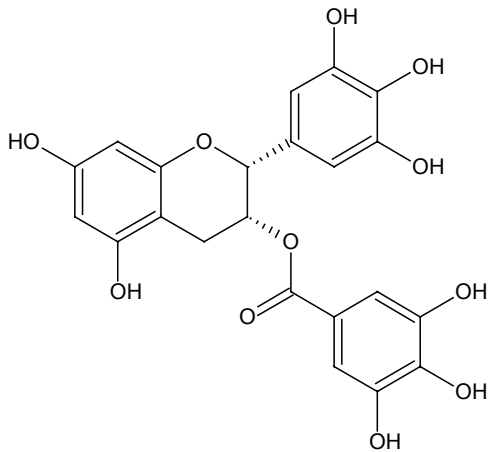


Abb.1.3:(-)-Epigallocatechingallat

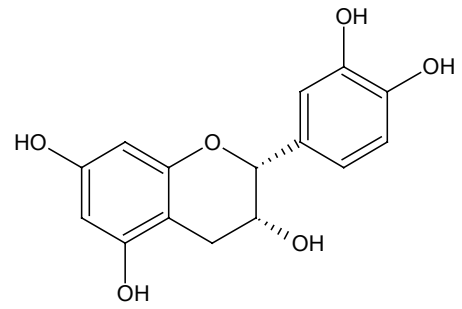


Abb.1.4:(-)-Epicatechin

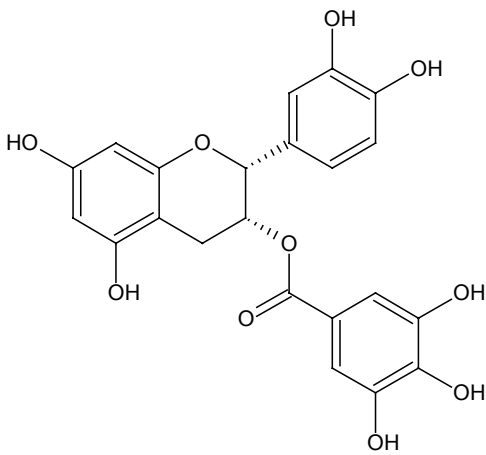


Abb.1.5:(-)-Epicatechingallat

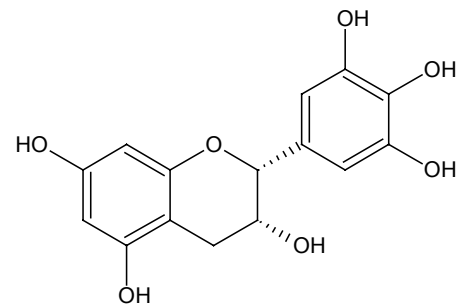


Abb.1.6:(-)-Epigallocatechin

Die Gruppe der Theaflavine finden sich nur im schwarzen Tee. Sie sind höhermolekular und entstehen bei der Fermentation aus Catechinen. Dies bedeutet jedoch nicht, dass im schwarzen Tee keine Catechine mehr vorhanden sind. Der Anteil der Catechine am gesamten Polyphenolgehalt ist nur geringer.

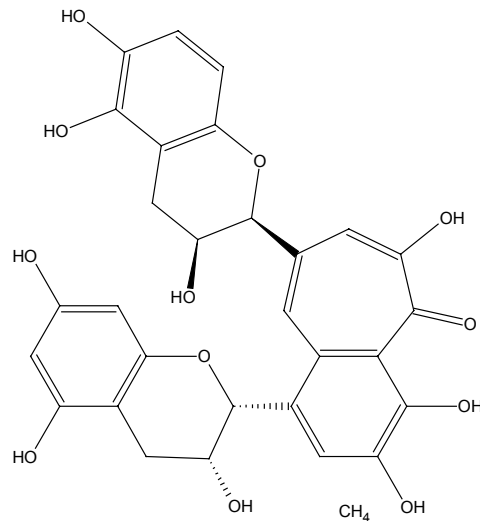


Abb.1.7:Theaflavin

In geringen Mengen lassen sich noch p-Cumarsäure, Kaffeesäure und Depside wie die Chinasäure, Chlorogensäure und das Theogallin (1 %) nachweisen, denen auch antioxidative Eigenschaften zugeschrieben werden [59,70].

Eine weitere bekannte Gruppe an Inhaltsstoffen sind die Purinalkaloide, an erster Stelle das Coffein sowie das Theophyllin und das Theobromin.

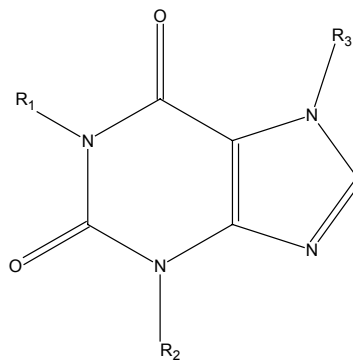


Abb.1.8:Grundkörper der Purinalkaloide

Tab.1.2:Substituenten der Purinalkaloide Theophyllin, Theobromin und Coffein

<i>Purinalkaloid</i>	$R_1$	$R_2$	$R_3$
Theophyllin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
Theobromin	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Coffein	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

Der Coffeingehalt ist in den Pekoblättern mit 4,7 % am höchsten und im unteren Stengelteil mit 1,4 % am niedrigsten.

Bei allen nachfolgend kurz vorgestellten Stoffgruppen, die im grünen Tee vorkommen, ist durch die geringe Konzentration im Grüntee-Extrakt bisher keine Wirkung bei topischer Anwendung bekannt. Grüner Tee enthält zusätzlich noch Carotinoide in geringer Konzentration. Sie sind in erster Linie an der Aromabildung beteiligt. Es sind Verbindungen wie Neoxanthin, Violaxanthin, Lutein und  $\beta$ -Carotin. Triterpenester-saponine vom Oleanan- Typ finden sich ebenfalls in geringen Mengen in der Droge. Aglyka der Blattsaponine (Theafoliasaponine) sind u.a. Barringtogenol C und Camelliagenin A, Säurekomponenten u.a. Zimtsäure und Angelicasäure, Zuckerkomponenten L-Arabinose, D-Xylose, D-Galaktose und D-Glucuronsäure.

Zu erwähnen ist auch noch, dass Grüner Tee einen hohen Gehalt am Mineralstoffen hat. Kaliumionen, die überwiegend als Kaliumfluorid vorliegen, machen ca. 40 % des gesamten Mineralstoffgehaltes aus. Aluminium- und Manganionen lassen sich ebenfalls noch nachweisen [51,67,119,127].

Im grünen Tee finden sich auch flüchtige Stoffe wie Linalool, Geraniol, Benzylalkohol, (trans)-Hex-2-enal, Phenylethylalkohol und Methylsalicylat, wobei Linalool ca. 20 % der flüchtigen Stoffe ausmacht. Diese und weitere nur in Spuren vorkommenden Stoffe sind an der Aromabildung des Tees beteiligt [59,67,109].

#### 1.2.1.4 Wirkungen

##### *Theaflavine und Flavonole*

Den Theaflavinen, die nur im Schwarzen Tee aber nicht im Grünen Tee vorhanden sind, wird eine anticancerogene, kardioprotektive und antioxidative Wirkung zugeschrieben [4,16,65,72,93,139,146]. Die antiinflammatorischen und kapillarabdichtenden Eigenschaften werden dem Proanthocyanidincharakter der Theaflavine zugeschrieben. Die Wirkung soll auf einen Antagonismus an Bradykinin- und Prostaglandin  $\text{PGE}_1$  und  $\text{PGF}_{2\alpha}$  Rezeptoren beruhen [103]. Flavonole besitzen eine kardioprotektive Wirksamkeit [72,122,139].

### Catechine

Die Catechine, die im grünen Tee in besonders hoher Konzentration vorkommen, sind in zahlreichen Quellen aufgrund der antioxidativen und anticancerogenen Wirkung, die u.a. durch die Inhibition des Zellcyclus mit folgender Apoptose der Tumorzelle in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Phase hervorgerufen wird [2], beschrieben. Das führt auch indirekt zu einer kardioprotektiven Wirkung [28,29,44,45,80,81,102,111,151]. Nach Huang et al. [75] führt bei einer isolierten Arterie aus dem Mesenterium der Ratte der Zusatz von Epicatechin zu einer Vasorelaxation. Die Catechinderivate mit einer Gallussäure-Gruppe inhibieren die Tyrosinase [106]. Epigallocatechingallat und das Epigallocatechin sind nach [11] Inhibitoren der Dopa-Decarboxylase und inhibieren ferner die Matrix-Metalloproteinasen vom Typ MMP-2, MMP-9 und MMP-12 [35]. Matrix-Metalloproteinasen (MMP) lockern die extrazelluläre Matrix der Haut, die eine feste und gleichzeitig flexible Anheftung der Keratinozyten und Fibroblasten erlaubt. Das für die Hautelastizität verantwortliche Matrixprotein ist Kollagen. Durch die Hemmung der Matrix-Metalloproteinasen und eine damit verbundene Hemmung des Kollagenabbaus ist ein Antifalten-Effekt durch Behandlung mit Epigallocatechingallat und Epigallocatechin denkbar. Eine Antikarieswirkung des Epigallocatechingallats entsteht durch die Hemmung der Glycosyltransferase von Streptokokken. Dieses Enzym wird für die Bildung von Plaque verantwortlich gemacht [6,64,119,122].

Antioxidantien wie die Catechine verzögern die Oxidation von Fetten in erster Linie durch Abbruch einer Radikalkettenreaktion, weshalb man sie auch zur Stabilisierung von Lebensmitteln einsetzt [124,149]. Dabei nimmt das antioxidative Potential mit der Anzahl der freien Hydroxylgruppen an den Ringen A, B und C zu [97,114].

Nach Luo et al. [90] ist ein polyphenolreicher Grüntee-Extrakt oral aufgenommen in der Lage, die Oxidation des Low-Density Lipoproteins (LDL) zu inhibieren. Die Oxidation von LDL ist z.B. wesentlich mitverantwortlich für das Entstehen von Artherosklerose.

Für die topische Anwendung sind Formulierungen, die Catechine aus Grüntee-Extrakt enthalten, geeignet, das Entstehen von UVB-induzierten Karzinomen signifikant zu unterdrücken [1,3]. Bei der topischen Anwendung von Catechinen ist eine Steigerung der Ceramidbiosynthese beobachtet worden [123]. Ceramide finden sich im Stratum corneum der Haut. Ihr Anteil an den Gesamtlipiden beträgt dort bis zu 50 %.

Die lipidreichen, hydrophoben Ceramide gehören zu den Sphingolipiden und liegen entweder frei oder proteingebunden vor. Ihre Aufgabe ist es, während der Keratinisierungsphase der Haut die proteinreichen, hydrophilen Korneozyten zu verbinden. Betrachtet man die Zusammensetzung der Hornschicht im vereinfachten Modell, so übernehmen die Sphingolipide und die Neutrallipide die Funktion des „Mörtels“ und die Korneozyten die Funktion des „Ziegels“ [24,25]. Die Ceramide werden im Stratum basale im Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Keratinozyten gebildet und müssen, um in den Interzellularraum zu gelangen, durch die Zelle transportiert werden [25]. Da die Ceramide sehr lipophil sind, werden sie dazu an Zucker (Glucose) gebunden. Im Interzellularraum werden sie entweder von der Glucosyl-Ceramidase (Glc-Cerase) in Ceramide überführt oder der Glucose-Ceramid Komplex bindet an die Korneozyten. Durch die Glucosyl-Ceramidase wird die Glucose abgespalten und die Ceramide werden durch die Ceramidase in Sphingosin und an Korneozyten gebundene Fettsäuren gespalten [25].

Die Catechine im Grünen Tee bewirken nun eine Hemmung der Ceramidase und der Glucosyl-Ceramidase und erhöhen somit die Ceramidkonzentration im Stratum corneum. Dadurch erhöht sich die Widerstandsfähigkeit der Haut, dem Wasserverlust und somit der Austrocknung wird entgegengewirkt.

### Coffein

Bei der oralen Einnahme von grünem Tee macht sich in erster Linie die Wirkung des Coffeins in Form einer besseren Durchblutung der Gefäße bemerkbar. Coffein wirkt als endogener Antagonist an den Adenosinrezeptoren ( $A_1$  und  $A_2$ ). Dadurch wird im Zentralen Nervensystem (ZNS) die Freisetzung von überwiegend hemmenden Neurotransmittern wie Dopamin,  $\gamma$ -Aminobuttersäure und Serotonin vermindert. Coffein wirkt somit anregend auf das ZNS, in geringen Dosen schon auf die sensorischen, in höheren Dosen auch auf die motorischen Bezirke. Die Folge ist eine Verringerung des Schlafbedürfnisses, eine Erhöhung der Aufmerksamkeit und eine Verbesserung der Wahrnehmungsfähigkeit. Auch Konzentrations- und Lernvermögen nehmen zu. In der Niere werden die Gefäße durch den Adenosinantagonismus dilatiert.

Dadurch steigt die glomeruläre Filtrationsrate, und es tritt ein natriuretischer und volumendiuretischer Effekt auf. Am Herzen beobachtet man, besonders am insuffizienten Herzen, einen positiv inotropen Effekt.

Im Stoffwechsel werden die Glycogenolyse und die Lipolyse gefördert, die Magensaftsekretion wird ebenfalls angeregt [52,127]. Coffein soll bei der topischen Anwendung in Emulsionen die Lipolyse in der oberen Hautschicht stimulieren und wird daher zur Vorbeugung und Behandlung der Cellulitis eingesetzt.

Die Wirkung der Theaflavine und Flavinsäuren ist sehr komplex. Durch ihren gerbstoffähnlichen Aufbau wirken sie sekretions- und absorptionshemmend sowie antidiarrhoisch. Es wurde außerdem im Tierversuch eine Hemmung der Absorption oral gegebenen Cholesterols und eine gesteigerte Elimination oral gegebenen Epigallocatechingallats beobachtet [31].

#### 1.2.1.5 Toxikologie und Verträglichkeit

Zu Grüntee existieren keine Gefahrenhinweise (R-Sätze) und Sicherheitsratschläge (S-Sätze). Das Catechin erreicht nach der oralen Aufnahme seine maximale Konzentration im Blut nach ca. ein bis zwei Stunden und wird in erster Linie renal ausgeschieden [68]. Die Eliminationshalbwertszeit liegt zwischen 1,0 und 1,5 Stunden. Toxische Effekte konnten nicht nachgewiesen werden. Bei oraler Aufnahme kann es durch das Coffein zu akuten und toxischen Nebenwirkungen kommen. Akut treten ab ca. 300 mg Coffein (5 Tassen Tee) Unruhe, Tremor und gesteigerte Reflexerregbarkeit auf. Der bei chronischer Überdosierung bei Tieren aufgetretene mutagene und teratogene Effekt konnte beim Menschen nicht bestätigt werden [59,137]. Fertilitätsstörungen, bestehend in einer verlängerten Zeit bis zur Empfängnis, werden den Kaffee- und Teegerbstoffen angelastet [145]. Mit Hilfe der Mikrosomen-Degranulationstechnik ergaben sich Hinweise auf eine mögliche Carcinogenität der Gerbstoffe im grünen Tee [98]. Demgegenüber stehen aber die Beobachtungen über Antimutagenität und Anticarcinogenität der Polyphenole, deren Gehalt im grünen Tee sehr hoch ist [65,146]. Durch den hohen Gehalt an Aluminium-Ionen wird ein Zusammenhang mit der Alzheimererkrankung diskutiert [51].

Diese Effekte beziehen sich aber-wie oben schon erwähnt-auf die orale Anwendung von grünem Tee. Nach der topischen Anwendung sind bisher keine Nebenwirkungen bekannt geworden.

Nach Thomsen et al. [138] sind in einem Epicutantest unter okklusiven Bedingungen an insgesamt 50 Probanden bei Applikation eines unverdünnten Grüntee-Trockenextraktes keine nennenswerten Hautirritationen über die Dauer von 48 Stunden aufgetreten. Weitere Messungen erfolgten nach 72 und 96 Stunden. Im Vergleich zum Standard mit entionisiertem Wasser waren keine Unterschiede feststellbar. Über Mutagenität und Toxizität liegen für die topische Anwendung keine Daten vor.

#### 1.2.1.6 Kosmetische Produkte mit Camellia sinensis Extrakt

Estée Lauder	Gesichts- und Augencremes
Clinique	Gesichts-, Körper- und Augencremes
AOK	Gesichtscreme mit Grünem Tee und Vitamin C

## 1.2.2 Terminalia sericea

Stammpflanze: Terminalia sericea

Familie: Combretacea



**Terminalia sericea**

### 1.2.2.1 Allgemeines

Gelbholz gehört zu den weniger bekannten Pflanzen in Europa. Charakteristisch wie bei allen Combretaceen ist der hohe Gehalt an Polyphenolen, Gerbstoffen, Saponinen und Triterpenen. Zur Drogengewinnung werden das Holz, die Rinde und auch die Blätter herangezogen. Durch den hohen Gehalt an Gerbstoffen wird die Droge häufig zum Gerben und Färben von Leder verwendet. Die oralen und topischen Anwendungen erfolgen in erster Linie unter volksmedizinischen Gesichtspunkten, die sich bis heute schulmedizinisch nicht nachweisen lassen.

Die Heikum-Buschmänner (Namibia, Südwestafrika) kochen aus den Gelbholz-Blättern einen Tee gegen Hauterkrankungen, der besonders bei Kindern eingesetzt wird. Im südlichen Afrika wird die pulverisierte und mit Maismehl versetzte Rinde als Diabetesmittel eingesetzt. Als weitere Indikation gelten Diarrhö und Ruhr [63,82].



Ferner findet die Droge Anwendung bei Geschlechtskrankheiten sowie bei Potenzstörungen. Ein Mazerat der Wurzel mit kristallisiertem Urin des Pavians versetzt, dient in Venda (Südafrika) als Mittel zur Behandlung von Impotenz. Eine Wirksamkeit ist aber nicht belegt [7].

Sowohl in der kosmetischen als auch in der pharmazeutischen Industrie findet die Pflanze bisher kaum Verwendung. Diskutiert wird eine antiinflammatorische Wirkung, wobei der Wirkmechanismus noch nicht genau geklärt worden ist.

### 1.2.2.2 Merkmale und Gewinnung

Gelbholz wächst als Strauch oder mittelhoher Baum von ca. 9 m (selten bis 23 m) [87]. Der Stammdurchmesser beträgt ca. 0,5 m. Das harte Holz besitzt eine hellgelbe Farbe. Die Rinde der Zweige ist rotbraun bis schwarzpurpur, die des Stammes stahlfarben mit tiefgehenden Längsrissen. Die kurz gestielten Blätter sind verkehrt eiförmig bis lanzettartig und silbriggrau (daher auch Silver Terminalia genannt) [23,63,73,82,91,109,110]. Beheimatet ist die Pflanze in den tropischen Gebieten aller Erdteile, besonders Südamerika und Südafrika (Botswana, Zululand, Swasiland, Natal, Namibia). Die Blütezeit ist das späte Frühjahr, die Früchte sind oval bis rundlich abgeflacht, ca. 3 cm groß und haben eine rosa Farbe, die mit zunehmendem Alter der Frucht dunkler wird. Die Reifezeit ist im Dezember bis Januar.

### 1.2.2.3 Inhaltsstoffe

Die Pflanzen der Familie der Combretaceen sind sehr reich an Gerbstoffen und Polyphenolen, welche sich ubiquitär in der Pflanze finden. Die Gerbstoffe in Terminalia sericea sind in erster Linie Tannine, d.h. Gallussäure-Dimere (Chebulsäure), Trimere (Tergallussäure) und Tetramere (Gallaginsäure, Terchebulinsäure). Ellagsäure und Gallussäure sind Abbauprodukte. Im Kernholz und in der Rinde befinden sich weiterhin noch polyhydroxylierte Triterpensäuren wie Arjunolsäure, Terminolsäure und Barringtogenol [17,18,20,63].

Bombardelli et al. [18,21] untersuchten in einer Studie die Triterpenoide aus den Wurzeln von *Terminalia sericea*. Als Hauptverbindungen konnten die Sericinsäure (0,05 %), das Sericosid (0,14 %) sowie dessen Isomer, das Arjunglucosid, nachgewiesen werden.

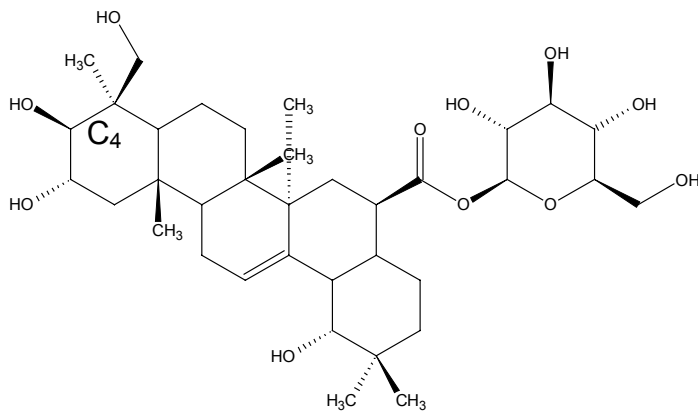


Abb. 1.9:Sericosid

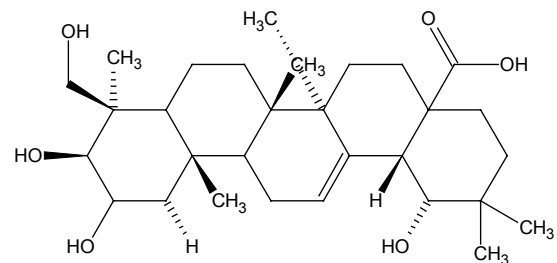


Abb. 1.10:Sericinsäure

Bei der Sericinsäure handelt es sich um eine 2,3,19,24-Tetrahydroxy-12-oleanen-28-säure, bei Sericosid um einen D- Glucopyranolester der 2,3,19,24-Tetrahydroxy-12-oleanen-28-säure. Bombardelli et al. konnten nachweisen, dass ein wässrig-alkoholischer Extrakt von *Terminalia sericea* eine antiinflammatorische Wirkung besitzt, die nach Isolierungsversuchen in erster Linie auf pentacyclischen Triterpensäuren mit Oleanenstruktur (Sericosid und Sericinsäure) zurückzuführen sind [17,104,112].

Bei einem exemplarisch ausgewählten Gelbholz-Extrakt der Firma Indena (Milano, Italien) handelt es sich um einen aufgereinigten Extrakt der Wurzeln und der Rinde von *Terminalia sericea*. Durch wässrig- methanolische Extraktion mit anschließend nachgeschalteten Reinigungsschritten wird ein Sericosidgehalt von ca. 86 % erreicht. Die verbleibenden 14 % setzen sich aus ca. 10 % Arjunglucosid und ca. 4 % nicht näher bestimmbareren Verbindungen zusammen.

Durch den hohen Wirkstoffgehalt des Extraktes ergeben sich mehrere Vorteile bei der Einarbeitung in topische Formulierungen:

- a) Die Wahrscheinlichkeit von auftretenden Nebenwirkungen bzw. Unverträglichkeiten durch evtl. vorhandene Begleitverbindungen wird drastisch gesenkt.
- b) unerwünschte Nebeneffekte wie Verfärbungen der Emulsion, Brechen oder oxidativen Veränderungen von Extrakt und Grundlage treten nicht auf.

#### 1.2.2.4 Wirkungen

In der afrikanischen Volksmedizin ist die wundheilende Wirkung von *Terminalia sericea* schon seit langem bekannt [82]. In Zimbabwe wird die zerkleinerte Rinde in Wasser eingelegt und nach dem Absieben als Antidiarrhoeikum eingenommen [30]. Bei einer durch intradermale Applikation (2 µg/Ratte) von Bradikinin induzierten erhöhten Kapillarpermeabilität führte ein Auftragen von einer 1 %igen Sericosidlösung zu einer Permeabilitätsverminderung von 16 %.

Bombardelli et al. [18] konnten in klinischen Studien zeigen, dass die pentacyclischen Triterpene Sericosid und Sericinsäure aus Wurzel und Rinde von *Terminalia sericea* in einem Carragenin-induziertem Ödem-Test an der Rattenpfote in einer 1 %igen Sericosidlösung nach topischer Applikation eine Ödemhemmung von 35 % gegenüber der Kontrollgruppe aufweisen. Eine 5 %ige Sericosidlösung führt sogar zu einer 40 %igen Ödemhemmung [18]. Bei einem an 12 Ratten durchgeführten UV-Erythemtest führte eine 5 %ige Sericosidlösung zu einer über ein Reflektometer gemessenen Ödemhemmung, die in etwa der einer 3 %igen Phenylbutazonlösung entspricht [18].

Durch die antiinflammatorische Wirkung von *Terminalia sericea* Extrakten, besonders des isolierten Sericosids, bietet sich eine universelle Anwendung in kosmetischen Formulierungen an. Mögliche Einsatzgebiete sind Produkte zur Babypflege und Hautpflege (After Shave Produkte, After Sun Produkte) sowie der universelle Einsatz in Pflegecremes.

### 1.2.2.5 Toxikologie und Verträglichkeit

Die akute Toxizität von isolierten Sericosid beträgt bei der Ratte  $LD_{50} > 2000$  mg/kg [34]. Ein wässrig-alkoholischer Extrakt aus *Terminalia sericea* besitzt eine akute Toxizität von  $LD_{50} > 200$  mg/kg und ist somit toxischer als das isolierte Sericosid, welches aber nach [18] in seiner isolierten Form wirksamer ist als der Gesamtextrakt.

Bei topischer Applikation von Sericosid auf die Kaninchenhaut konnten keine Hautirritationen festgestellt werden. Primäre Reizungen der Haut traten nach topischer Applikation am Kaninchenauge sowie nach intradermaler Applikation von 2x 0,1 ml einer 0,5 %igen sericosidhaltigen Paraffinlösung nicht auf [15,95]. Ein Hautverträglichkeitstest nach Hopf am Meerschweinchen führte zu keiner Sensibilisierung [18,60,74,99,140,158]. Bombardelli et al. testete in einer Anwendungsstudie eine 0,5 %ige, extrakthaltige Emulsion, welche 2 mal täglich appliziert wurde, an 16 Probanden mit sensibler Haut im Alter von 36-60 Jahren auf Verträglichkeit. Hierbei wurden im Untersuchungszeitraum von 4-18 Tagen keinerlei Reizungen oder Rötungen festgestellt [18]. Analog durchgeführte Verträglichkeitstest mit einem in Phospholipiden ähnlich den Liposomen (Phytosome ®) eingebetteten Extrakt aus *Terminalia sericea* ergaben ebenfalls keine Hinweise auf Unverträglichkeiten [13,14,19,20,22,26,33].

### 1.2.2.6 Kosmetische Produkte mit *Terminalia sericea* Extrakt

In Deutschland sind zur Zeit keine kosmetischen Produkte mit *Terminalia sericea* Extrakt im Handel. Die Fa. Guinot (Paris) bietet über das Internet eine Augen- Lifting Creme mit Sericosid-Extrakt gegen geschwollene Augenlider an.

## 1.3 Cyclodextrine

### 1.3.1.1 Allgemeines

Das Anwendungsspektrum der Cyclodextrine in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie ist groß und vielfältig. Als Darreichungsformen kommen neben der topischen auch die orale, rektale, pulmonale, intravenöse und okulare Anwendung in Frage [131,134,135]. In kosmetischen Produkten werden Cyclodextrine u.a. zur Stabilisierung von Wirkstoffen eingesetzt [101,117,128,129]. Eines der Haupteinsatzgebiete der Cyclodextrine ist die Verbesserung der Löslichkeit eines schwerlöslichen Wirkstoffes in wässrigen Systemen [5,32,39,40,42,55,100]. So lässt sich die Löslichkeit von Menadion durch Komplexierung mit  $\beta$ -Cyclodextrin beträchtlich erhöhen [56,132,133]. Amphotericin B bildet nach Katjar et al. [79] in wässrigen Systemen multimolekulare Aggregate. Nach der Komplexierung mit  $\gamma$ -Cyclodextrinen wird eine molekular-disperse Lösung erhalten. Somit wird eine Präzipitation des Amphotericins während der Lagerung verhindert. Für die topische Anwendung ist besonders die Lösungsvermittlung von schwer löslichen UV-Filtern von Bedeutung [78]. Neben der Löslichkeitsverbesserung ist häufig auch die damit veränderte Verträglichkeit des Wirkstoffes von besonderem Interesse [57,58,61]. So besitzen z.B. Tocopherol und Tocopherolacetat als fettlösliche Antioxidantien nach Komplexierung mit  $\beta$ -Cyclodextrinen sowohl ein stärkeres als auch ein längeres antioxidatives Potential gegenüber der frei vorliegenden Form [32,41,142]. Cyclodextrine sind weiterhin in der Lage, das komplexierte Gastmolekül vor Oxidationsreaktionen, die z.B. durch Einwirkung von UV-Strahlung entstehen, zu schützen. Nach Vollmer et al. [144] beeinflussen die verschiedenen Cyclodextrinderivate die Penetration des Wirkstoffes je nach Substitution unterschiedlich. Während das Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin die Absorption des Wirkstoffes am Modell der Franz-Zelle über die Verteilung und Solubilisation erhöht, interagiert das Dimethyl- $\beta$ -Cyclodextrin mit den oberen Hautschichten und führt nach einer Vorbehandlung zur Erhöhung der Absorption.

Die Komplexbildung zwischen der Kavität des Cyclodextrins und des Gastmoleküls kommt durch hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Van der Waals Kräfte zustande [88]. Es werden keine kovalenten Bindungen eingegangen. Mit der Komplexbildung der Wirkstoffe mit Cyclodextrinen ändern sich auch deren physikalische Eigenschaften. Wird zu einer tensidhaltigen Lösung von Natriumdodecylsulfat (SDS)  $\beta$ -Cyclodextrin gegeben, nimmt die Oberflächenspannung der Lösung mit steigender Cyclodextrinkonzentration zu [38]. Übersteigt die Cyclodextrinkonzentration die in der Lösung vorhandene Tensidkonzentration erheblich, nähert sich die Oberflächenspannung der von reinem Wasser. Damit ist sowohl das reine Cyclodextrin, als auch der gebildete Tensid/Cyclodextrinkomplex nicht oberflächenaktiv. Die kristalline Struktur sowie der Schmelzpunkt der entstandenen Komplexe ändern sich gegenüber den Reinsubstanzen. Dadurch ist es möglich, entstandene Komplexe mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie und der Differential Scanning Calorimetrie zu identifizieren [78,128,133].

Cyclodextrine werden auch in unkomplexierter Form direkt als Wirksubstanz eingesetzt. Sie sind in der Lage, nicht erwünschte Geruchsstoffe und Hautlipide zu binden. Dadurch eignen sie sich als Zusatz zu Deo- und Akneprodukten [32,39,92,94].

Ein Nachteil der Cyclodextrine liegt darin, dass sie in ihrer frei vorliegenden Form mit anderen Stoffen unerwünschte Wechselwirkungen eingehen. So ist z.B. das Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin in der Lage, mit phenolhaltigen Konservierungsmitteln stabile Komplexe einzugehen, die zwangsläufig zu einer mikrobiellen Instabilität der Formulierung führen [86]. Interaktionen mit Parfümstoffen, die zu einer Verringerung bzw. Auslöschung der Parfümierung führen können, sind ebenfalls beschrieben. Andererseits macht man sich dieses zu Nutze, um durch Auswahl geeigneter Cyclodextrinderivate und Parfümstoffe die Wasserlöslichkeit der fettlöslichen Parfüme zu erhöhen und ihre Flüchtigkeit zu erniedrigen. Dadurch ist es möglich, Formulierungen lang und ausreichend zu parfümieren [89,118,120]. Des Weiteren existieren Patente, in denen mit Polymeren komplexierte wasserunlösliche Cyclodextrinderivate als Peeling eingesetzt werden [76] und Patente zu Badepräparaten, in die ein Cyclodextrin/Milch Komplex eingearbeitet wird, der die in der Milch enthaltenen Eiweiße und Vitamine in der Formulierung vor Abbaureaktionen während der Produktlagerung schützt [125,126].

### 1.3.1.2 Aufbau der Cyclodextrine

Cyclodextrine bestehen aus cyclischen Oligosacchariden der D-(+)-Glucopyranose, die über eine  $\alpha(1\rightarrow4)$  Bindung miteinander verknüpft sind [9,39,50,117,121] und [130,141,144]. Zur Löslichkeitsverbesserung von Sericosid aus Terminalia sericea Extrakt sind beispielhaft 4 Cyclodextrinderivate ausgewählt worden: Das  $\gamma$ -Cyclodextrin, das HP- $\gamma$ - und das HP- $\beta$ -Cyclodextrin, sowie das M- $\beta$ -Cyclodextrin. Die Abb. 1.11 zeigt den molekularen Aufbau der  $\alpha(1\rightarrow4)$  verknüpften D-(+)-Glucopyranose:

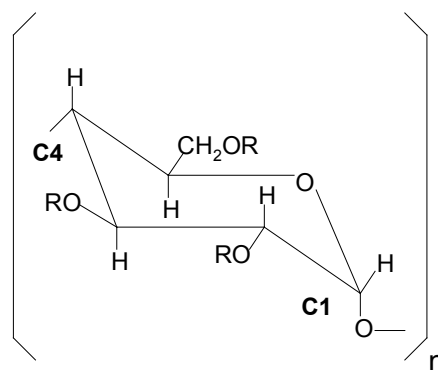


Abb.1.11:D-(+)-Glucopyranose

Tab.1.3:Chemisch-physikalische Parameter der eingesetzten Cyclodextrinderivate

	HP- $\beta$ -Cycl.	M- $\beta$ -Cycl.	$\gamma$ -Cycl.	HP- $\gamma$ -Cycl.
<b>N:</b>	7	7	8	8
<b>R:</b>	[C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O] <sub>x</sub>	CH <sub>3</sub> , H	H	[C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O] <sub>x</sub>
<b>X:</b>	1,2,...	--	--	1,2,...
<b>DS:</b>	0,6-0,9	1,6-1,9	--	0,5-0,7
<b>MG:</b>	~1440	~1310	~1297	~1576
<b>Diameter (Å):</b>	6,0-6,5	6,0-6,5	7,5-8,3	7,5-8,3
<b>Löslichkeit:</b>	H <sub>2</sub> O, EtOH, MeOH	H <sub>2</sub> O, EtOH, MeOH	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O, EtOH, MeOH

Es gilt:

N: Anzahl der Glucopyranosemoleküle im Cyclodextrin

R: substituiertes Restatom-Molekül

X: Anzahl der hintereinander substituierten Molekülgruppen

DS: Durchschnittlicher Substitutionsgrad

MG: Molekulargewicht

(Å): Innerer Durchmesser des hydrophoben Cyclodextrintunnels (Angström)

Bis auf das unsubstituierte  $\gamma$ -Cyclodextrin, welches nur in Wasser löslich ist, lösen sich die substituierten Derivate zusätzlich noch in Ethanol, Methanol sowie organischen Lösungsmitteln [136,143]. Auf die Verwendung des unsubstituierten  $\beta$ -Cyclodextrins ist wegen dessen schlechter Wasserlöslichkeit verzichtet worden.



## 2 Methoden

### 2.1 Auswahl geeigneter Extrakte mittels Dünnschichtchromatographie (TLC)

Bei der Dünnschichtchromatographie handelt es sich um ein Verfahren mit einem mehrstufigen Verteilungsprozess, an dem ein geeignetes Sorptionsmittel als stationäre Phase sowie eine mobile Phase beteiligt sind. Die Trennung der Probenmoleküle erfolgt je nach Polarität an der stationären Phase durch Elution mit dem Laufmittel. Der Retention-Factor (Rf-Wert) gibt an, wie weit eine Substanz auf der mobilen Phase aufgrund von Verteilungsvorgängen wandert [27,36,47,116]. Es gilt das Verhältnis Abstand Start-Substanzfleckenschwerpunkt zum Abstand Start-Laufmittelfront. Der Rf-Wert kann einen Wert  $\leq 1,0$  annehmen, da eine Substanz nicht weiter wandern kann als bis zur Laufmittelfront.

Die Entwicklung geschieht unter Kammersättigung. Nach Trocknung der Platten bei +25 °C über 15 min wird mittels UV- Lampe eine erste Detektion vorgenommen. Das Chromatogramm wird anschließend mit Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz detektiert. Handelt es sich bei den getesteten Extrakten um Trockenextrakte, wird immer 1 mg/ml Lösungsmittel eingewogen. Bei flüssigen Extrakten immer 50 µl/ml. Diese standardisierten Einwaagen sind notwendig, da von den Herstellern der Extrakte vielfach keine Mengenangaben zu den in den Extrakten enthaltenen Wirkstoffen gemacht werden konnten. 10 µl der gelösten Extrakte werden nebeneinander auf der Platte aufgetragen und nach der Entwicklung und Detektion visuell auf das Vorhandensein und die Menge der Wirkstoffe geprüft. Extrakte, die keinen oder nur sehr wenig Wirksubstanz enthalten, werden aussortiert und nicht mehr bearbeitet. Zu beachten ist, dass semiquantitative Aussagen bezüglich eines Wirkstoffes nur von Extrakten gleicher Auftragsmengen (1 mg/ml, bzw. 50 µl/ml) gemacht werden können, nicht jedoch zwischen Extrakten verschiedener Auftragsmengen (1 mg/ml mit 50 ml/ml). Nach der Detektion und der Auswertung werden ein bis drei Extrakte einer Pflanzenfamilie weiterbearbeitet.

## 2.2 Überprüfung der Wirkstoffstabilität in Lösung mittels Dünnschichtchromatographie (TLC)

Die Extrakte werden in 100 ml Lösungsmittel (siehe Abschnitt 6.5.1) gelöst. Bei *Camellia sinensis* handelt es sich um Wasser, bei *Terminalia sericea* um ein Ethanol/Wasser Gemisch im Verhältnis 40/60. Die Einwaagen betragen für Trockenextrakte 1 mg/ml Lösungsmittel, für flüssige Extrakte 50 µl/ml. Die erhaltene Stammlösung wird in vier Teillösungen von 25 ml unterteilt. Die Teillösungen werden mit Essigsäure bzw. Ammoniak auf einen pH Wert von ca. 4, 5, 6 und 7 eingestellt. Pro Teillösungen werden 4 Muster benötigt, insgesamt 16 Muster. Abgefüllt und gelagert werden diese in 1,5 ml Vials. Nach der Detektion des Nullwertes mittels TLC werden die Muster einer Teillösung jeweils bei +6 °C, +25 °C, +40 °C sowie bei +25 °C unter Lichteinfluss eingelagert. Eine erneute Detektion mittels TLC zur Überprüfung der Stabilität des Wirkstoffes erfolgt nach einem, zwei und vier Tagen. Danach werden die Muster in geeigneten Abständen bis zu 21 Tagen detektiert. Zur Überprüfung der Oxidationsempfindlichkeit eines Wirkstoffes werden 5 µl Wasserstoffperoxydlösung 30 % auf 1 ml der Teillösung mit pH 5 gegeben und eine Lagerung bei +25 °C über ca. 19-21 Tage durchgeführt. Die Detektion und Auswertung erfolgt analog der Muster zur Überprüfung der pH- und Temperaturempfindlichkeit.

## 2.3 Ultraviolett-VIS Spektroskopie (UV-VIS)

Bei der UV-Spektroskopie wird die Extinktion in organischen und/oder anorganischen Substanzen enthaltener Chromophoren im Bereich von 200–800 nm gemessen. Die Extinktion (E) ist definiert über [27,36,49,117]:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d = \log I_0 / I \quad \text{Gl.2.1}$$

- $I_0$ : Intensität des eingestrahnten Lichts
- $I$ : Intensität des die Probenlösung verlassenen Messstrahls
- $\varepsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient

Die Extinktion ist der Schichtdicke (d) der zu durchstrahlenden Lösung und der Konzentration des darin gelösten Stoffes (c) proportional.

Die Messungen müssen nur qualitativen Anforderungen genügen. Die zu vermessenden Extrakte werden mit einem entsprechenden Lösungsmittel soweit verdünnt, dass die im Bereich von 330-800 nm auftretenden Extinktions-Maxima, Werte zwischen 0,3 und 0,8 annehmen. Gemessen wird gegen die Probe mit dem reinen Lösungsmittel. Die Messungen erfolgen in einer Quarzküvette mit einer Seitenlänge von 1 cm.

## 2.4 Einwiegen der Rohstoffe für die Rezepturherstellung

Bei den verwendeten Formulierungen handelt es sich um Marktrezepturen. Diese sind den entsprechenden Anforderungen an das geforderte Testdesign angepasst worden. Unter Berücksichtigung der parallel durchgeführten *in vivo* und *in vitro* Testungen sind alle enthaltenen Wirkstoffe und Parfümkomponenten aus der Formulierung entfernt worden. Die als Poolrezepturen bezeichneten Formulierungen werden als Placebos definiert. Die Poolrezepturen mit entsprechendem Extrakt werden als Verum definiert. Nach Hinzufügen einer Komponente (z.B. Wirkstoff beim Verum) wird das Hauptlösungsmittel derjenigen Phase verkleinert, in der sich die entsprechende Komponente löst. So werden die Mengenverhältnisse der einzelnen Phasen zueinander konstant gehalten. Durch die Verwendung galenisch stabiler Poolrezepturen lassen sich auftretende Lagerstabilitätsprobleme der zugesetzten Wirkstoffe sicher erkennen.

Das Herstellungsschema ist bei allen verwendeten Grundlagen ähnlich. Die Ansätze mit *Terminalia sericea* sowie die ersten Ansätze mit *Camellia sinensis* sind unter Labormethoden hergestellt worden. Aufgrund der in der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Empfindlichkeit des *Camellia sinensis* Extraktes gegenüber oxidierenden Substanzen ist eine Herstellung der *Camellia sinensis* Ansätze auf einem Bertsch Mischer (Ankerrührermischer mit Zahnkranzhomogenisator) unter Luftabschluss unumgänglich.

Alle Rohstoffe wurden über das firmeninterne ANCOL® System eingewogen, d.h. Rohstoff, Charge, Haltbarkeit wurden somit elektronisch erfasst und gespeichert.

Das Einwiegen lässt sich in mehrere Arbeitsschritte unterteilen:

1. Erstellen der gewünschten Rezeptur am PC im Ancol System und überspielen der fertigen Rezeptur auf ein Notebook.
2. Einwiegen der Rohstoffe in die entsprechenden Phasen an ein bzw. zwei Waagen, welche vom Notebook angesteuert werden. Die Einwaagengenauigkeit beträgt  $\pm 10\%$  pro Rohstoff. Bei der Wassermenge werden automatisch  $3\%$  (m/m) aufgeschlagen, um eine Massenabnahme durch Verdunsten beim späteren Hochheizen auf ca.  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$  zu kompensieren.
3. Nach dem Einwiegen wird die gespeicherte Einwaage vom Notebook wieder zurück an den PC überspielt. Anschließend werden die verschiedenen Versuche zu Lagerstabilitätsprüfung (siehe Abschnitt 2.8) am PC ausgewählt und die Etiketten für die Zubereitungen ausgedruckt.

## 2.5 Herstellung der Grüntee/Gelbholzextrakt Emulsionen vom Typ O/W und W/O im Labormaßstab ( $\leq 2$ kg)

Alle Gelbholzextrakt enthaltenden Formulierungen vom Typ O/W und W/O sind nach dem Herstellungsschema aus Tabelle 2.1 gerührt worden. Es wurden Ansätze mit einer W/O Creme, einer O/W Creme sowie einer O/W Lotion entsprechend den Poolformulierungen aus Abschnitt 6.3.1, 6.3.2 und 6.3.4 hergestellt.

Grüner Tee-Extrakt wurde in die W/O Creme und in die O/W Creme entsprechend den Pollrezepturen aus Abschnitt 6.3.1 und 6.3.2 eingearbeitet.

Tab.2.1: Herstellungsschemata der O/W und W/O Formulierungen für Chargengrößen ( $\leq 2$  kg)

<i>Nr.</i>	<i>Aktuelle Temp. (°C) Produkt</i>	<i>Arbeitsschritt</i>	<i>Parameter</i>
01	ca. 25	Aufheizen der Fettphase (80 °C) im Wasserbad; Aufheizen der Wasserphase (75 °C) auf dem Ceranfeld	
02	80	Vorlegen der Fettphase im Planetenrührer (Kitchen Aid)	60 upm
03	75	Zugabe der Wasserphase	60 upm
04	73	Zugabe der Verdickerphase	60 upm
05	65	Heißhomogenisierung über Rotor/Stator Homogenisator (Homozenta)	2800 upm, Stufe 1 (Spaltbreite: 0,2 mm) einfacher Durchlauf
06	64	Kaltrühren mittels Planetenrührer auf 35 °C (Kitchen Aid)	20-30 upm
07	35	Zugabe Wirkstoffphase(n), evtl. Parfumphase	
08	30	Kalthomogenisierung über Rotor/Stator Homogenisator (Homozenta)	2800 upm, Stufe 1 (Spaltbreite: 0,2 mm) einfacher Durchlauf

Nach ca. 24 Stunden Lagerung der Formulierung bei Raumtemperatur wird diese anschließend in Gläser oder Tuben abgefüllt (je nach Menge und Konsistenz: Spatel, Spritze, Tubenfüllmaschine). Bei Ansätzen mit Cyclodextrin/Wirkstoffkomplexen wird zuerst der Wirkstoff in der wässrigen Cyclodextrinlösung komplexiert und als kalte Wirkstoffphase in die Formulierung bei 35 °C eingearbeitet.

## 2.6 Herstellung der Grüntee-Extrakt Emulsionen unter Luftausschluss vom Typ O/W und W/O im Technikummaßstab (2-5 kg)

Gearbeitet wurde mit der W/O und O/W Poolrezeptur aus Abschnitt 6.5.1 und 6.5.2. Wegen der Oxidationsempfindlichkeit der im Grüntee-Extrakt enthaltenen Catechine ist unter Luftausschluss gearbeitet worden.

Tab.2.2:Herstellungsschemata der O/W und W/O Formulierungen für Chargengrößen von 2–5 kg

<i>Nr.</i>	<i>Aktuelle Temp. (°C) Produkt</i>	<i>Arbeitsschritt</i>	<i>Funktionsänderung Mischer</i>	<i>Parameter</i>
01	ca.25	Vorlegen der Wasserphase in den Mischer	Heizen ein Rühren ein Vakuum ein	Auf 75 °C 100 upm -0,5 bar
02	75	80 °C Fettphase über Vakuum einziehen	Homogenisator	2000 upm/120 s
03	73	Verdickerphase zugeben	Kühlung ein	Auf 25 °C in 60 min abkühlen 100 upm
04	65	Heißhomogenisation	Homogenisator	6000 upm/180 s
05	39	Wirkstoffphase(n) über Vakuum einziehen		100 upm
06	38	pH-Wert bei geöffneten Deckel überprüfen (O/W)	Vakuum aus Rührer aus	
07	37	Auf pH 4-5 einstellen	Vakuum ein Rührer ein	-0,5 bar 100 upm

08	34	Kalthomogenisation	Homogenisator	6000 upm/180 s
09	25	Ausblasen der Formulierung aus dem Mischer mit Argon	Kühlen aus Rührer aus Vakuum aus	⇒ Abfüllung

Die Ansätze werden in die zuvor mit Argon ausgeblasenen Tuben gefüllt. Dies geschieht direkt aus dem Mischer über einen kleinen Flansch. Die Tuben werden mit der hinteren, offenen Seite über den Flansch gehalten. Nach dem Befüllen werden die Tuben sofort verschlossen. Dabei soll sich möglichst kein Gasraum mehr in der Tube zwischen Falz und der Formulierung befinden. So wird eine Sauerstoffkontamination der Cremeformulierung beim Abfüllen weitgehend eliminiert.

## 2.7 Herstellung der W/O/W Grüntee-Emulsion im Technikummaßstab

Durch die Einarbeitung von Grüntee-Extrakt in eine W/O/W Formulierung sollte die Lagerstabilität der Catechine durch eine zusätzliche Absenkung des pH-Wertes (pH ca.3 anstatt 5) verbessert werden. Durch die Einarbeitung des Grüntee-Extraktes in die innere Wasserphase, die einen niedrigeren pH-Wert (pH ca.3) als die äußere Wasserphase (pH 5,5) besitzt, muss nicht die gesamte Wasserphase wie bei einer O/W oder W/O Emulsion auf einen so niedrigen pH-Wert eingestellt werden. Ein pH-Wert unter 4,5 führt zu einer leichten Austrocknung der Haut. Daher sind die W/O und O/W Emulsionen (siehe Abschnitt 2.5 und 2.6) nicht unter pH 5 eingestellt worden.

Die Herstellung der W/O/W Formulierung erfolgt analog zum Protokoll in Abschnitt 2.6. Da es sich bei diesem Verfahren um eine 2-Stufen Herstellung handelt, wird zuerst eine W/O Emulsion analog zum obigen Herstellungsschema gerührt, jedoch ohne eine Abfüllung in Tuben. Anschließend wird die äußere (2.) Wasserphase unter Vakuum eingezogen und noch 20 min bei 60 upm gerührt. Die Abfüllung erfolgt in Aluminiumtuben oder Polyethylenterephthalat (PETP)-Flaschen.

Auf eine weitere Homogenisierung nach Zugabe der äußeren Wasserphase wird verzichtet, da dies zu einer Zerstörung der W/O/W Struktur (vermischen der inneren und äußeren Wasserphase) führt.

## **2.8 Stabilität der Formulierungen**

Nach dem Abfüllen in Gläser, Tiegel oder Tuben werden die einzelnen Muster je nach Lagerungsart und Methode etikettiert. Anschließend erfolgt die Einlagerung der Muster unter definierten Bedingungen in Bezug auf Temperatur, Lichteinfluss und Lagerungsdauer. Die Einlagerungszeiten der Muster sind auf die entsprechenden Stabilitätstests abgestimmt. Unter den definierten Stressfaktoren Temperatur, Lichteinfluss und Lagerungsdauer der einzelnen Stabilitätstests ist es möglich, auftretende galenische Stabilitätsprobleme früh zu erkennen und zu beheben. Ansonsten müssten die Ansätze nach den gesetzlichen Vorgaben über 30 Monate bei +25 °C gelagert werden, was einen enormen Zeitaufwand bedeutet. Folgende Stabilitätsuntersuchungen werden durchgeführt:

### **2.8.1 Rückmusterprüfung (RÜCK)**

Eine Rückmusterprüfung erfolgt nach 1, 28, 90, 180 und 360 Tagen. Gelagert wird bei +25 °C im Glasbehälter. Die Probenmenge liegt bei mindestens 100 ml. An den Prüfterminen wird eine mikroskopische Beurteilung auf eine intakte Phasenstruktur durchgeführt.



### **2.8.2 pH-Wert (PH)**

Die Messung des pH-Wertes erfolgt aus dem Rückmustergefäß (+25 °C) nach 1, 28, 90, 180 und 360 Tagen. Gemessen wird direkt aus der Wasserphase der O/W bzw. W/O/W Emulsionen mittels pH-Elektrode (siehe Abschnitt 6.5.5). W/O Emulsionen werden nicht überprüft, da eine Auftrennung der einzelnen Phasen mit Chloroform nach der gegebenen Methode unbefriedigende pH-Wert Messergebnisse liefert.

### **2.8.3 Konsistenz (KO) bzw. Viskosität (VIS)**

Je nach Viskosität der Formulierung werden die Muster einer Konsistenz- (> 5 Pa \* s) bzw. einer Viskositätsmessung (< 5 Pa \* s) unterzogen. Die Viskosität wird aus 250 ml Gläsern gemessen, die Konsistenz aus 150 ml Alutiegeln. Die Lagerung erfolgt bei +25 °C. Gemessen wird nach 1, 30, 90 und 180 Tagen.

### **2.8.4 Schaukeltest (SCHAT)**

Es werden je Probe 6 Durchgänge im Bereich von –10 °C bis +40 °C geschaukelt. Der Temperaturwechsel erfolgt alle 12 Stunden, also ein Durchlauf/Tag. Die Abfüllung und Lagerung erfolgt in 30 ml Gläsern. Eine mikroskopische Beurteilung auf intakte Phasenstruktur wird nach 3 und 6 Tagen unternommen. Um bei den Sericosid/Cyclodextrin-haltigen Formulierungen Hinweise auf eine evtl. auftretende Komplexinstabilität durch Rekristallisation des Sericosids zu bekommen, werden diese Ansätze über einen Zeitraum von 30 Tagen geschaukelt.

### **2.8.5 Stabilitätstest Creme/Lotion (STCL)**

Diese Methode umfasst gleich 3 Lagerungsarten. Getestet wird die Stabilität der +25 °C Muster (siehe Rückmuster), der +40 °C Muster und der Lichtmuster. Die Lagerung erfolgt in 30 ml Gläsern. Beurteilt wird nach 30, 90 und 180 Tagen.

Die +40 °C Muster werden im Brutschrank gelagert und bei jedem Prüftermin mikroskopisch beurteilt. Die Lichtmuster werden am Laborfenster der Sonneneinstrahlung ausgesetzt. Die letztgenannte Lagerungsmethode bietet zwar keine einheitlichen Lagerbedingungen hinsichtlich Temperatur, Lichteinstrahlungsdauer und-intensität, simuliert jedoch eine „verbrauchernahe“ Stresssituation der Formulierung, sofern sie als marktfähiges Produkt in Glastiegel abgefüllt werden würde.

### **2.8.6 Kühlschrankmuster (+6 °C)**

Die Lagerung erfolgt in 30 ml Gläsern über 28 Tage jeweils 8 Stunden bei +6 °C sowie 16 Stunden bei +25 °C im Wechsel. Die Muster werden alle 7 Tage beurteilt. An Wochenenden wird bei konstant +6 °C gelagert. Nach 28 Tagen werden die Muster einer mikroskopischen Beurteilung auf intakte Phasenstruktur unterzogen.

### **2.8.7 Eisschrankmuster (-10 °C)**

Die Lagerung im Eisschrank erfolgt analog der Lagerung der Kühlschrankmuster. Anstatt bei +6 °C wird bei –10 °C gelagert. Eine Beurteilung erfolgt alle 7 Tage. Nach 28 Tagen werden die Muster einer mikroskopischen Beurteilung unterzogen.

## **2.9 Lagerung und Verpackung der Analytikmuster (Lagerstabilität der Wirkstoffe)**

Für die Lagerstabilität der Wirkstoffe in den Formulierungen werden sämtliche Analytikmuster (Ausnahme: Lichtmuster) in 50 ml Alutuben abgefüllt und gelagert. Die Proben werden direkt nach der Herstellung der Formulierung (Nullwert) nach 30, 90 sowie nach 180 Tagen untersucht. Pro Untersuchungstermin werden 4 Muster benötigt, die konstant bei +6 °C, +25 °C, +40 °C und +25 °C + VIS (Lichtmuster in Normalglas) gelagert worden sind.

## **2.10 Flüssigchromatographie-Massenspektroskopie Analytik (LC/MS)**

Die Methodenentwicklung ist Bestandteil einer Arbeit von M. Frauen [54]. Die Daten zur LC/MS Analytik wurden aus dieser Arbeit entnommen. Die Wirkstoffgehalte werden mit der Atmospheric Pressure Ionisation-Electrospray (API-ES) Technik ermittelt. Hierbei werden die Analytmoleküle selektiv unter Atmosphärendruck ionisiert und durch elektrostatische Potentiale unter Abtrennung neutraler Lösungsmittelmoleküle in den Hochvakuumbereich des Massenspektrometers geleitet.

Wegen des hohen Probenaufkommens zur Bestimmung der Wirkstoffgehalte in den Formulierungen wird die Bestimmung nach einer zuvor durchgeführte Methodvalidierung durchgeführt. Jede Probe wird daher nur einmal anstatt dreimal vermessen. Zur Validierung der Methode werden die Parameter Nachweis- und Bestimmungsgrenze der einzelnen Leitsubstanzen untersucht. Diese sind über die Peak-Rausch-Verhältnisse der Standardlösungen gegeben [54]. Die Nachweisgrenze wird demnach als dreifaches Peak-Rausch-Verhältnis definiert, die Bestimmungsgrenze als zehnfaches Peak-Rausch-Verhältnis. Die Wiederfindungsraten werden mit Hilfe von dotierten Placebos (Formulierung ohne Leitsubstanz) ermittelt, indem isolierte Leitsubstanzen vor der Probenaufbereitung mit den Placebos in bestimmten Konzentrationen versetzt werden.

Da die Wiederfindungsraten der Leitsubstanzen bei beiden eingesetzten Extrakten nahe 100 % liegen, wird für die späteren Messungen der Proben nur eine Standardkalibrierung vorgenommen. Eine Matrixkalibrierung (Placeboformulierung) ist somit nicht mehr erforderlich. Zur Charakterisierung der Einzelmesswerte ( $n = 6$ ) werden die relative Standardabweichung und der Vertrauensbereich ( $P = 95 \%$ ) herangezogen. Zur Ermittlung der Parameter werden die Leitsubstanzen aus den Formulierungen mehrfach extrahiert und die Gehalte analysiert und miteinander verglichen. Da die verwendeten Pflanzenextrakte an sich sowie die Formulierung ein homogenes Gemisch darstellen, ist eine gute Reproduzierbarkeit gegeben.

Die Messung werden sowohl an einer O/W als auch an einer W/O Emulsion durchgeführt. Zur besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sind einheitliche Grundlagen verwendet worden (siehe Abschnitt 6.3). Alle Gehalte sind nach einer validierten Methode gemessen worden und werden in den Grafiken ohne Fehlerbalken bzw. in den Tabellen ohne Standardabweichungen dargestellt, da nur jeweils eine Messung pro Probe vorgenommen worden ist. Weiterführende Daten sind aus [54] zu entnehmen.

## 2.11 Verteilungskoeffizient ( $\log P_{OW}$ )

Die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten erfolgte in der Abteilung „*in vitro* Verträglichkeit/Screening“, BDF AG. Der Verteilungskoeffizient bzw. der Partition Coefficient einer Substanz macht eine Aussage in Bezug auf die Polarität einer Substanz. Gemessen wird die Verteilung der zu untersuchenden Substanz in zwei weitgehend nicht miteinander mischbaren Lösungsmitteln. In diesem Fall wird die Verteilung zwischen dem lipophilen n-Octanol und dem hydrophilen Wasser gemessen. Der Verteilungskoeffizient wird üblicherweise als Logarithmus zur Basis 10 angegeben (dimensionslose Größe).

Er ist definiert als:

$$\log P_{OW} = \log_{10} \left( \frac{C_{n\text{-Octanol}}}{C_{\text{Wasser}}} \right)$$

Gl.2.2

Das Maß der Verteilung einer Substanz bzw. deren Gleichgewichtseinstellung zwischen den beiden Lösungsmitteln ermöglicht eine Abschätzung im Penetrationsverhalten am Schweinehautmodell (siehe Abschnitt 2.12). Generell lässt sich sagen, dass Substanzen mit einem  $\log P_{OW} > 4$  gar nicht oder nur unzureichend in die oberen Hautschichten penetrieren werden. Gemessen wird nach der „OECD Guideline for testing of chemicals No.117“ [108] mittels HPLC und Refraktions Index (RI)-Detektor, die sich zur Bestimmung von Substanzen mit einem  $\log P_{OW}$  von 0-6 eignet. Die Methode ist modifiziert worden, sodass Bestimmungen im Bereich von  $\log P_{OW}$  0-10 möglich sind.

Zur Bestimmung wird die zu untersuchende Substanz unter gleichbleibenden definierten Bedingungen (Säulendruck, Säulendurchfluss, Temperatur etc.) über eine C18 Säule gegeben und die Retentionszeit ermittelt.

Als Vergleich werden von 8 Standards, deren  $\log P_{OW}$  bekannt ist, ebenfalls die Retentionszeiten ermittelt. Der  $\log P_{OW}$  berechnet sich über die erhaltene Regressionsgerade mit:

$$\log P_{OW} = A + B \times \log k' \quad \text{Gl.2.3}$$

Unter  $k'$  versteht man den Kapazitätsfaktor [96] mit:

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad \text{Gl.2.4}$$

$t_R$ : Retentionszeit der Proben/Standards (Zeitpunkt R)

$t_0$ : Zeit, welche die mobile Phase benötigt, um durch die Trennsäule zu wandern (Totzeit)

Nach Erstellung einer Kalibriergerade, bei der die berechneten  $\log k'$ -Werte der Standards gegen die  $\log P_{OW}$  Werte aufgetragen werden, lässt sich A und B berechnen. Über die gemessene Retentionszeit des Wirkstoffs, Berechnung von  $\log k'$ , lässt sich mit Hilfe der Regressionsgeraden der Verteilungskoeffizient bestimmen.

Gemessen wird in zwei verschiedenen pH-Systemen (pH 3,0; pH 7,4), um eine evtl. pH-Wert abhängige Änderung der Retentionszeit und damit den Verteilungskoeffizienten erfassen zu können.

## 2.12 Penetration an exzidierte Schweinehaut (PEN)

Die Penetrationsmessungen sind nach dem Standardprotokoll „Cosmetic Ingredients: Guidelines for percutaneous absorption/penetration“ [37] gemessen worden. Die Bestimmung erfolgte in der Abteilung „*in vitro* Verträglichkeit/Screening“ der BDF AG. Die exzidierte, enthaarte und von der Fettschicht befreite Schweinehaut wird mit der dermalen Seite auf die Unterseite der Franz-Diffusionszelle gelegt. Die Prüfung auf Unversehrtheit der Haut erfolgt visuell. Die Diffusionszelle besteht aus zwei einzelnen, doppelwandigen, temperierbaren Glaskammern.

Die untere Zelle ist mit Rezeptorflüssigkeit gefüllt, die aus einer wässrigen Lösung mit 0,9 % Natriumchlorid, 0,1 % Gentamycin und 1 % Albumin in Phosphatpuffer pH 7,4 zusammengesetzt ist und ein Blutimitat darstellt (siehe Abschnitt 6.5.7).

Um eine evtl. auftretende Penetration des Wirkstoffes aus der präparierten Schweinehaut in die Rezeptorflüssigkeit ungehindert zu ermöglichen, darf sich zwischen der Rezeptorflüssigkeit und der präparierten Haut keine gasförmige Phase (z.B. Luft) befinden. Die Rezeptorflüssigkeit wird während der Equilibrierung mit einem Magnetrührer bei 150 upm gerührt, um eine optimale Wirkstoffverteilung und Gleichgewichtseinstellung zu gewährleisten. Das Aufsetzen der Zelloberseite dient zur Vermeidung von Wasserverlust durch Verdunstung und gewährleistet konstante Hydratationsbedingungen in der präparierten Haut. Nachdem ca. 20 mg der Formulierung mit einer kosmetisch-relevanten Wirkstoffkonzentration auf die Schweinehaut (ca. 5 cm<sup>2</sup>) aufgetragen und gleichmäßig verteilt worden sind, wird die Zelle verschlossen.

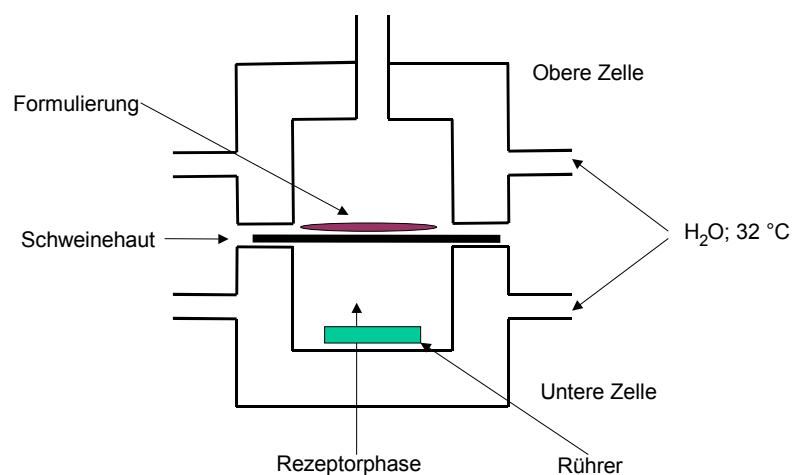


Abb.2.1:Aufbau der Diffusionszelle nach Franz

Pro Penetrationsstudie werden insgesamt drei präparierte Schweinehäute benötigt, da jeweils zwei Vera mit identischer Wirkstoffkonzentration gegen ein Placebo (unbehandelte Haut) gemessen werden. Die Inkubationszeit beträgt 20 Stunden bei  $32\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ . Nach der Equilibrierung werden die Wirkstoffkonzentrationen in der Hautoberfläche, Hornschicht, Epidermis, Dermis sowie der Rezeptorphase analysiert. Die Präparation erfolgt nach unterschiedlichen Schemata, die im Folgenden dargestellt werden:

#### Cremerückstand

Der auf der Hautoberfläche verbliebene Cremerückstand wird mit einem Spatel vorsichtig entfernt und mit 2-Propanol als Lösungsmittel in ein Probengefäß gegeben (siehe Abschnitt 6.5.7). Bis zur Aufarbeitung für die LC/MS Messung wird die Probe bei  $+6\text{ °C}$  gelagert.

#### Hornschicht

Die Hornschicht wird auf  $+40\text{ °C}$  erwärmt und anschließend durch 15-20 faches, hintereinanderfolgendes Abstreifen mit Tesafilm entfernt. Der Tesafilm wird mit leichtem Druck für ca. 10 Sekunden auf die Haut gestrichen und anschließend abgezogen. Im Mittel wird 18 mal gestrippt. Die Tesafilme werden in 6 Fraktionen zu jeweils 3 Strips aufgeteilt und nach Zusatz von 2-Propanol bis zur Messung bei  $+6\text{ °C}$  gelagert.

#### Epidermis

Die Trennung der Epidermis von der Dermis erfolgt durch Hitzebehandlung.

Die Hautprobe wird mit der epidermalen Seite 45 Sekunden unter leichtem Druck auf ein  $+80\text{ °C}$  heißes Ceranfeld gelegt. Anschließend lässt sich die Epidermis von der Dermis mit Hilfe eines Spatels abtrennen. Für die Extraktion wird die Epidermis mit 2-Propanol versetzt und über 24 Stunden bei  $+50\text{ °C}$  gelagert. Die abgekühlte Lösung wird bis zur Vermessung bei  $+6\text{ °C}$  gelagert.

#### Dermis

Die Dermis wird in kleine Stücke zerschnitten und mit 2-Propanol über 48 Stunden bei  $+50\text{ °C}$  extrahiert. Bis zur Durchführung der LC/MS Analytik wird die Lösung bei  $+6\text{ °C}$  gelagert.

### Rezeptorphase

Die Rezeptorphase besteht aus der equilibrierten Rezeptorflüssigkeit. Diese wird im Verhältnis 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt und direkt mittels LC/MS vermessen.

## **2.13 Identifizierung der Sericosid-Kristalle mittels IR-Raman Spektroskopie**

Das Prinzip der IR-Raman Spektroskopie beruht darauf, dass bei Einstrahlung von monochromatischem Licht auf eine chemische Verbindung außer der Primärfrequenz des angeregten Lichtes auch noch davon abweichende, schwache Linien (Raman Linien) entstehen. Diese werden durch Schwingungen und Rotationen der streuenden Moleküle hervorgerufen [27,48,116]. Nach einem Verfahren von Rapp et al. [113] ist es möglich, in Emulsionen enthaltene Kristalle mittels IR-Raman gegen einen Standard zu messen und zu identifizieren.

Die Raman-Frequenzen ( $\nu_{RA}$ ) ergeben sich zu:

$$\nu_{RA} = \nu_0 + \nu_S + \nu_R \quad \text{Gl.2.5}$$

- $\nu_0$ : Erregerfrequenzlinie
- $\nu_S$ : Schwingungsfrequenzlinie
- $\nu_R$ : Rotationsfrequenzlinie

Raman- und IR-Spektren liefern häufig komplementäre Bilder des Schwingungsspektrums [86]. Die Raman-Linien zeigen die Modulation der Polarisierbarkeit bei einer Schwingung, die IR-Banden die des Dipolmoments eines Moleküls. Daher werden im Raman-Spektrum besonders unpolare Molekülgruppen erfasst, während im IR-Spektrum weitgehend polare Molekülgruppen Linien ergeben.

Das auskristallisierte Sericosid aus der Terminalia sericea-haltigen Formulierung wird gegen den reinen Extrakt (Standard) gemessen. Der Standard wird ohne Aufbereitung direkt auf dem Objektträger vermessen. Die Formulierung wird vor der Mes-



sung auf einem Objektträger ausgestrichen, um zuerst ein Verdampfen der Wasserphase zu ermöglichen.

Anschließend wird die Fettphase mit n-Hexan vorsichtig vom Objektträger gewaschen. Durch die hohe Polarität der Sericosid-Kristalle bleiben diese an der Oberfläche des Objektträgers haften und können daraufhin isoliert ohne Beeinflussung der Cremegrundlage untersucht werden.

## 2.14 Bildung von Wirkstoff/Cyclodextrinkomplexen

Die Komplexbildung eines Wirkstoffes mit einem Cyclodextrinderivat stellt einen exothermen Vorgang dar.

Nach der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (Druck= konst.) gilt:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad \text{Gl.2.6}$$

$\Delta G$ : Freie Reaktionsenthalpie

$\Delta H$ : Reaktionsenthalpie

$\Delta S$ : Entropie

T: Temperatur

Wenn  $\Delta G$  einen negativen Wert annimmt, läuft eine freiwillige Komplexbildung ab [27]. Die Bildung von Wirkstoff/Cyclodextrinkomplexen wird durch Van der Waals Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen sowie hydrophobe Wechselwirkungen ermöglicht [88]. Kovalente Bindungen werden nicht eingegangen.

### **2.14.1 Herstellung der Sericosid/Cyclodextrinkomplexe (Pulver) unter Temperatureinfluss**

In einem Schraubdeckelglas werden die entsprechenden Cyclodextrinderivate in Wasser unter Rühren auf dem Magnetrührer gelöst. Anschließend wird je nach gewünschten molaren Verhältnis die entsprechende Menge an Terminalia sericea Extrakt hinzugegeben und der Ansatz auf  $+70\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  (automatische Temperaturregelung) über 180 min bei 500 upm erhitzt. Die Probe wird daraufhin über ca. 60 min bei 250 upm kaltgerührt. Die Lösungen werden anschließend im IR-Vortex-Evaporator bei  $+60\text{ °C}$  und entsprechendem Unterdruck zur Trockne eingeengt. Durch die starke Schaumbildung, besonders der teilweise eingeengten Proben, muss der Unterdruck ständig verändert werden, um ein Übersäumen der Proben zu verhindern.

Anschließend wird der Rückstand mittels Reibschale und Pistill zerrieben und auf einer Aluminiumtiegel-Unterschale 24 Stunden bei  $+40\text{ °C}$  im Brutschrank nachgetrocknet. Die Proben werden nach dem Abkühlen in Braunglasflaschen abgefüllt.

### **2.14.2 Herstellung der Sericosid/Cyclodextrinkomplexe (Pulver) bei Raumtemperatur**

Die Herstellung der Cyclodextrinkomplexe bei Raumtemperatur ( $+25\text{ °C}$ ) entspricht größtenteils der Methode aus Abschnitt 2.14.1. Die gewünschte Menge an Terminalia sericea Extrakt wird zu der Cyclodextrinlösung gegeben und auf dem Magnetrührer bei 250 upm gerührt. Die Equilibrierung läuft bei  $+25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  über 24 Stunden. Anschließend werden die Proben im IR-Vortex-Evaporator bei  $+25\text{ °C}$  mit entsprechendem Unterdruck bis zur Trockne eingeengt. Zerreibung, Nachtrocknung und Lagerung erfolgen analog Abschnitt 2.14.1.

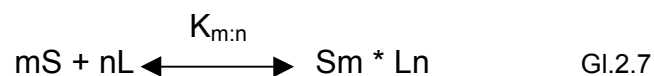
### 2.14.3 Herstellung der Sericosid/Cyclodextrinkomplexe für die Emulsionsansätze

Das Einwiegen und die Equilibrierung werden wie unter 2.14.1 durchgeführt. Die erhaltene Lösung wird nicht mehr im Vortex-Evaporator getrocknet, sondern direkt als Wirkstoffphase bei ca. +35 °C in die bisher nur heiß homogenisierte Cremeformulierung eingearbeitet. Anschließend erfolgt bei +30 °C eine Kalthomogenisation. Alle weiteren Arbeitsschritte entsprechen der in Abschnitt 2.5 aufgelisteten Herstellungsverfahren.

## 2.15 Bestimmung der Komplexbildungskonstante ( $K_{m:n}$ )

### 2.15.1 Berechnung der Komplexbildungskonstante $K_{m:n}$

Der komplexierte Ligand (Sericosid und Cyclodextrin) einer Einschlussverbindung befindet sich in Lösung in einem kinetischen und thermodynamischen Gleichgewicht mit dem freien Liganden (Cyclodextrin). Die Stärke der Komplexbildung zwischen Wirkstoff und Cyclodextrinderivat kann durch die Komplexbildungskonstante  $K_{m:n}$  dargestellt werden.



- S: Substrat (Sericosid)  
 L: Ligand (Cyclodextrin)  
 $K_{m:n}$ : Komplexbildungskonstante  
 m,n: Stoffmengen (Molzahlen)

Idealerweise wird zur Einarbeitung in topische Formulierungen ein löslicher Sericosid/Cyclodextrinkomplex angestrebt. Nach dem Massenwirkungsgesetz ergibt sich für  $K_{m:n}$ :

$$K_{M:N} = (S_m \cdot L_n) / [(S)^m(L)^n] \quad \text{Gl.2.8}$$

Je nach Größe der Komplexbildungskonstante wechselt die Konzentration an komplexierten Ligand (Sericosid/Cyclodextrin) und die Konzentration an unkomplexierten Substrat (Sericosid) und Ligand (Cyclodextrinderivat) in Lösung. Zur Berechnung der Komplexbildungskonstante eignet sich die Löslichkeitsmethode, die mit als die wichtigste aller Methoden anzusehen ist. Ein großer Vorteil ist ihre einfache, praktische Durchführbarkeit. Gemessen wird dabei die Änderung der Sättigungslöslichkeit des Substrates in Abhängigkeit von der zugesetzten Cyclodextrinkonzentration. Die Löslichkeitsmethode ist von Higuchi et al. [71] ausführlich beschrieben worden. Hierzu wird ein Überschuss an Substrat mit unterschiedlich konzentrierten Cyclodextrinlösungen versetzt und equilibriert. Nach der Gleichgewichtseinstellung wird der verbleibende, überschüssige Bodensatz des zu komplexierenden Substrates aus der Lösung entfernt (abzentrifugiert). Anschließend erfolgt eine analytische Bestimmung der Konzentration an ungebundenem und komplexiertem Substrat in der Cyclodextrinlösung. Wird die Löslichkeitsänderung des Substrates bei konstanter Temperatur in Abhängigkeit von der Cyclodextrinkonzentration dargestellt, erhält man eine Lösungsisotherme. Man unterscheidet zwei Arten von Lösungsisothermen [39,71,100], nämlich Typ A und Typ B.

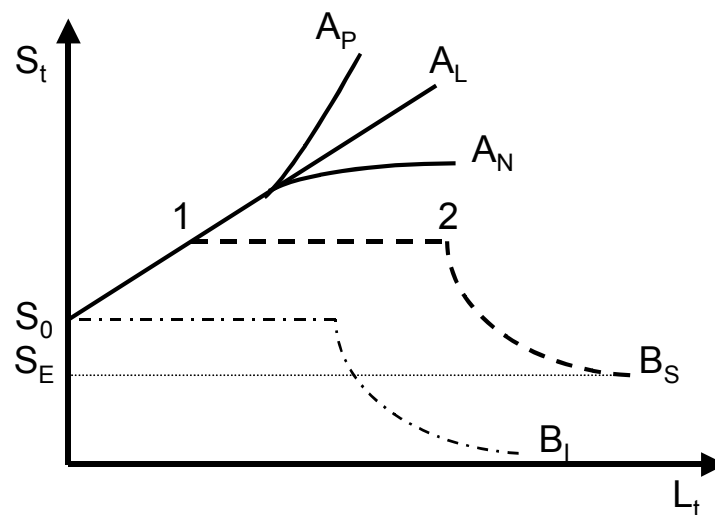


Abb. 2.2: Darstellung der Lösungsisothermen vom Typ A und Typ B

- $S_0$ : Sättigungslöslichkeit des freien Wirkstoffes/Substrates  
 $S_t$ : Sättigungslöslichkeit des Wirkstoffes/Substrates nach Zugabe von Komplexbildner/Ligand  
 $S_E$ : Sättigungslöslichkeit des entstandenen Komplexes  
 $L_t$ : Konzentration Komplexbildner/Ligand

Die Kurven  $A_N$ ,  $A_P$ ,  $A_L$ ,  $B_S$  und  $B_I$  stellen Untergruppen der Lösungsisothermen vom Typ A und B dar, die im Text ausführlicher beschrieben werden.

Die Lösungsisotherme vom Typ A kann drei Varianten annehmen. Bei dem Typ  $A_L$  handelt es sich um einen linearen Verlauf, wie er bei Komplexierungsverhältnissen der Art  $S_1L_1$ ,  $S_2L_1$ ,  $S_3L_1$  bzw.  $S_ML_1$  zu finden ist. Dies gilt für 1:1 Komplexe und für Komplexe, bei denen mehrere Substrate mit einem Liganden gleichzeitig einen Komplex eingehen. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Gastmolekülkonzentration  $S_t$  und Komplexbildnerkonzentration  $L_t$ .

Lösungsisothermen vom Typ  $A_P$  (positiver Verlauf) weisen auf Komplexe höherer Ordnung hin ( $S_1L_2$ ,  $S_1L_3$ ,  $S_1L_N$ ). Komplexe dieser Art entstehen, wenn mehr als nur ein Ligand nötig ist, um mit einem Substrat einen Komplex einzugehen. Es liegt ein exponentieller Zusammenhang zwischen  $S_t$  und  $L_t$  vor.

Die Gründe für die Entstehung einer Lösungsisotherme vom Typ  $A_N$  (negativer Verlauf) sind noch nicht geklärt. Diskutiert werden Selbstassoziate des Komplexbildners  $L_t$ .

Besitzt ein Komplex eine schlechtere Löslichkeit oder steigt seine Löslichkeit zuerst an, fällt dann aber nach Erreichen seiner Löslichkeitsgrenze wieder aus, liegen Lösungsisothermen vom Typ  $B_I$  bzw. Typ  $B_S$  vor.

Bei einer Lösungsisotherme vom Typ  $B_S$  steigt die Löslichkeit des Wirkstoffes/Substrates soweit an, bis die Sättigungslöslichkeit des entstandenen Cyclodextrinkomplexes überschritten wird (Punkt 1). In der sogenannten Plateauphase, d.h. zwischen den Punkten 1 und 2 liegt ein Fließgleichgewicht vor zwischen neu entstandenem Komplex durch Zugabe von Komplexbildner und Ausfällung des Komplexes, da die Sättigungslöslichkeit überschritten wurde. Am Punkt 2 ist das ungelöste Substrat quantitativ in den Komplex überführt worden. Bei weiterer Zugabe des Komplexbildners kommt es zu einer Abnahme der Substratkonzentration. Diese endet erst, wenn die Sättigungslöslichkeit des Komplexes  $S_E$  erreicht ist.

Die Kurve  $B_I$  entspricht der Kurve  $B_S$  mit dem einzigen Unterschied, dass der entstandene Komplex eine schlechtere Sättigungslöslichkeit besitzt als der Wirkstoff/Gast.

Um die geforderte Löslichkeitsverbesserung des Substrates zu erreichen, ist es unbedingt erforderlich, Cyclodextrinderivate auszuwählen, die mit dem entsprechenden Substrat eine Lösungsisotherme vom Typ A bilden bzw. deren Komplex-Sättigungslöslichkeit bei der Lösungsisotherme vom Typ B<sub>S</sub> in der geforderten Einsatzkonzentration den Punkt 1 nicht überschreitet.

Die Bestimmung der Komplexbildungskonstante bei einem molaren Komplexe-rungsverhältnis von 1:1 (Substrat/Cyclodextrin) erfolgte aus der erhaltenen Lösungsisotherme nach Gleichung 2.8 mit:

$$K_{1:1} = \frac{[S - L]}{[S] [L]} \quad \text{Gl.2.9}$$

Die Gesamtkonzentration an Wirkstoff [S<sub>t</sub>] in Lösung ist:

$$[S_t] = [S_0] + [S - L] \quad \text{Gl.2.10}$$

Entsprechen beträgt die enthaltene Gesamtkonzentration an Cyclodextrin [L<sub>t</sub>]:

$$[L_t] = [L] + [S - L] \quad \text{Gl.2.11}$$

Unter der Annahme, dass [S<sub>0</sub>] = [S] entspricht, ergibt sich für [S<sub>t</sub>] aus den Gleichungen 2.9.-2.11:

$$[S_t] = [S_0] + \frac{K_{1:1} [S_0]}{1 + K_{1:1} [S_0]} [L_t] \quad \text{Gl.2.12}$$

Da zwischen [S<sub>t</sub>] und [L<sub>t</sub>] bei einem 1:1 Komplex ein linearer Zusammenhang besteht, gilt für die Steigung der Lösungsisotherme:

$$\tan \alpha = \frac{K_{1:1} [S_0]}{1 + K_{1:1} [S_0]} \quad \text{Gl.2.13}$$

Durch Umstellung der Gleichung 2.13. nach  $K_{1:1}$  kann die Stabilitätskonstante ermittelt werden:

$$K_{1:1} = \frac{\tan \alpha}{[S_0] (1 - \tan \alpha)} \quad \text{Gl.2.14}$$

Die Berechnungen der Komplexbildungskonstante setzt voraus, dass es sich um einen 1:1 Komplex handelt. Besteht ein anderes Komplexierungsverhältnis, so sind spezielle Näherungsverfahrensberechnungen anzustellen.

### 2.15.2 Herstellung der Konzentrationsreihe zur Berechnung von $K_{m:n}$

Zur Bestimmung der Komplexbildungskonstanten werden wässrige Stammlösungen der Cyclodextrinderivate mit einer Cyclodextrinkonzentration von jeweils 5 % hergestellt. Die Stammlösungen werden mit  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$  Puffer auf pH 5 eingestellt. Ca. 1,20-1,24 g Terminalia sericea Extrakt werden in 30 ml Schott-Reagenzgläser mit Schraubverschluss eingewogen. Diese werden auf insgesamt 15 ml, bestehend aus entsprechenden Mengen an Stammlösung und vollentsalztem Wasser, aufgefüllt, so dass pro eingesetztem Cyclodextrinderivat eine Konzentrationsreihe von 0 % (Standard), 1,0 %, 1,5 %, 2,0 %, 2,5 %, 3,0 %, 4,0 % und 5,0 % Cyclodextringehalt erhalten wird. Eine 5 %ige Konzentration entspricht 0,75 g Cyclodextrin in 15 ml Lösungsmittel. Bei 1,2 g Einwaage Terminalia sericea Extrakt ist somit sichergestellt, dass eine optimale Komplexierung von Cyclodextrin mit Sericosid stattfinden kann.

Die Proben werden verschlossen und 24 Stunden bei +25 °C in waagerechter Lage auf einem Schwenktisch equilibriert. Danach werden ca. 10 ml aus den Probengefäßen entnommen und 5 min bei 45000 upm zentrifugiert.

Der zuvor durch einen 0,25 µl Filter gegebene Rückstand wird anschließend mittels LC/MS nach Frauen et al. [54] vermessen. Bei der Probenvorbereitung zur Bestimmung der Komplexbildungskonstante von Sericosid mit  $\gamma$ -Cyclodextrin in Abhängigkeit vom pH Wert der Equilibrierlösung wird analog verfahren. Es werden aber keine Konzentrationsreihen an Cyclodextrinen erstellt, sondern die 5 %ige Cyclodextrinlösung mit Eisessig bzw. 25 %iger  $\text{NH}_3$  Lösung wird auf pH 3, 5, 7 und 9 eingestellt.

## 2.16 Röntgendiffraktometrie (XRD)

Das Prinzip der Röntgendiffraktometrie beruht auf dem Braggschen Gesetz [8,27,56] und ist definiert über:

$$n\lambda = 2d_R \sin\theta \quad \text{Gl.2.14}$$

- $n\lambda$ :   Ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge Lambda  
          (Strecke AB zu BC im Kristallgitter)
- $d_R$ :    Abstand der Kristallgitterebenen von einander
- $\theta$ :     Braggscher Winkel

Es handelt sich um ein Verfahren zur Ermittlung der dreidimensionalen Anordnung von Atomen in Kristallen (Strecken AB zu BC, s.o.) mit Hilfe von Strahlen, deren Wellenlängen etwa den Atomabständen der Kristallgitter entsprechen. Röntgenstrahlen erfüllen diese Eigenschaften. Durch Beugung und Interferenz der Röntgenstrahlen an den Elektronen der Kristallgitteratome entsteht ein Beugungsmuster, das mit Hilfe von Strahlengeräten ausgewertet wird. Das Beugungsmuster ist für die Kristallanordnung in den Molekülen spezifisch. Das Chromatogramm erlaubt somit eine eindeutige Identifizierung des Stoffes, sofern ein Vergleich mit einem Standard möglich ist. Bei der Messung werden die Probenpulver zwischen zwei Polyethylenterephthalat- (PETP) Folien gefüllt. Die Transmission wird mit einem Germanium-Monochromator im senkrecht rotierenden Probenhalter mit Kupfer  $\alpha_1$  Strahlung gemessen (siehe Kapitel 6.5.11).



## 2.17 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Bei der DSC wird die Differenz eines Wärmestromes (Energiedifferenz) zu einer Probe und einer Referenzsubstanz (von gleicher Temperatur) bei programmierter sich verändernder Temperatur gemessen [27,47]. Durch Integration über die Zeit erhält man die Enthalpieänderung der Probe. Kristalline Wirkstoffe besitzen nach der Komplexierung mit amorphen Cyclodextrinen keinen Schmelzpunkt mehr, da der entstandene Komplex amorph ist. Ist dennoch eine Schmelzpunktverschiebung des Wirkstoffes zu beobachten, ist keine vollständige Komplexierung eingetreten. Eine Ausnahme bilden Komplexe kristalliner Wirkstoffe mit kristallinen Cyclodextrinen, z.B.  $\beta$ -oder  $\gamma$ -Cyclodextrin. Hier wird der entstehende Komplex ebenfalls kristallin sein. Eine Komplexierung wird in diesem Fall durch eine Verschiebung des Schmelzpunktes des Wirkstoff/ Cyclodextrinkomplexes angezeigt. Durch Integration der gemessenen Peaks lässt sich der Grad der Komplexierung des Wirkstoffes mit dem Cyclodextrin berechnen. Die pulverförmigen Proben werden gegen die jeweilige physikalische Mischung gemessen, um ein Fehlen oder eine Verschiebung des Schmelzpunktes gegenüber dem reinen Wirkstoff ermitteln zu können. Der Mess-temperaturbereich reicht von  $-50\text{ °C}$  bis  $+300\text{ °C}$ . Die Heizrate beträgt  $10\text{ °C/min}$ . Die bei der Messung verwendeten Geräte werden in Abschnitt 6.5.12 aufgeführt.

## 2.18 Thermogravimetrie (TGA)

Die TGA ist ein Verfahren, bei dem die Massenänderung einer Probe in Abhängigkeit von der Temperatur während eines Temperaturprogramms gemessen wird [36,48]. Die TGA wird als Ergänzung zur DSC (siehe Abschnitt 2.17) bestimmt, um eine Aussage über das Vorkommen flüchtiger Substanzen in der Probe machen zu können. Flüchtige Substanzen machen sich in den DSC-Kurven ebenfalls über eine Enthalpieänderung bemerkbar. Damit ist eine eindeutige Trennung zwischen Verdampfungsverhalten und Schmelzverhalten der Probe nicht möglich. Der Messtemperaturbereich liegt zwischen  $+25\text{ °C}$  und  $+150\text{ °C}$  bei einer Heizrate von  $10\text{ °C/min}$ .

Tritt eine Verdampfung des in den gemessenen Pulverproben vorhandenen Lösungsmittels ein, ist diese über eine Massenänderung der Proben messbar. Die bei der Messung verwendeten Geräte sind in Abschnitt 6.5.13 angegeben.

## 2.19 Nuclear Magnetic Resonance Spektroskopie ( $^{13}\text{C}$ -NMR)

Dieses analytische Verfahren eignet sich besonders zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen [36,49]. Obwohl die Struktur des Sericosids aus dem Terminalia sericea Extrakt bekannt ist, ist es für die Komplexierung von Terminalia sericea Extrakt mit Cyclodextrinen erforderlich, evtl. vorhandene Isomere des Sericosids zu bestimmen. Auf diese Weise wird festgestellt, ob außer Sericosid auch evtl. vorhandene Isomere einen Komplex mit dem Cyclodextrin eingehen könnten und somit in Konkurrenz zum Sericosidkomplex stehen. Die Berechnung der Komplexbildungskonstante Sericosid/Cyclodextrin ist nur möglich, wenn eine Komplexbildung des Cyclodextrins mit anderen Stoffen ausgeschlossen werden kann. Die  $^{13}\text{C}$ -NMR beruht auf der Resonanz-Wechselwirkung zwischen einem hochfrequenten magnetischen Wechselfeld (z.B. Radiowellen) und bestimmten Atomkernen der zu untersuchenden Probe (fest, flüssig), die sich in einem starken, homogenen, äußeren Magnetfeld befindet. Grundlage der Messungen sind die Bewegungen, die Atomkerne mit dem Drehimpuls (Spin) und dem magnetischen Moment ( $\mu$ ) in einem äußeren Magnetfeld mit einer bestimmten Frequenz ( $\omega$ ) ausführen. Die Proben werden in  $d_4$ -Methanol gelöst und vermessen.

## 2.20 Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF)

Bei der MALDI-TOF wird ein gepulster Laser mit einem Flugzeit-Massenspektrometer gekoppelt [85]. Durch den Laser wird ein gepulster Ionenstrahl erzeugt und die Ionenflugzeit zwischen Quelle und Detektor ermittelt. Der Vorteil der Methode liegt in dem sehr schonenden Umgang mit den zu analysierenden Proben. Eine Zerstörung der zu untersuchenden Verbindungen wird kaum beobachtet. Der Detektor arbeitet nach dem SEV-Prinzip (Selektiver Elektronen Vervielfacher). Zur Verbesserung des Peak-Rausch-Verhältnisses wird eine gewisse Zahl von Einzelmessungen (Shots), meist 5-100, durchgeführt. Da die Flugzeit proportional der Wurzel aus der Ionenmasse ist, lässt sich aus der gemessenen Flugzeit die Masse bestimmen. Die pulverförmigen Proben werden wie folgt aufgearbeitet:

Es wird eine 1 %ige Stammlösung mit 96 %igem Ethanol hergestellt. 10 µl dieser Lösung werden mit 45 µl von 4-Hydroxy- $\alpha$ -Zimtsäure Matrix und einer Spatelspitze Na<sup>+</sup>-Anionenaustauscher versetzt. Nach dem Auftüpfeln auf die Probenplatte werden die Spektren vermessen.

Im Ag<sup>+</sup>-Modus werden 10 µl der Stammlösung mit 0,1 %iger methanolischer Ag NO<sub>3</sub> Lösung versetzt. Diese Mischung wird noch einmal zur Löslichkeitsverbesserung mit 35 µl THF verdünnt und auf die Probenplatte getüpfelt. Anschließend werden die Spektren aufgenommen. Gemessen wird im Delayed Extraktion Positive Mode in einem Bereich von 0-4000 Dalton. Die verwendeten Geräte und Chemikalien sind in Abschnitt 6.5.15 aufgelistet.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Detektion der Extraktinhaltsstoffe aus *Camellia sinensis* und *Terminalia sericea* mittels Dünnschichtchromatographie (TLC)

Die Wirkung der einzelnen Pflanzenextrakte wird meist auf eine bestimmte Inhaltsstoffklasse zurückgeführt. Durch die Detektion der Pflanzenextrakte mittels TLC ist es möglich, Extrakte einer Pflanze semiquantitativ auf ihre Wirkstoffgehalte zu überprüfen. Somit wird die Anzahl der Extrakte, die weiterführenden Untersuchungen unterzogen werden, auf ein bis drei pro Pflanze eingegrenzt.

##### 3.1.1 Auswahl des *Camellia sinensis* Extraktes

15 im kosmetischen Markt befindliche wasserlösliche Grüntee-Extrakte verschiedener Hersteller sind auf ihre Catechingehalte untersucht worden. Ziel ist es gewesen, aus den 15 Extrakten unter Einbeziehung vorhandener *in vitro* Daten drei Extrakte mit den höchsten Catechingehalten auszuwählen und weiterzubearbeiten.

1.- Sunflavon	Fa. Taiyo Kagaku Co. Ltd., (US)-Foster City
2.- Sunphenon	Fa. Taiyo Kagaku Co. Ltd.
3.- Green Tea Extrakt	Fa. Tama Biochemicals Co. Ltd.(J)-Tokyo
4.- Actiquench GTP-20	Fa. Active Organics Inc., (US)-Dallas
5.- Optivegetol The Vert P108 Hydro	Fa. Gattefossé, (F)-Saint-Priest
6.- Vegetol The LC 412 Hydro	Fa. Gattefossé
7.- Greenselect	Fa. Indena, (I)-Milano
8.- Bergenol	Fa. Berkem, (F)-Gardonne
9.- Grüntee Extrakt getrocknet	Fa. Plantextrakt, (D)-Vestenbergsgreuth
10.- Grüntee Extrakt	Fa. Dragoco, (D)-Holzminden
11.- Grüntee Extr. Fraktion 1	Fa. Plantextrakt
12.- Grüntee Extr. Fraktion 2	Fa. Plantextrakt
13.- Dermofeel Phenon 100S	Fa. Dr.Straetmans, (D)-Hamburg
14.- Phytexcell Green Tea	Fa. Phytotex, (F)-Chanac
15.- Green Tea Concentrate	Fa. Dragoco

Die Auftrennung der einzelnen Catechinderivate in den Extrakten gestaltet sich wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit als problematisch. Als Laufmittel wird Chloroform/Methanol/Eisessig 3,2:0,8:1,0 verwendet. Die einzelnen Catechinderivate werden mit Anisaldehyd/Schwefelsäure Färbereagens sichtbar gemacht. Die Catechine werden in drei Substanzgruppen mit ähnlichen Rf-Werten eingeteilt, da sich die einzelnen Catechinderivate einer Gruppe nicht eindeutig chromatographisch voneinander trennen lassen.

Tab.3.1:Catechinderivate nach abfallenden Rf-Werten und Gruppenzugehörigkeit

<i>Catechinderivate Standardsubstanzen</i>	<i>Rf-Wert</i>	<i>Gruppe</i>
(+)-Catechin	0,50	3
(-)-Epicatechin	0,47	3
(-)-Epigallocatechin	0,34	2
(-)-Epicatechingallat	0,30	2
(-)-Gallocatechingallat	0,22	1
(-)-Epigallocatechingallat	0,21	1

Die aus Tabelle 3.1 ermittelten Rf-Werte der untersuchten Catechinstandards werden mit den von den Grüntee-Extrakten erhaltenen Chromatogrammen verglichen, um einen Überblick über die qualitative und semiquantitative Zusammensetzung der getesteten Extrakte zu bekommen.

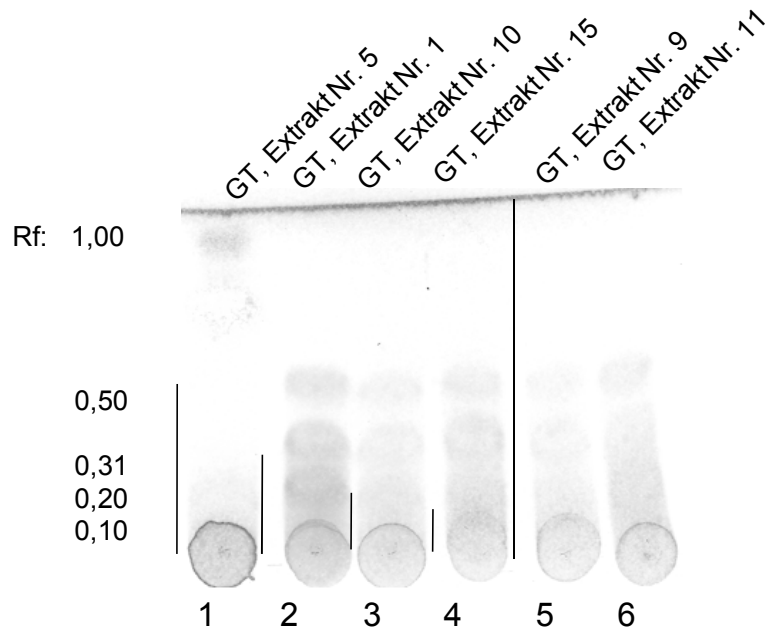


Abb.3.1:TLC-Chromatogramm von wasserlöslichen Grüntee-Extrakten

Bei Muster Nr. 1 handelt es sich um einen glycolischen Extrakt, dessen Stammlösung mit 50  $\mu\text{l/ml}$  Wasser angesetzt worden ist. Bei den Mustern 2-6 handelt es sich um Trockenextrakte, bei denen 1 mg Extrakt auf 1 ml Wasser eingewogen worden ist. Aufgetragen sind jeweils 10  $\mu\text{l}$  der hergestellten Stammlösungen. Das Catechin und das Epicatechin haben einen Rf-Wert von ca. 0,5, das Epigallocatechin und das Epicatechingallat einen Rf von ca. 0,3. Der Rf-Wert von 0,2 setzt sich aus dem Gallocatechingallat und dem Epigallocatechingallat zusammen. Diese erscheinen bei der Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure als rötliche Flecken. Bei Rf= 0,1 ist noch ein grünlicher Fleck zu erkennen. Die Trockenextrakte Nr. 1, Nr. 9, Nr. 11 und Nr.15 heben sich durch eine saubere Auftrennung aufgrund der wenigen enthaltenen Nebenverbindungen von den in Propylenglycol gelösten Extrakten wie Extrakt Nr. 5 (siehe Abbildung 3.1) ab. Daraus kann auf einen hohen Wirkstoffgehalt und eine hohe Reinheit der Extrakte geschlossen werden. Die höchsten Gehalte an Catechinen weisen die Extrakte Nr.1, Nr.11 und Nr.15 auf. Generell zeigten alle untersuchten Trockenextrakte im Durchschnitt einen wesentlich höheren Gehalt an Catechinen als die glycolischen Extrakte. Extrakt Nr. 1 besitzt aber eine dunkelbraune bis rote Farbe, die eine Einarbeitung in eine kosmetische Formulierung aus optischen Gründen nicht zulässt. Die Extrakte Nr.11 und Nr.15 sind nach Informationen der Hersteller auf einen Gesamtcatechingehalt von 30 % standardisiert worden. Extrakt Nr.9 besitzt dagegen einen niedrigeren Gesamtcatechingehalt.

Der Extrakt Nr.15 weist als Besonderheit eine hellere Farbe auf als alle anderen getesteten Extrakte, da die Extraktion nach Informationen der Fa. Dragoco mit Methanol anstatt mit Wasser durchgeführt worden ist. Dadurch eignet er sich sehr gut zur Einarbeitung in eine kosmetische Formulierung. Insgesamt erfüllten nur die Trockenextrakte Nr. 9, Nr. 11 und Nr. 15 die geforderten Bedingungen und sind daher in die weitere Bearbeitung genommen worden.

### 3.1.2 Überprüfung der Lagerstabilität der Catechinderivate aus *Camellia sinensis* Extrakt in wässriger Lösung

Um die Stabilität der Catechine in den drei ausgewählten Extrakten Nr. 9, Nr. 11 und Nr. 15 abschätzen zu können, sind Lagerstabilitätsprüfungen in wässrigem Milieu durchgeführt worden. Die in Abbildung 3.1 angegebenen Rf-Werte 0,50, 0,31 und 0,20 beziehen sich jeweils auf eine der in Abschnitt 3.1.1 genannten Gruppen 1-3.

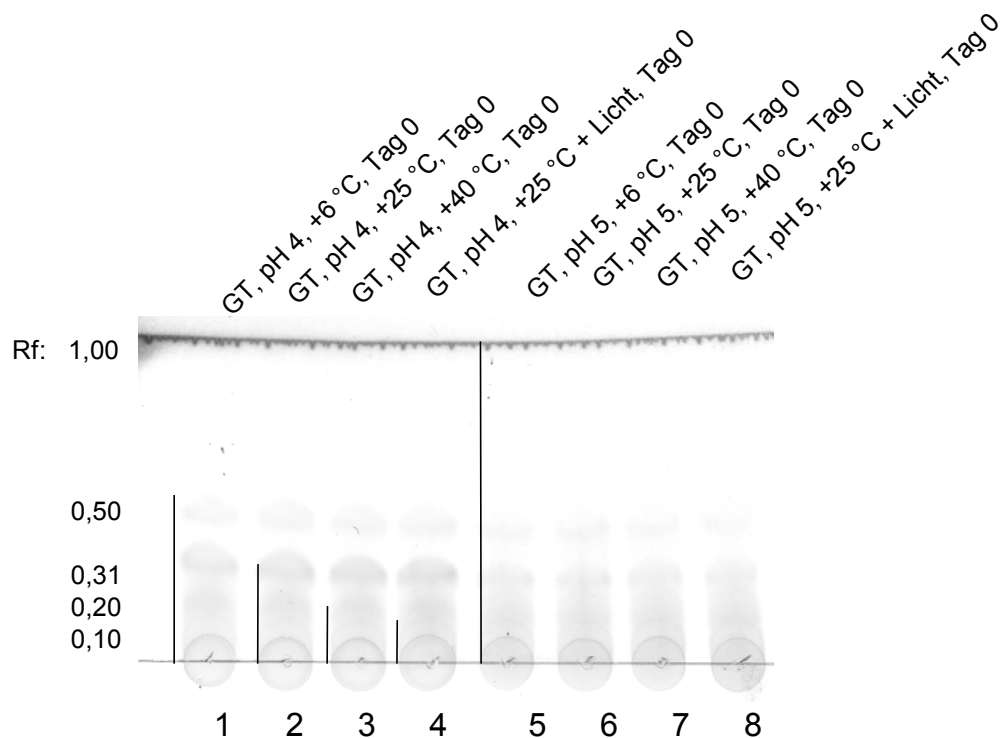


Abb.3.2:TLC-Chromatogramm von Extrakt Nr.15 (Grüner Tee Konzentrat) direkt nach Beginn der Stabilitätsversuche am Tag 0 bei pH 4 und pH 5 und verschiedenen Lagerungstemperaturen

Der pH-Wert des Lösungsmittels (Wasser) beträgt bei den Mustern 1-4 pH 4, die Muster 5-8 sind auf pH 5 eingestellt. Die Muster 1 und 5 sind anschließend bei +6°C

eingelagert worden, Nr. 2 und Nr. 6 bei +25°C. Die Muster 3 und 7 sowie die Muster 4 und 8 sind bei +40°C bzw. als Lichtmuster eingelagert worden.

Kurz nach der Herstellung sind keine sichtbaren Unterschiede zwischen den einzelnen Mustern zu erkennen. Die Chromatogramme der pH-Reihen von pH 6 und pH 7 (Daten hier nicht gezeigt) weisen ebenfalls keine Unterschiede zu den pH Reihen von pH 4 und pH 5 auf. Im Abstand von 2-4 Tagen Lagerung werden die Muster erneut untersucht.

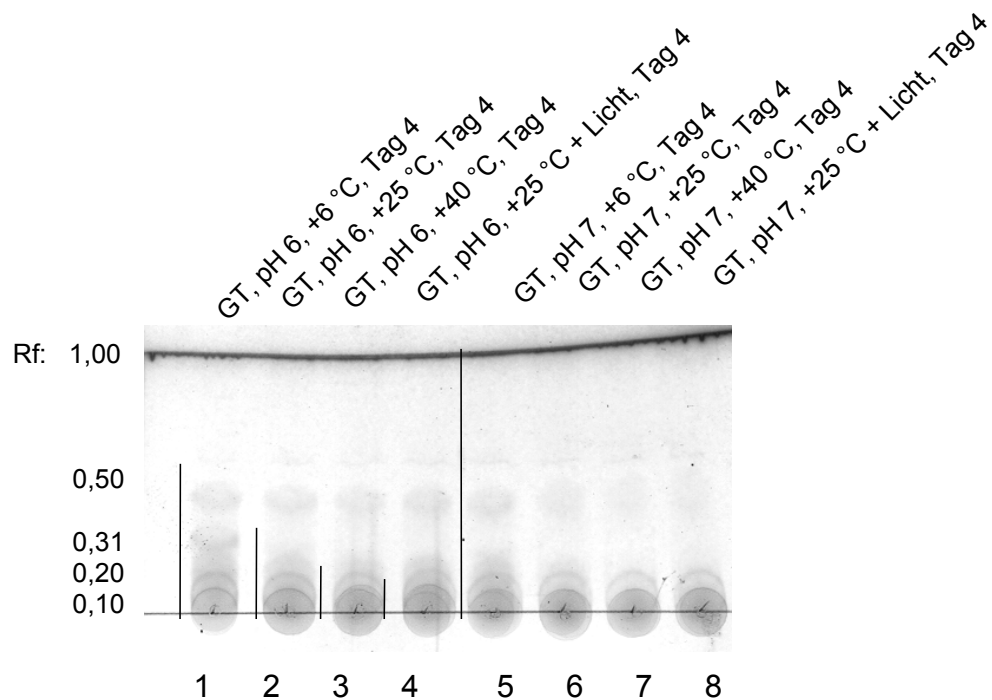


Abb.3.3:TLC-Chromatogramm von Extrakt Nr.15 (Grüner Tee Konzentrat) 4 Tage nach Beginn der Stabilitätsversuche bei pH 6 und pH 7 sowie verschiedenen Lagerungstemperaturen

Die Muster 1-4 besitzen einen pH Wert von pH 6, die Muster 5-8 von pH 7. Die Lagerungsbedingungen der Muster entsprechen der Reihenfolge +6°C, +25°C, +40°C und Lichtmusterlagerung pro pH-Wert Reihe. Die Rf-Werte 0,50, 0,31 und 0,20 beziehen sich jeweils auf eine der in Abschnitt 3.1.1 genannten Gruppen 1-3.

Nur das Muster Nr. 1 (pH 6, +6°C Lagerung) gleicht, wenn auch mit abgeschwächter Intensität, dem Chromatogramm der Muster 1-8 am Tag 0 aus Abbildung 3.2. Bei den Mustern 2-5 ist der rote Fleck bei Rf= 0,31 nicht mehr vorhanden.

Das Muster Nr. 5 (+6 °C Lagerung bei pH 7) entspricht den Chromatogrammen der pH 6 Muster 1-5. Allerdings führt die Lagerung bei pH 7 bei den Mustern 6, 7 und 8 (+40 °C-und Lichtmusterlagerung) zu einem vollständigen Abbau der Catechinderi-



vate. Einzig der grünliche Fleck bei  $R_f = 0,1$  bleibt erhalten. Hier wird es sich aber durch die abweichende Anfärbung (grün statt rot) nicht um ein Catechinderivat handeln. Die Stabilität der Catechine hängt demnach vom pH-Wert ab. Je niedriger der pH-Wert im untersuchten Bereich, desto lagerstabiler verhalten sich die Catechinderivate. Die Catechingruppe 2 (Epigallocatechin/Epicatechingallat) mit einem  $R_f$ -Wert von 0,31 sind von allen untersuchten Catechinderivaten die empfindlichsten. Sie lassen sich schon bei pH 6 und 4 Tagen Lagerung nur bei der  $+6\text{ }^\circ\text{C}$  Lagerung mittels TLC nachweisen. Die Chromatogramme bei pH 4 und pH 5 nach 4 Tagen Lagerung (Daten hier nicht gezeigt) bleiben in leicht abgeschwächter Form vollständig erhalten. Ein vergleichbarer Abbau wie bei pH 6 und pH 7 nach 4 Tagen findet erst nach 12 Tagen Lagerung statt. Bei der Überprüfung auf Oxidationsempfindlichkeit mittels 30 %iger Wasserstoffperoxydlösung (5  $\mu\text{l/ml}$  Lösungsmittel) ist nach einem Tag kein Catechin mehr nachweisbar.

Die Verwendung von Flavanonen bzw. Flavonoiden zur Stabilisierung von Vitamin C als Antioxidans ist in der Patentschrift von Kruse et al. [83] beschrieben. Je nach Redoxpotential der verwendeten Antioxidantien ist auch der umgekehrte Vorgang denkbar. Frauen et al. [54] konnte mittels LC/MS zeigen, dass sich Catechin-Standardsubstanzen für die Aufarbeitung zur Messung mittels LC/MS gut mit Vitamin C stabilisieren lassen.

Aufgrund dieser Hinweise ist eine Versuchsreihe angesetzt worden, deren Muster noch zusätzlich Vitamin C enthielten. Grüntee-Extrakt und Vitamin C sind im Verhältnis 1,0:10,0 miteinander gemischt worden. Die Lagerung erfolgt analog der vorangegangenen Testreihe. Nach 25 Tagen waren die Catechine bei pH 4-7 noch alle detektierbar. Da das Vitamin C durch die Oxidation während der Lagerung die Flecken der TLC-Chromatogramme gelb bis schwarz verfärbte, ist eine eindeutige Zuordnung nicht mehr möglich gewesen. Die Testreihe wurde daraufhin nach 25 Tagen abgebrochen. Die Extrakte Nr. 9 und Nr. 11 sind im Laufe der parallel laufenden *in vitro* Testreihen auf Toxikologie und Wirksamkeit, auf die in der Arbeit nicht näher eingegangen werden soll, ausgeschieden. Bei beiden Extrakten konnte eine Photosensibilisierung der Haut bei längerer kontinuierlicher Anwendung nicht ausgeschlossen werden.

Der Extrakt Nr. 15 ist als einziger Grüntee-Extrakt bis zum Schluss weiterbearbeitet worden.

### 3.1.3 Auswahl des *Terminalia sericea* Extraktes

Bei *Terminalia sericea* sind aufgrund des Marktangebotes nur drei Extrakte untersucht worden:

1.- Sericoside	Fa. Indena, (I)-Milano
2.- Sericoside Phytosome®	Fa. Indena
3.- Cosmelene of Terminalia	Fa. Indena

Wegen der sehr schlechten Wasserlöslichkeit des Hauptinhaltsstoffes Sericosid [36] werden die Muster in einem Ethanol-Wasser-Gemisch (40:60) gelöst. Als Laufmittel ist Butanol/Eisessig/Wasser im Verhältnis 3:1:5 verwendet worden. Die Extraktinhaltsstoffe sind mit Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz angefärbt worden. Bei Extrakt Nr. 1 (Sericoside) wird nur der Inhaltsstoff Sericosid detektiert (siehe Abbildung 3.4. in Abschnitt 3.1.4). Andere Inhaltsstoffe lassen sich nicht nachweisen. Dies bestätigt den von der Fa. Indena angegebenen hohen Gehalt an Sericosid im Extrakt von ca. 86 %. Der Rf-Wert beträgt 0,81. Bei Extrakt Nr. 2 (Sericoside Phytosome®) ist der Wirkstoff Sericosid mittels chemischer Bindung an das polare Ende einer Phospholipidmembran gebunden [19,20]. Die Penetration des Sericosid/Phospholipidkomplexes soll nach Bombardelli et al. [19] erhöht sein, ohne die Funktion der epidermalen Hautbarriere zu beeinflussen. Da es sich aber bei dem Sericosid/Phospholipidkomplex um eine neue Verbindung handelt, lässt sich der Extrakt 2 mittels TLC nicht gegen die Extrakte 1 und 3 detektieren. Weiterhin ist eine Interaktion der Phytosomen® mit den Emulgatoren der Cremegrundlage nicht auszuschließen. Deshalb ist der Extrakt nicht weiterbearbeitet worden. Bei Extrakt Nr. 3 konnte bei Rf 0,95 eine dunkelblaue Zone detektiert werden, die auf das Extraktlösungsmittel Propylenglycol zurückzuführen ist. Es konnte aber kein Sericosid gefunden werden (Chromatogramme der Extrakte Nr. 2 und Nr. 3 nicht gezeigt), weshalb der Extrakt ebenfalls nicht weiter verfolgt worden ist. Von den anfänglich ausgewählten Extrakten ist daher nur Extrakt Nr. 1 weiterbearbeitet worden.

### 3.1.4 Überprüfung der Lagerstabilität von Sericosid aus *Terminalia sericea* Extrakt in wässrig/ethanolischer Lösung

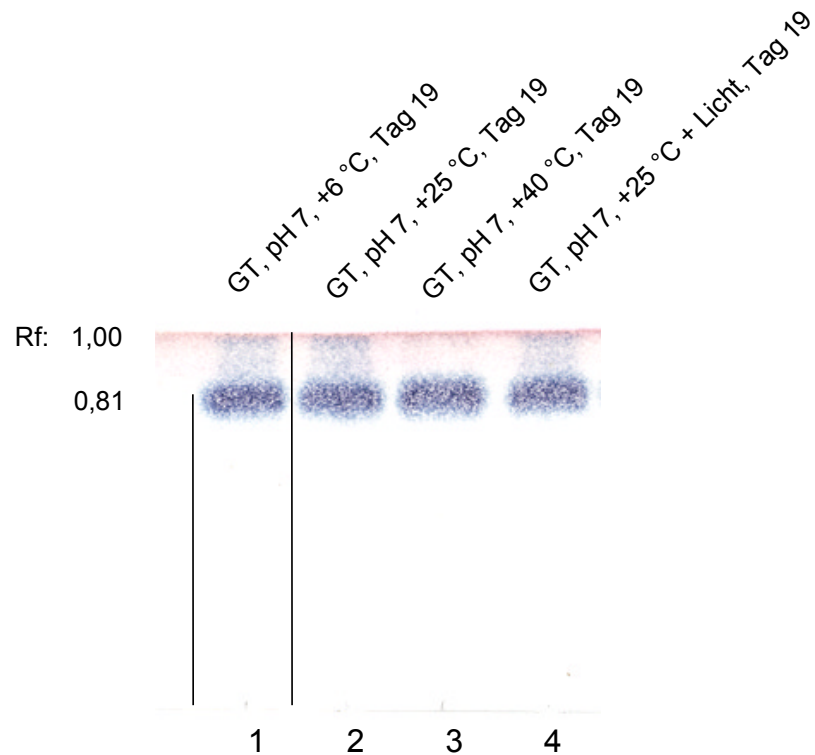


Abb.3.4:Extrakt Nr.1 (Sericoside) 19 Tage nach Herstellung der Muster bei pH 7 und verschiedenen Lagerungsarten

Als Lösungsmittel ist ein Ethanol/Wasser Gemisch (40:60) verwendet worden. Der Rf-Wert des Sericosids liegt bei 0,81. Die Muster sind analog der Testungen bei *Camellia sinensis* über den pH-Bereich von 4-7 mit den jeweiligen Lagerungsarten +6 °C, +25 °C, +40 °C und Lichtmuster (entsprechend Muster 1-4) eingelagert worden. Nach 19 Tagen sind keine über TLC detektierbaren Zersetzungsreaktionen in dem getesteten pH-Wert Bereich sowie bei den unterschiedlichen Lagerungsarten +6 °C, +25 °C, +40 °C und dem Lichtmuster erkennbar. Bei den mit 30 %iger Wasserstoffperoxydlösung (5µl/ml Lösungsmittel) versetzten und über 19 Tage bei +25 °C gelagerten Muster konnten keine Abbauprodukte festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse aus den Lagerstabilitätsversuchen (siehe Abbildung 3.4) zeigen, dass die chemische Stabilität des Sericosids in Emulsionen als unproblematisch anzusehen ist.

## 3.2 UV- Spektren

Um eine evtl. auftretende Lichtinstabilität der Wirkstoffe in den Extrakten erkennen zu können, sind die Pflanzenextrakte, die nach den TLC-Untersuchungen als weiterverarbeitungswürdig ermittelt worden waren, qualitativ auf ihre UV-Absorption hin untersucht worden. Sowohl die *Camellia sinensis* Extrakte als auch der *Terminalia sericea* Extrakt besitzen eine Eigenfärbung, die eine Absorption im sichtbaren Bereich anzeigt.

### 3.2.1 UV-Spektrum von *Camellia sinensis*

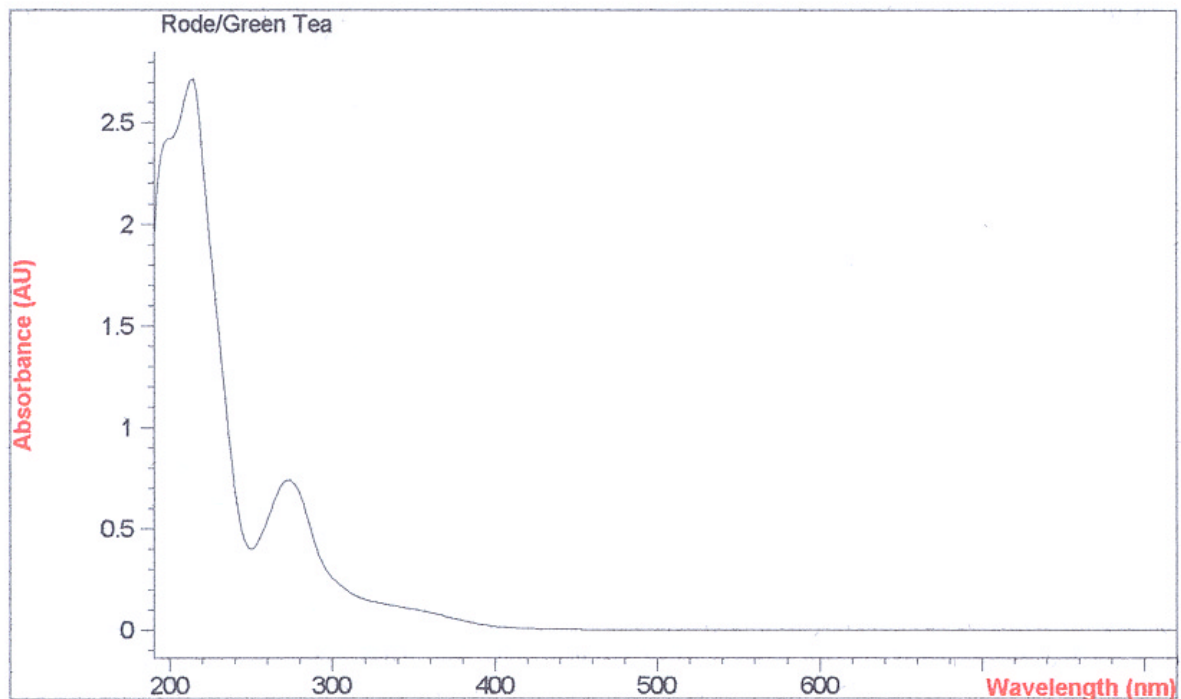


Abb.3.5:UV-Spektrum von Extrakt Nr. 15 (Grüner Tee Konzentrat) in demineralisiertem Wasser

Nach dem UV-Spektrum in Abbildung 3.5 liegt ein Absorptionsmaximum bei 220 nm und bei 280 nm vor. Die Messung der Absorption des in Wasser gelösten Extraktes erfolgte gegen demineralisiertes Wasser. Eine Absorption bei ca. 220 nm ist typisch für aromatische Verbindungen, zu denen auch die Catechine gehören.

Die Absorption bei 280 nm ist besonders bei den mit Gallussäure veresterten Catechinderivaten wie dem (-)-Epigallocatechingallat, (-)-Epicatechingallat und dem (+)-Gallocatechingallat zu finden.

Ein beschleunigter Abbau der Catechine durch UV-Einstrahlung wäre demnach denkbar. Durch Abfüllung der Analytikmuster in UV- und VIS undurchlässige Packmittel wie z.B. Aluminium-Tuben können durch UV-Strahlung hervorgerufene Instabilitäten während der Lagerung der Muster eliminiert werden. Die beiden ebenfalls weiterbearbeiteten Extrakte Nr. 9 und Nr. 11 zeigen identische Spektren (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.2 UV-Spektrum von *Terminalia sericea*

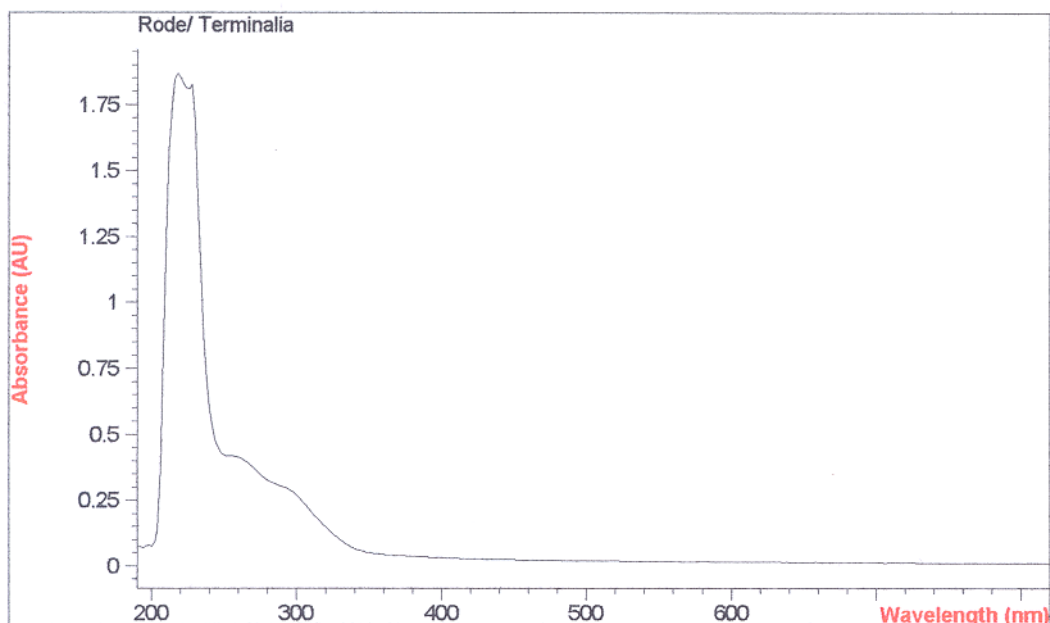


Abb.3.6:UV-Spektrum von Extrakt Nr.1 (Sericoside) in einem Ethanol/Wasser Gemisch von 40:60

Der Absorptionsbereich des Extraktes Nr. 1 aus Abbildung 3.6 liegt zwischen 200 nm und 380 nm. Die Absorption des Extraktes ist gegen das reine Lösungsmittel Ethanol/Wasser 40:60 gemessen worden. Die für aromatische Systeme typische Absorptionsbande bei ca. 220 nm ist gut sichtbar. Von 300 nm bis 350 nm ist ebenfalls eine leichte UV-Absorption feststellbar. Photochemische Zersetzungsreaktionen im Laufe der Lagerung im Glas können bei *Terminalia sericea* Extrakt Nr. 1 nicht ausgeschlossen werden, da durch das Eindringen von UV-Strahlung in das verwendete Glasgefäß ein Abbau herbeigeführt bzw. beschleunigt werden kann.

Durch die Abfüllung der Analytikmuster in UV undurchlässige Packmittel kann-wie beim *Camellia sinensis* Extrakt in Abschnitt 3.2.1-eine auftretende Instabilität während der Lagerung vermieden werden.

### **3.3 Messung der Lagerstabilitäten der unstabilierten Camellia sinensis Extrakte mittels LC/MS**

Die Lagerstabilitäten der Catechinderivate aus *Camellia sinensis* Extrakt sind über 6 Monate nach den Standardmethoden aus Abschnitt 2.8 aus O/W und W/O Formulierungen (siehe Abschnitt 6.3.1 und 6.3.2) gemessen worden. Somit ist es möglich, auftretende Lagerstabilitätsprobleme der Catechine in den Formulierungen rechtzeitig zu erkennen und durch stabilitätsverbessernde Maßnahmen zu beheben. Die Extrakt-Einsatzkonzentration in den Formulierungen beträgt jeweils 0,1 %. Die Gehalte der einzelnen Catechine sind bei +6 °C, +25 °C, +40 °C und +25 °C + Licht nach 0, 1, 3 und 6 Monaten gemessen worden. Aufgrund der in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen pH-Abhängigkeit der Stabilität der Catechine in wässrigen Lösungen sind die pH-Werte der Testformulierungen auf pH 5 eingestellt worden.

#### **3.3.1 Validierungsparameter**

Um eine Dreifachmessung aller anstehenden Proben und ein damit verbundenes sehr hohes Probenaufkommen zu umgehen, erfolgt die Auswertung der Daten nach einer zuvor erarbeiteten Methodvalidierung von Frauen et al. [54]. Die Validierungsparameter aus Tabelle 3.2 sind dieser Arbeit entnommen worden.

Tab.3.2:Validierungsparameter zur Gehaltsbestimmung der Catechinderivate nach [54]

<i>Substanz</i>	<i>NWG (ng/ml)</i>	<i>BSG (ng/ml)</i>	<i>WFR (%)</i>	<i>S<sub>rel</sub> (%)</i>
Catechin	5	15	105	1,25
Epicatechin	5	15	98	1,13
Epigallocatechin	10	30	105	1,72
Epigallocatechingallat	15	45	103	2,65
Epicatechingallat	10	30	102	2,22

NWG: Nachweisgrenze (S:N = 3:1)

BSG: Bestimmungsgrenze (S:N = 10:1)

WFR: Wiederfindungsrate (n = 6)

S<sub>rel</sub>: Relative Standardabweichung (n = 6)

S:N: Peak-Rausch Verhältnis

Die Lagerstabilitäten der Catechine sind sowohl in einer O/W als auch in einer W/O Formulierung gemessen worden (Poolrezepturen in Abschnitt 6.3.1 und 6.3.2). Zur besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sind bei allen später hergestellten Ansätzen die gleichen Formulierungsgrundlagen verwendet worden.

### 3.3.2 Lagerstabilitätsdaten

#### 3.3.2.1 W/O Emulsion

Durch anfängliche Verzögerungen bei den Messungen der Catechingehalte direkt nach der Herstellung konnte nur ein Ein-Monatswert gemessen werden. Da aber die Wiederfindungsraten der Catechinderivate aus der Formulierung (siehe Abschnitt 6.3.1) gegenüber dem reinen Extrakt nach [54] nahe 100 % liegen, ist der theoretische Catechingehalt bei einer Einsatzkonzentration von 0,1 % zur Berechnung als Nullwert zugrunde gelegt worden. Bei den Untersuchungen ist beispielhaft der Extrakt Nr. 11 (Grüntee Fraktion 1) vermessen worden. Der pH-Wert der Wasserphase der W/O Emulsion ist vor der Phasenvereinigung mit der Fett- und Verdickerphase auf pH 5 eingestellt worden.

Tab.3.3:Wiederfindungsraten der 3 und 6 Monatswerte der Catechine bei +25 °C Lagerung in einer W/O Emulsion

<i>Catechine</i>	+25 °C; 3Mo WFR(%)	+25 °C; 6Mo WFR(%)
Catechin (C)	63,0	3,3
Epicatechin (EC)	50,4	0,2
Epicatechingallat (ECG)	65,2	17,1
Epigallocatechingallat (EGCG)	37,7	4,2
Epigallocatechin (EGC)	10,3	n.n.

Während der Lagerung über 6 Monate zeigen die Catechine eine deutliche Instabilität. Während das Catechin, das Epicatechin und das Epicatechingallat nach drei Monaten Lagerung noch alle Wiederfindungsraten über 50% aufweisen, liegen die Wiederfindungsraten bei allen Catechinderivaten nach 6 Monaten unter 18 %. Das Epigallocatechin kann gar nicht mehr nachgewiesen werden. Beim Catechin und beim Epicatechin werden gerade noch 3,3% bzw. 0,2% wiedergefunden. Das Epigallocatechingallat ist nur noch zu 4,2 % enthalten. Nach Schreiner et al. [123] gilt dies als potentielle Wirksubstanz gegen trockene Haut. Daher ist es unumgänglich, für eine Wirksamkeit besonders die Stabilität des Epigallocatechingallats (EGCG) sicherzustellen.

### 3.3.2.2 O/W Emulsion

Analog der W/O Formulierung (Abschnitt 3.3.2.1) konnte nur ein Ein-Monatswert gemessen werden. Als Nullwert ist darum der theoretische Gehalt in der Formulierung angenommen worden, da die Wiederfindungsraten der Extrakte in der Emulsion nahe 100 % liegen. Der pH-Wert der Wasserphase der O/W Formulierung (Abschnitt 6.3.2) ist nach der Herstellung der Formulierung auf pH 5 eingestellt worden.



Tab.3.4:Wiederfindungsraten der 3 und 6 Monatsgehalte der Catechine bei +25 °C Lagerung

<i>Catechine</i>	+25 °C; 3Mo WFR(%)	+25 °C; 6Mo WFR(%)
Catechin (C)	100,0	73,7
Epicatechin (EC)	78,9	58,3
Epicatechingallat (ECG)	61,1	38,6
Epigallocatechingallat (EGCG)	44,6	18,6
Epigallocatechin (EGC)	61,8	25,5

Das als potentielle Wirksubstanz geltende Epigallocatechingallat [123] findet sich nach 6 Monaten Lagerung bei +25 °C nur noch zu ca. 19 % wieder. Beim Catechin lassen sich noch 73 % der ursprünglich eingesetzten Konzentration nachweisen. Die Wiederfindungsraten der anderen Catechine liegen alle unter 60 %. Die geringen Wiederfindungsraten machen weiterführende Stabilisierungsmaßnahmen auch hier zwingend erforderlich.

In einem weiteren Ansatz sind zusätzlich 0,2 % Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) sowie 0,05 % Butylhydroxytoluol (BHT) als Komplexbildner und fettlösliches Antioxidans in die O/W Emulsion (siehe Abschnitt 6.3.2) eingearbeitet worden. Der Zusatz von EDTA ist vorteilhaft, da nach Lange et al. [84] EDTA bei einer Formulierung mit Grüntee-Extrakt in der Lage ist, eine während der Lagerung entstehende Braunfärbung der Formulierung zu verzögern. Monomere Polyphenole wie die Catechine polymerisieren in saurem Milieu (pH 2-6) allmählich zu Proanthocyanidinen (Aglykon der Proanthocyane). Diese werden zu Anthocyanidinen umgewandelt, die unter Anwesenheit mehrwertiger positiv geladenen Metallionen farbige Chelate bilden. Durch Zusatz von EDTA wird die Chelatbildung und damit die Braunfärbung der Formulierung hinausgezögert. Da ein Zusatz von EDTA aber die Polymerisation der Catechine zu Proanthocyanidinen nicht verhindern kann, ist eine signifikant verbesserte Lagerstabilität der Catechine nach Zusatz von EDTA nicht gegeben. Die gemessenen Daten bestätigen dies. Die Wiederfindungsraten der mit EDTA und BHT stabilisierten O/W Emulsion sind nur unwesentlich besser als die Daten der unstabilisierten O/W Emulsion. Die Wiederfindung von Epigallocatechingallat beträgt nach 6 Monaten Lagerung bei +25 °C noch ca. 28 %. Beim Epicatechin lassen sich noch 66 % der ursprünglich eingesetzten Konzentration nachweisen.

Die Wiederfindungsraten der anderen Verbindungen sind für Catechin 78 %, für Epicatechingallat 62 % sowie 21 % für das Epigallocatechin. Eine Einarbeitung von EDTA in die W/O Formulierung in Abschnitt 3.3.2 ist nicht möglich, da diese Formulierung Magnesiumsulfat enthält und EDTA mit den Magnesiumionen Komplexe eingehen würde.

Obwohl die zusätzlich mit EDTA und BHT stabilisierte O/W Emulsion die Catechine besser zu stabilisieren vermag als die unstabilisierte O/W und W/O Emulsion, ist eine nach der 6. überarbeiteten Kosmetikverordnung geforderte Wirksamkeitsgarantie über 30 Monate damit immer noch nicht gegeben [77]. Besonders das Epigallocatechingallat, welches als potentielle Wirksubstanz von besonderem Interesse ist [6,29,44,80,81,123,114], unterliegt in allen getesteten Emulsionen einem starken Abbau. Das Epigallocatechin (EGC) sowie das Epigallocatechingallat (EGCG) sind ebenfalls sehr instabil, was sich besonders an der hohen Abbaurate beim Vergleich der Stabilitätsdaten der Drei- und Sechs-Monatswerte bemerkbar macht. Als verhältnismäßig lagerstabil lassen sich dagegen das Catechin (C), das Epicatechin (EC) und das Epicatechingallat (ECG) bezeichnen.

### **3.4 Messung der Lagerstabilität des unstabilisierten Terminalia sericea Extraktes mittels LC/MS**

Analog der Vorgehensweise bei *Camellia sinensis* werden auch bei *Terminalia sericea* Extrakt zuerst Stabilitätsdaten von Sericosid in den W/O und O/W Poolrezepturen ohne stabilisierende Zusätze gemessen. Die Extraktkonzentration in den Formulierungen beträgt wegen der hohen Wirkstoffkonzentration und der damit guten Detektierbarkeit über LC/MS nur 0,005 %. Der Gehalt an Sericosid wird bei +6 °C, +25 °C, +40 °C und +25 °C + diffusem Licht nach 0, 1, 3 und 6 Monaten gemessen. Da nach den Daten aus Abschnitt 3.1.4 keine pH-Abhängigkeit der Stabilität oder Löslichkeit von Sericosid in wässrigen Lösungen vorliegt, sind die pH-Werte der Testformulierungen beibehalten worden. Sie liegen sowohl bei der W/O Emulsion als auch bei der O/W Emulsion bei pH 5,5.

### 3.4.1 Validierungsparameter

Die Methode wurde im Zuge der Arbeit von [54] validiert. Die aus dieser Arbeit entnommenen Daten sind in Tabelle 3.5 wiedergegeben:

Tab.3.5:Validierungsparameter von Sericosid aus Extrakt Nr. 1 (Sericoside)

	<i>NWG (ng/ ml)</i>	<i>BSG (ng/ ml)</i>	<i>WFR (%)</i>	<i>S<sub>rel</sub> (%)</i>
Sericosid	0,1	0,5	102,8	4,46

NWG: Nachweisgrenze (S:N = 3:1)

BSG: Bestimmungsgrenze (S:N = 10:1)

WFR: Wiederfindungsrate (n = 6)

S<sub>rel</sub>: Relative Standardabweichung (n = 6)

S:N: Peak- Rausch Verhältnis

Bei den verwendeten Basisformulierungen handelte es sich um die W/O und O/W Emulsionen, deren Inhaltsstoffe nach INCI in Abschnitt 6.3.1 und 6.3.2 angegeben sind.

### 3.4.2 Lagerstabilitätsmessungen

#### 3.4.2.1 W/O Emulsion

Wegen des hohen Wirkstoffgehaltes des pulverförmigen Extraktes Nr. 1 (Sericoside) und der daraus resultierenden sehr guten analytischen Erfassung reicht zur Messung der Lagerstabilität in den Formulierungen eine Extrakt-Einsatzkonzentration von 0,005 % aus.

Tab.3.6:Wiederfindung von Sericosid aus Extrakt Nr. 1 (Sericoside) nach 3 und 6 Monaten bei verschiedenen Lagerungsarten

<i>Lagerart</i> <i>Sericosid</i>	<i>3Mo</i> <i>WFR(%)</i>	<i>6Mo</i> <i>WFR (%)</i>
+6 °C	105,0	101,6
+25 °C	104,4	100,4
+40 °C	98,4	100,3
+25 °C + LICHT	99,5	99,4

Die Wiederfindungsraten liegen nach 6 Monaten im Bereich von 99,4 % bei dem Lichtmuster, bis 101,6 % bei dem +6 °C Muster. Die Wiederfindungsraten nehmen in der Reihenfolge +6 °C, +25 °C, +40 °C sowie +25 °C + LICHT leicht ab. Die Lagerungsart spielt im Bereich von +6 °C bis 40 °C demnach keine Rolle.

### 3.4.2.2 O/W Emulsion

Tab.3.7:Wiederfindung von Sericosid aus Extrakt Nr. 1 (Sericoside) in der O/W Emulsion nach 3 und 6 Monaten bei verschiedenen Lagerungsarten

<i>Lagerart</i> <i>Sericosid</i>	<i>3Mo</i> <i>WFR(%)</i>	<i>6Mo</i> <i>WFR(%)</i>
+6°C	99,2	100,1
+25°C	102,5	96,7
+40°C	94,0	93,7
+25 °C + LICHT	96,4	98,8

Die Wiederfindungsraten von Sericosid in der O/W Emulsion liegen nach 6 Monaten zwischen 100 % bei dem +6 °C Muster und 88,9 % bei dem Lichtmuster. Die Wiederfindungsraten nehmen-wie bei der O/W Emulsion-in der Reihenfolge +6 °C, +25 °C, +40 °C sowie +25 °C + LICHT leicht ab. Die Absorption des Gelbholz-Extrakts im UV-Spektrum bei 200-400 nm könnte ein Grund für die schlechteren Stabilitätsdaten der Lichtmuster sein.

Das polare Sericosid wird in der Wasserphase der O/W Emulsion nicht so gut vor äußerer UV-LICHT Einstrahlung geschützt wie in der W/O Emulsion. Eine Erwärmung des Lichtmusters durch starke Sonneneinstrahlung könnte ebenfalls eine Ursache für die Gehaltsabnahme von Sericosid sein. Der Einfluss der Temperatur wird eine Rolle spielen, da der Gehalt an Sericosid mit steigender Lagertemperatur der Analytikmuster leicht abnimmt. Eine Beeinflussung durch Rohstoffe wie z.B. Emulgatoren wäre ebenfalls denkbar. Insgesamt ist die Lagerstabilität des Sericosids aus Terminalia sericea Extrakt aber als stabil zu bezeichnen.

Während die Lagerstabilität als unproblematisch zu bezeichnen ist, bereitet die schlechte Löslichkeit des Extraktes in Wasser Probleme. Ab 0,06 % löst sich der Extrakt nicht mehr ohne Alkoholzusatz in den Emulsionen. Nach diversen Stresstests wie z.B. Schaukeltest +40 °C oder -10 °C Lagerung (siehe Abschnitt 2.8) tritt Rekristallisation ein. Da ungelöste Wirkstoffe in *in vitro* und *in vivo* Teststudien durch eine fehlende Penetration in die Haut keine Wirksamkeit erwarten lassen, ergeben sich folgende Problem- und Zielvorstellungen:

1. Die Löslichkeit des Extraktes bzw. Sericosids muss erhöht werden.
2. Durch die höhere Löslichkeit ist auch eine höhere Einsatzkonzentration (> 0,06 %) möglich und damit eine Verbesserung der Wirksamkeit gegeben.

### **3.5 Stabilitätsverbessernde Maßnahmen bei Camellia sinensis**

Wie im Abschnitt 3.1.1.2 festgestellt, hat sich Vitamin C als wirksames Antioxidans in Bezug auf die Stabilisierung in wässrigen Lösungen erwiesen. Ein Zusatz von Vitamin C zu einer Grüntee-Extrakt-haltigen Formulierung sowie anderer Antioxidantien müsste einer verbesserten Stabilität führen.

Im nächsten Schritt soll durch stabilitätsverbessernde Zusätze wie Chelatbildner und Antioxidantien versucht werden, einen Abbau der Catechine hinauszuzögern. Ziel ist es, den Einfluss der einzelnen Komplexbildner und Antioxidantien in Bezug auf die Stabilisierung der Catechinderivate zu prüfen. Da bei den in Abschnitt 3.1.2 diskutierten Vorversuchen durch Zusatz von Vitamin C die Lagerstabilität der Catechinderivate deutlich erhöht werden konnte, sind Formulierungsansätze mit Vitamin C in Konzentrationsbereichen von 0,2-0,6 % hergestellt und untersucht worden.

Weiterhin sollen neben Vitamin C als wasserlösliches Antioxidans auch fettlösliche Antioxidantien wie Butylhydroxytoluol (BHT) und Propylgallat (PG) auf ihr Stabilisierungspotential hin untersucht werden, da sich ein geringer Teil der Catechine auch in der lipophilen Fettphase aufhalten wird. Auf diese Weise könnte die Stabilität der Catechine noch einmal erhöht werden. Als Alternative zu Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) sind Ansätze mit Chitosanderivaten hergestellt und untersucht worden.

### 3.5.1 Vorversuche zur Erhöhung der Lagerstabilität der Catechinderivate durch Zusatz von Vitamin C

#### 3.5.1.1 W/O Emulsion

Die im Abschnitt 3.3.2 und diskutierten schlechten Stabilitätsdaten der Catechinderivate in kosmetischen Formulierungen machen weitere stabilitätsverbessernde Maßnahmen unumgänglich. Nach dem Zusatz von 0,2 % Vitamin C zu den Formulierungen mit 0,1 % Grüntee-Extrakt verbessert sich die Lagerstabilität der Catechinderivate, insbesondere auch des Epigallocatechingallats, signifikant.

Tab.3.8:Wiederfindungsraten der Catechine von Extrakt Nr. 9 (Grüntee-Extrakt getrocknet) in einer W/O Emulsion nach 6 monatiger Lagerung ohne und mit 0,2 % Vitamin C Zusatz bei +25 °C und +40 °C

Catechine (6Mon)	C (+25 °C)	EC (+25 °C)	EGC (+25 °C)	EGCG (+25 °C)	ECG (+25 °C)	C (+40 °C)	EC (+40 °C)	EGC (+40 °C)	EGCG (+40 °C)	ECG (+40 °C)
ohne Vitamin C	3,3	0,2	n.n.	4,2	17,1	n.n.	n.	n.n.	n.	0,8
0,2% Vitamin C	58,1	49,9	47,5	54,4	63,2	46,6	28,4	26,5	32,4	40,9

Die +25 °C Muster mit 0,2 % Vitamin C zeigen wesentlich bessere Stabilitätsdaten als die Muster ohne Vitamin C Zusatz, die aber noch nicht zufriedenstellend sind. Bei den +40 °C Mustern ergeben sich wie bei den Lichtmustern nicht akzeptable Wiederfindungsraten um 30 %.

Die Wiederfindungsraten bei den +6 °C Mustern liegen alle bei ca. 80 %. Nach der gesetzlich geforderten Wirksamkeit nach 30 monatiger Lagerung wären-außer bei den +6 °C Mustern-keine ausreichenden Wirkstoffkonzentrationen mehr vorhanden. Die O/W Emulsion mit 0,2 % Vitamin C und 0,1 % Grüntee-Extrakt, deren Daten hier nicht gezeigt sind, liefert ähnliche Wiederfindungsraten. Eine Erhöhung der Extrakt-Einsatzkonzentration würde bei einer so großen Abbaurate keine Alternative bieten, da die Farbstabilität der untersuchten Muster noch Probleme bereitet. Obwohl die Formulierungen in Tuben gelagert worden sind, sind beim Ausdrücken der Tuben zur Probenentnahme immer wieder braune Zonen in den Emulsionen zu finden. Diese sind auf ein durch oxidative Prozesse bedingtes Entstehen unwirksamer brauner Chelate von mehrwertigen Metallionen und Anthocyanidinen (siehe Abschnitt 3.3.2) zurückzuführen. Der in der eingearbeiteten Luft enthaltene Sauerstoff mit seinen oxidierenden Eigenschaften ist demnach mitverantwortlich für die Lagerinstabilität der Catechine. Zur Erhöhung der Stabilität sind alle weiteren hergestellten Ansätze mit Grüntee-Extrakt unter Luftausschluss hergestellt und luftdicht abgefüllt worden. Da dies mit den herkömmlichen Laborgeräten nicht mehr möglich ist, sind die Ansätze alle auf einem Ankerrührermischer mit Zahnkranzhomogenisator (Fa.Berents, Ansatzgrößen: 2-4 kg) hergestellt worden.

### **3.5.2 Einfluss von 0,2 %-0,6 % Vitamin C bei Herstellung und Lagerung unter Luftausschluss auf die Lagerstabilität der Catechine**

#### 3.5.2.1 W/O Emulsion

Nachdem in Abschnitt 3.5.1 die Lagerstabilität der Catechine mit Vitamin C signifikant verbessert werden konnte, sollte als nächster Schritt der Einfluss der Vitamin C Konzentration auf die bei Lagerstabilität der Catechinderivate bei gleichbleibender Grüntee-Einsatzkonzentration untersucht werden. Die Herstellung und Verpackung der Ansätze erfolgte diesmal unter Luftausschluss, um eine durch Sauerstoff hervorgerufene Oxidation der Catechine während der Lagerung zu vermeiden. Es sind vier Ansätze einer W/O Formulierung mit 0 %, 0,2 %, 0,4 % und 0,6 % Vitamin C hergestellt worden.

Die Einsatzkonzentration an *Camellia sinensis* Extrakt betrug jeweils 0,1 %. Der pH-Wert der Wasserphase ist auf pH 5 eingestellt worden. Die Messungen sind mit Extrakt Nr. 9 (Grüntee-Extrakt getrocknet) durchgeführt worden.

Tab.3.9:Wiederfindungsraten nach 6 Monaten von Epicatechin (EC) und Epicatechingallat (EGCG) nach Zusatz von 0,2 %, 0,4 % und 0,6 % Vitamin C

<i>Catechine</i>	<i>WFR (%) ohne Vit.C</i>	<i>WFR (%) 0,2 % Vit.C</i>	<i>WFR (%) 0,4 % Vit.C</i>	<i>WFR (%) 0,6 % Vit.C</i>
EC (+25 °C)	n.n.	86,8	84,2	78,8
EC (+40 °C)	n.	41,0	35,2	30,2
EGCG (+25 °C)	n.n.	77,9	78,5	77,6
EGCG (+40 °C)	n.	45,6	38,9	35,1

Die Wiederfindungsraten der einzelnen Catechine erhöht sich durch die luftfreie Herstellung um ca. 30 % gegenüber der Herstellung mit Sauerstoffkontakt und Abfüllung in luftdurchlässige Packmittel. Ein Vitamin C Zusatz über 0,2 % auf 0,1 Grüntee-Extrakt bringt keine signifikante Verbesserung, teilweise sogar schlechtere Wiederfindungsraten. Beim Epigallocatechingallat +40 °C Muster nimmt die Wiederfindungsrate von 45,6 % bei 0,2 % Vitamin C, auf 35,1 % bei 0,6 % Vitamin C ab.

Der Vitamin C Restgehalt ist nach 6 Monaten in der Formulierung bestimmt worden und lieferte folgende Daten:

Bei dem +40 °C Muster mit 0,2 % Vitamin C sind nach 6 Monaten nur noch 0,09 % vorhanden. Bei einer Vitamin C Anfangskonzentration von 0,4 % Vitamin C finden sich noch 0,22 % Vitamin C in der Formulierung wieder, von 0,6 % Vitamin C noch 0,23 % Vitamin C. Die Lichtmuster weisen Gehalte von 0 %, 0,15 % bzw. 0,22 % Vitamin C auf. Der höhere Abbau des Vitamin C in den Lichtmustern beruht darauf, dass die Gläser als Primärpackmittel nicht luftdicht verschlossen werden können. Wegen des geringen Restgehaltes an Vitamin C bei den Ansätzen mit einem Zusatz von 0,2 % Vitamin C ist ein Verhältnis von Grüntee-Extrakt und Vitamin C von 1:4 (entsprechen 0,4 % Vitamin C) zu wählen, um eine ausreichende Stabilisierung der Formulierung garantieren zu können.



### 3.5.2.2 O/W Emulsion

Die Herstellung der O/W Formulierung erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie bei der W/O Formulierung in Abschnitt 3.5.2.1. Aufgrund der leicht erhöhten Lagerstabilität der Catechine und der deutlich besseren Farbstabilität der Emulsion (siehe Abschnitt 3.3.2.2) sind 0,2 % EDTA zugesetzt worden. Der pH-Wert der Wasserphase ist vor der Kalthomogenisation direkt aus der Emulsion gemessen und auf pH 5-5,5 eingestellt worden. Eingearbeitet worden ist Extrakt Nr. 9 (Grüntee-Extrakt getrocknet). Die Einsatzkonzentration beträgt 0,1 %, die Vitamin C Konzentration beträgt entsprechend 0 %, 0,2 %, 0,4 % und 0,6 %.

Tab.3.10:Wiederfindungsraten der +25°C und der +40°C Muster von Epicatechin (EC) und Epigallocatechingallat (EGCG) nach 6 monatiger Lagerung

<i>Catechine</i>	<i>WFR (%) ohne Vit. C</i>	<i>WFR (%) 0,2% Vit. C</i>	<i>WFR (%) 0,4% Vit. C</i>	<i>WFR (%) 0,6% Vit. C</i>
EC (+25 °C)	80,0	86,6	92,8	89,3
EC (+40 °C)	1,1	59,4	73,0	76,0
EGCG (+25 °C)	53,8	80,4	86,4	85,2
EGCG (+40 °C)	n.n.	52,3	64,3	66,9

Die Wiederfindungsraten von Epicatechin und Epigallocatechingallat lassen sich durch Zusatz von Vitamin C in der O/W Formulierung deutlich steigern. Dabei übt die O/W Emulsion einen günstigeren Einfluss auf die Stabilität der Catechine aus als die W/O Emulsion in Abschnitt 3.5.2.1. Bei +25°C Lagerung finden sich bei der O/W Emulsion bei den Mustern ohne Vitamin C Zusatz hohe Wiederfindungsraten beim Epicatechin von ca. 80 % und ca. 54 % beim Epigallocatechingallat. Im Gegensatz dazu sind Epicatechin und Epigallocatechingallat in der W/O Formulierung bei gleicher Lagerungsdauer nicht mehr über LC/MS nachweisbar. Wie bei der W/O Formulierung bringt ein Zusatz von 0,4 % und 0,6 % Vitamin C gegenüber 0,2 % Vitamin C über die Lagerungsdauer von 6 Monaten keine Verbesserung der Lagerstabilität. Bei der Vitamin C Restgehaltsbestimmung ist die wiedergefundene Menge an Vitamin C gegenüber der in der W/O gefundenen Menge leicht erhöht.

Wie bei der W/O Emulsion sollte ein Verhältnis von Grüntee-Extrakt und Vitamin C von 1:4 (entspricht 0,4 % Vitamin C) gewählt werden, um eine ausreichende Stabilisierung der Formulierung garantieren zu können.

### **3.5.3 Einfluss von Propylgallat (PG) und Butylhydroxytoluol (BHT) auf die Lagerstabilität der Catechine**

In Abschnitt 3.5.1 und 3.5.2 konnte gezeigt werden, dass sich durch Zusatz von Vitamin C zu *Camellia sinensis* Extrakt haltigen Formulierungen die Catechine stabilisieren lassen. Als nächstes sollen fettlösliche Antioxidantien wie Butylhydroxytoluol (BHT) und Propylgallat auf ihr Stabilisierungspotential hin untersucht werden, da sich ein geringer Teil der Catechine auch in der lipophilen Fettphase aufhalten wird. Die Lagerstabilität der Catechine könnte damit noch einmal verbessert werden. Ein Zusatz von Propylgallat könnte die Hydrolyse von Epigallocatechingallat zu Epigallocatechin und Gallussäure verhindern und somit zu einer erhöhten Lagerstabilität der Catechine führen. Der Abbau des Epigallocatechingallats in der Formulierung könnte das Entstehen von Epigallocatechin und Gallussäure bewirken. Nach dem gleichen Mechanismus könnte der Abbau des Epicatechingallat ablaufen. Es sind zwei Ansätze der O/W Formulierung (siehe Abschnitt 6.3.2) mit verschiedenen Antioxidantien- und Chelatbildnerkombinationen, 0,1 % *Camellia sinensis* Extrakt und einem pH-Wert von 5 luftfrei hergestellt worden. Ein Ansatz ist mit 0,2 % EDTA, 0,2 % Vitamin C und 0,05 % Propylgallat (PG) versetzt worden, der andere Ansatz mit 0,2 % EDTA und Propylgallat, aber ohne Vitamin C Zusatz. Die Messungen erfolgten mit Extrakt Nr. 9 (Grüntee-Extrakt getrocknet). Die Ergebnisse werden in Tabelle 3.11 mit den Ergebnissen aus der O/W Formulierung aus Abschnitt 3.5.2 mit 0,2 % EDTA und 0,2 % Vitamin C und verglichen.

Tab.3.11:Wiederfindung der +25°C und der +40°C Muster von Epicatechin (EC) und Epigallocatechingallat (EGCG) in einer O/W Formulierung nach 6 monatiger Lagerung

<i>Catechine</i>	<i>WFR (%)</i> <i>0,2% EDTA,</i> <i>0,2% Vitamin C</i>	<i>WFR (%)</i> <i>0,2 % EDTA,</i> <i>0,05 % Propylgallat</i>	<i>WFR (%)</i> <i>0,2 % EDTA,</i> <i>0,05 % Propylgallat,</i> <i>0,2% Vitamin C</i>
EC (+25 °C)	80,8	37,8	72,5
EC (+40 °C)	59,4	n.	28,3
EGCG (+25 °C)	75,3	8,6	81,9
EGCG (+40 °C)	52,3	n.n.	30,3

Die Stabilitätsdaten der Formulierung mit Vitamin C Zusatz entsprechen denen der Formulierung mit Vitamin C und Propylgallat. Propylgallat als eher fettlösliches Antioxidans einzeln eingesetzt ist nicht in der Lage, die Catechine zu stabilisieren, da sich der Großteil der Catechine in der wässrigen Phase der Formulierung aufhält, und nicht wie Propylgallat überwiegend in der Fettphase. Propylgallat wird zudem nur sehr zögerlich in kosmetischen Formulierungen eingesetzt, da einige wenige Fälle von Kontaktdermatitis bekannt geworden sind, bei denen Patienten allergisch auf Propylgallat reagierten [69].

Der alleinige Zusatz von 0,05 % Butylhydroxytoluol (Daten hier nicht gezeigt) liefert ebenfalls schlechtere Daten im Vergleich zu der Formulierung mit 0,2 % EDTA und 0,2 % Vitamin C. Alle erhaltenen Lagerstabilitätsdaten fallen schlechter aus als bei der Formulierung mit EDTA und Vitamin C. Besonders die +40 °C Muster und die Lichtmuster liefern Wiederfindungsraten von unter 40 %. BHT wird als fettlösliches Antioxidans zur Stabilisierung von Fetten und Ölen eingesetzt und ist daher nicht besonders gut zur Stabilisierung von wasserlöslichen Wirkstoffen geeignet. Die Untersuchungen hinsichtlich der Beeinflussung der Lagerstabilitäten sind dennoch durchgeführt worden, da BHT in vielen kosmetischen Rezepturen standardmäßig als fettlösliches Antioxidans eingesetzt wird. Bei BHT bestehen zudem Unverträglichkeiten gegenüber reduzierenden Stoffen wie Eisen oder anderen mehrwertigen positiv geladenen Metallionen [121]. Da Grüntee-Extrakt reich an Mineralstoffen ist [51,67], sind solche Inkompatibilitäten durchaus möglich.

### 3.5.4 Einfluss von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Chitosanderivaten auf die Lagerstabilität der Catechine

Der Einfluss von EDTA und Chitosanderivaten als Chelatbildner auf die Lagerstabilität der Catechine ist ebenfalls überprüft worden. Nach Lange et al. [84] führt ein Zusatz von EDTA zu einer O/W Formulierung mit einem Gehalt an Grüntee-Extrakt zur Verringerung der Entstehung farbiger Chelatkomplexe, die sich aus mehrwertigen Metallionen und Abbauprodukten der Proanthocyanidine darstellen (siehe Abschnitt 3.5.1). Ziel war es, zu prüfen, ob der Zusatz von Chitosanderivaten einen günstigeren Einfluss auf die Stabilität der Catechine und die Farbechtheit der Formulierung nimmt als ein EDTA Zusatz. Zu diesem Zweck sind O/W Emulsionen mit reinem Chitosan sowie mit phosphoryliertem Chitosan (P-Chitosan) hergestellt worden. Anstelle von 0,2 % EDTA sind 0,1 % reines Chitosan, bzw. 0,05 % P-Chitosan in die O/W Emulsion (siehe Abschnitt 6.5.2) eingearbeitet worden. Bei dem eingearbeiteten Extrakt handelt es sich um Extrakt Nr.9 (Grüntee-Extrakt getrocknet). Der pH-Wert der Wasserphase wird vor der Kalthomogenisation im Mischer auf pH 5 eingestellt. Die Konzentration an Vitamin C in den O/W Formulierungen beträgt 0,2 % (siehe Abschnitt 6.3.2).

Tab.3.12:Wiederfindung von Epicatechin (EC) und Epigallocatechingallat (EGCG) nach 6 Monaten Lagerung mit verschiedenen Chelatbildnern in einer O/W Emulsion

<i>Catechine</i>	<i>WFR (%)</i> <i>0,2 % EDTA,</i> <i>0,2 % Vitamin C</i>	<i>WFR (%)</i> <i>Chitosan,</i> <i>0,2 % Vitamin C</i>	<i>WFR (%)</i> <i>P-Chitosan,</i> <i>0,2 % Vitamin C</i>
EC (+25 °C)	80,8	74,5	70,7
EC (+40 °C)	59,4	29,6	52,4
EGCG (+25 °C)	75,3	54,2	56
EGCG (+40 °C)	52,3	15,5	39,6

Die Formulierungen mit Chitosanderivaten liefern schlechtere Lagerstabilitätsdaten als die Formulierung mit EDTA, zeigen also keine Vorteile gegenüber EDTA. Durch die schlechtere Chelatbindungskapazität als EDTA müssen sie zudem in höheren Konzentrationen eingearbeitet werden.

Wie bei einem EDTA Zusatz lässt sich eine Braunfärbung der Emulsion während der Lagerung durch Zusatz von Chitosanderivaten verzögern. Demnach verhindern Chelatbildner wie EDTA und Chitosane in erster Linie nicht die Polymerisation der Catechinmonomere zu Proanthocyanidinen. Sie verzögern allerdings signifikant die Bildung von farbigen Chelatkomplexen, was durch Messungen des Farbwertes der Emulsionen nach 6 Monaten bestätigt werden konnte [84]. Die +40 °C Muster der Chitosanderivate erweisen sich als problematisch, da bei ihnen schon nach wenigen Tagen eine Phasentrennung beobachtet wird, die bei den Ansätzen mit gleichem pH-Wert, aber mit einem Zusatz von EDTA anstatt Chitosan nicht beobachtet wurden. Dabei weist die Formulierung mit P-Chitosan eine schnellere Phasentrennung auf als die Formulierung mit reinem Chitosan. Insgesamt ist der Einsatz von Chitosanderivaten gegenüber EDTA in dieser getesteten Formulierung zur Stabilisierung von Grüntee-Extrakten nicht zu empfehlen.

### **3.5.5 Lagerstabilität der Catechinderivate in einer W/O/W Emulsion**

Ziel sollte sein, einen *Camellia sinensis* Extrakt mit Vitamin C unter Luftausschluss in die innere Wasserphase einer W/O/W Emulsion einzuarbeiten und zu so zu stabilisieren, ohne auf die sensorischen Eigenschaften einer O/W Emulsion verzichten zu müssen. Außerdem hätte dann eine Abfüllung in luftdichte Packmittel entfallen können.

Der Extrakt Nr. 9 (Grüntee-Extrakt getrocknet) ist mit 0,4 % Vitamin C in eine W/O/W Emulsion (siehe Abschnitt 6.3.3) eingearbeitet worden. Die Emulsion wird in zwei Schritten hergestellt, d.h. die innere Wasserphase wird getrennt zur äußeren Wasserphase gerührt. Man stellt zuerst eine W/O Emulsion her und dispergiert diese dann in der äußeren Wasserphase. Es sind vier Ansätze hergestellt worden. Ziel sollte es sein, durch die Verwendung einer W/O/W Emulsion nach Whalley et al. [147] die in die innere Wasserphase eingearbeiteten Catechine durch die umgebende Ölphase luftdicht nach außen zu verschließen und so zu stabilisieren. Die äußere Wasserphase würde trotz des niedrigen pH-Wertes der inneren Wasserphase für einen hautbefeuchteten Effekt sorgen. Weiterhin wäre eine Abfüllung in PETP-Tuben z.B. als Body Lotion dann ohne Probleme möglich.

Die Ansätze Nr. 1 und Nr. 2 sind unter Luftausschluss gerührt worden. Ansatz Nr. 1 ist in Tuben abgefüllt worden, Ansatz Nr. 2 in PETP-Flaschen. Bei Ansatz Nr. 3 und Nr. 4 handelt es sich um nicht unter Luftausschluss hergestellte Ansätze. Nr. 3 ist nach der Herstellung in Tuben abgefüllt worden, Nr. 4 in PETP-Flaschen. Die innere Wasserphase ist auf pH 3 eingestellt worden, die äußere Wasserphase auf pH 5,5. Daraus ergeben sich folgende Vorteile:

1. Die Catechine sind bei niedrigeren pH-Werten stabiler als bei hohen. Da nur ein Teil der Gesamtwasserphase (ca. 50 %) einen niedrigen pH-Wert besitzt, sollte die austrocknende Wirkung eines niedrigen pH-Wertes auf die Haut nicht so drastisch sein wie bei einer Emulsionen mit höherem pH-Wert.
2. Durch regelmäßige Kontrolle des äußeren pH-Wertes ist es möglich, die Stabilität der Emulsion in Bezug auf die Trennung der beiden Wasserphasen zueinander zu überprüfen. Wird der pH-Wert niedriger, so ist davon auszugehen, dass die beiden Wasserphasen in Kontakt zueinander stehen.

Tab.3.13:Wiederfindung von Epicatechin (EC) und Epigallocatechin (EGCG) in der W/O/W Emulsion mit 0,2 % Vitamin C nach 3 monatiger Lagerung bei +25° C und +40 °C

<i>Catechine</i>	<i>WFR (%) luftfrei Tube Nr. 1</i>	<i>WFR (%) luftfrei Flasche Nr. 2</i>	<i>WFR (%) Tube Nr. 3</i>	<i>WFR (%) Flasche Nr. 4</i>
EC (+25 °C)	n.	10	n.	n.n.
EC (+40 °C)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
EGCG (+25 °C)	35,8	5,5	36	10
EGCG (+40 °C)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Die Lagerstabilitäten der Catechine sind bei allen Ansätzen nicht akzeptabel. Das Epigallocatechingallat ist nur bei den +25 °C Mustern in nennenswerten Konzentrationen vorhanden und dort auch nur in der Tubenabfüllung. Die Lagerung im luftdichten Packmittel beeinflusst die Lagerstabilität stärker als das Herstellungsverfahren (luftfreie Herstellung oder Standardherstellung). Alle W/O/W Emulsionsansätze sind zudem galenisch äußerst instabil. Der pH-Wert der äußeren Wasserphase sinkt bei allen Ansätzen schon nach zwei Tagen von pH 5 auf pH 3,5 ab. Die Änderung des pH-Wertes in der äußeren Wasserphase signalisiert, dass beide Wasserphasen entgegen den Herstellerangaben (Fa. ICI) doch miteinander in Kontakt stehen.

Mikroskopische Aufnahmen mit einer Vergrößerung von 1:1250 zeigten ein Zusammenfließen der Fettphase schon einen Tag nach der Herstellung der Formulierung (Bilder nicht gezeigt). Nach 4 Tagen zeigen die Brutschrankmuster erste Phasentrennungen. Die Ein-Monats-Lagerstabilitätsdaten sind bedeutend schlechter als bei der O/W Emulsion mit EDTA und 0,2 % Vitamin C aus Abschnitt 3.5.2.2. Auf die Messung der 6 Monatswerte ist daher verzichtet worden. Die getestete W/O/W Emulsion eignet sich somit in dieser Form nicht zur Überprüfung der Lagerstabilitäten von Catechinen aus *Camellia sinensis* Extrakt.

### 3.6 Verteilungskoeffizient ( $\log P_{OW}$ )

Ziel war es abzuschätzen, ob eine Penetration der Wirkstoffe in die oberen Hautschichten vorausgesetzt werden kann, ohne eine Penetrationsstudie durchführen zu müssen. Wie in Abschnitt 2.11 beschrieben, stellt der  $\log P_{OW}$  ein Maß für die Hydrophilie bzw. Lipophilie einer Substanz dar. Die Bestimmung des  $\log P_{OW}$  einer Substanz ermöglicht eine Abschätzung des Penetrationsverhaltens in dem *in vitro* Penetrations-Assay an exzidierte Schweinehaut (siehe Abschnitt 2.12). Je höher der  $\log P_{OW}$  Wert einer Verbindung liegt, desto lipophiler sind ihre Eigenschaften. Verbindungen mit einem  $\log P_{OW}$  Wert  $< 4$  penetrieren in die Haut. Für Substanzen mit einem  $\log P_{OW}$  Wert  $> 4$  konnte bisher noch keine perkutane Penetration im Schweinehautmodell gemessen werden.

#### 3.6.1 Verteilungskoeffizient ( $\log P_{OW}$ ) von *Camellia sinensis*

Die Verteilungskoeffizienten der einzelnen Catechinderivate sind mittels der ACD/Log P dB Computersoftware erhoben worden (siehe Abschnitt 6.5.6) Nach Eingabe der Strukturformel des zu bestimmenden Moleküls wird der  $\log P_{OW}$  elektronisch berechnet. Im Einzelnen ergeben sich für die Catechinderivate folgende  $\log P_{OW}$  Werte:

Tab.3.14: Verteilungskoeffizienten der Catechinederivate

<i>Catechine</i>	<i>Log P<sub>OW</sub></i>
Catechin (C)	+0,45
Epicatechin (EC)	+0,45
Epicatechingallat (ECG)	+2,63
Epigallocatechin (EGC)	-0,13
Gallocatechingallat (GCG)	+2,04
Epigallocatechingallat (EGCG)	+2,04

Wie aus Tabelle 3.14 ersichtlich, liegen die Verteilungskoeffizienten im Bereich zwischen  $-0,13$  und  $+2,63$ . Die Isomere Catechin und Epicatechin sowie Epigallocatechingallat und Gallocatechingallat weisen mit  $+0,45$  bzw.  $+2,04$  identische Verteilungskoeffizienten auf. Das Epicatechingallat besitzt mit  $2,63$  den höchsten Verteilungskoeffizienten, ist also von allen Catechinenderivaten dasjenige mit den lipophilsten Eigenschaften. Das Epigallocatechin hat mit  $-0,13$  den niedrigsten Verteilungskoeffizienten und ist damit von allen untersuchten Catechinderivaten am hydrophilsten. Da es sich bei den Catechinderivaten um wasserlösliche (hydrophile) Verbindungen handelt, war ein niedriger  $\log P_{OW}$  vorauszusehen. Die  $\log P_{OW}$  Werte der untersuchten Catechine sind alle kleiner 4. Damit sind sie polar genug, um in die oberen Hautschichten der exzidierten Schweinehaut zu penetrieren.

### 3.6.2 Verteilungskoeffizient ( $\log P_{OW}$ ) von Terminalia sericea

Die Messungen sind nach der „OECD Guideline No. 117“ (siehe Abschnitt 6.5.6) durchgeführt worden. Die Detektion erfolgt über einen Refraktions-Index Detektor (RI-Detektor). Als Eluent ist eine 62,5 %ige methanolische Lösung verwendet worden, womit Verteilungskoeffizienten im Bereich von  $\log P_{OW}$  0,3-5 ermittelt werden können. Bei der Untersuchung des Gelbholz-Extraktes sind insgesamt 4 Substanzpeaks detektiert worden. Der  $\log P_{OW}$ -Wert dieser Substanzen wurde zuvor nach der „OECD Guideline 107“ (Ausschütteln in Octanol/Wasser) bestimmt. Zuerst wird der  $\log k'$ -Wert von Standardsubstanzen bestimmt, deren  $\log P_{OW}$  bekannt ist. Dies geschieht über die Messung der Retentionszeit  $t_R$ .



Tab.3.15: Retentionszeiten der Standardsubstanzen zur Bestimmung des  $\log k'$ -Wertes für einen Laufmittel-pH-Wert von 3 bzw. 7,4 (in Klammern angegeben)

Standardsubstanzen	$\log P_{OW}$	$tR$ (min)		$\log k'$
		pH 3	(pH 7,4)	
Benzylalkohol	1,1	02,20	(02,17)	-0,160 (-0,174)
Acetophenon	1,7	02,72	(02,67)	+0,038 (+0,023)
Benzoessäuremethylester	2,1	03,98	(03,88)	+0,314 (+0,298)
Benzoessäureethylester	2,6	05,93	(05,73)	+0,552 (+0,532)
Valerophenon	3,3	09,55	(09,13)	+0,803 (+0,780)
Benzoessäurebutylester	3,6	16,28	(15,47)	+1,062 (+1,037)
Biphenyl-Heptanophenon	4,0	18,37	(17,62)	+1,118 (+1,099)
Bibenzyl-Octanophenon	4,8	39,30	(37,50)	+1,466 (+1,445)

Die berechneten  $\log k'$ -Werte werden gegen  $\log P_{OW}$  aufgetragen. Man erhält eine Kalibriergerade mit  $A=1,472$  und  $B= 2,199$  ( $\log P_{OW}= A + B \times \log k'$ , siehe Abschnitt 2.11. Gleichung 2.4) Zur Bestimmung des  $\log P_{OW}$  von Sericosid wird die Retentionszeit der im Extrakt enthaltenen Verbindungen mittels RI-Detektor bestimmt und der  $\log k'$  berechnet. Der Eluent wurde zuvor mit Eisessig auf den erforderlichen pH-Wert von 3 angesäuert.

Tab.3.16: Retentionszeiten für die im Terminalia sericea Extrakt bei pH 3,0 erhaltenen der Substanzen mit den berechneten  $\log k'$ -Werten

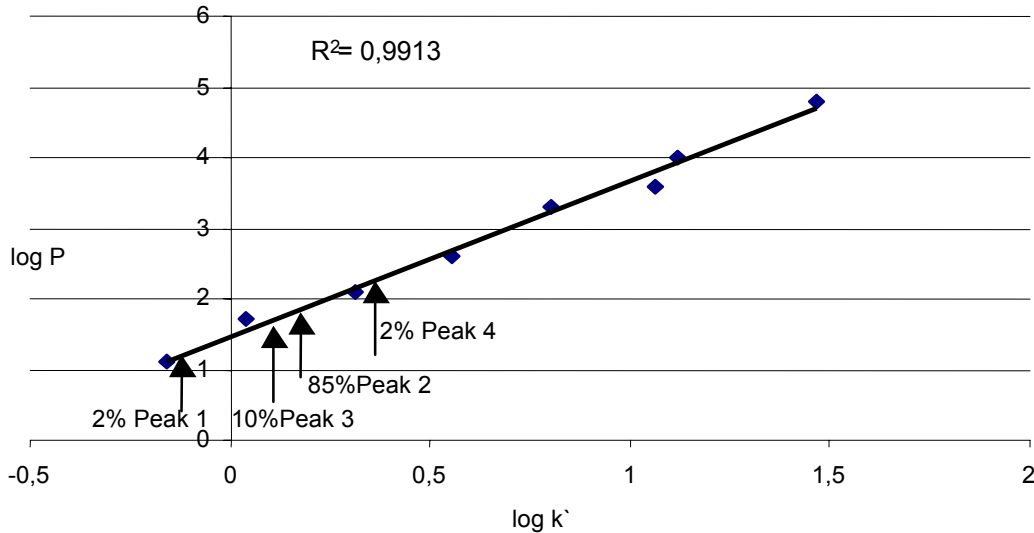
Testsubstanz	$tR$ (min) pH 3	$\log k'$
Peak 1	2,23	-0,145
Peak 2	3,00	+0,117
Peak 3	2,77	+0,053
Peak 4	4,11	+0,335

Nach Auftrag der  $\log k'$ -Werte des Terminalia sericea Extrakts in die Kalibriergerade erhält man folgende  $\log P_{OW}$ -Werte:

Peak 1 (Arjunglucosid):	1,15	Peakfläche: ca. 10%
Peak 2 (Sericosid):	1,73	ca. 85%
Peak 3 (unbekannt)	1,59	ca. 2%
Peak 4 (unbekannt)	2,21	ca. 2%

Nach Bombardelli et al. [18] könnte es sich bei Peak 4 um das Arjunetin (2,3,19 Trihydroxy-12-oleanen-28-säure) handeln. Die Substanz dürfte mit einem  $\log P_{OW}$  von ca. 2,22 auch in die Schweinehaut penetrieren.

Abb.3.7:Kalibriergerade zur Bestimmung des  $\log P_{OW}$  bei einem pH von 3



Die Kalibriergerade in Abbildung 3.7 ist mit Hilfe der Standards aus Tabelle 3.16 erstellt worden. Die Pfeile markieren den  $\log k'$  der Substanzen im Terminalia sericea Extrakt bei pH 3. Nach dem Auftrag ist der  $\log P_{OW}$  direkt abzulesen.

Die gleiche Messung ist bei pH 7,4 durchgeführt worden. Der Eluent wird mit Phosphatpuffer auf den erforderlichen pH-Wert eingestellt. Der errechnete  $\log k'$ , der im Terminalia sericea Extrakt enthaltenen Verbindungen, ist in Tabelle 3.17 dargestellt.

Tab.3.17:Retentionszeiten für die im Terminalia sericea Extrakt bei pH 7,4 erhaltenen der Substanzen mit den berechneten  $\log k'$ -Werten

Testsubstanz	tR (min) pH 7,4	log k'
Peak 1	2,25	-0,136
Peak 2	3,00	+0,117
Peak 3	10,27	+0,839
Peak 4	4,10	+0,333

Bei Eintrag der  $\log k'$ -Werte in die Kalibriergerade mit  $A= 1,511$  und  $B= 2,194$  ergeben sich die Verteilungskoeffizienten mit:

Peak 1 (Arjunglucosid):	1,21
Peak 2 (Sericosid):	1,77
Peak 3 (unbekannt)	3,35
Peak 4 (unbekannt)	2,24

Mit der Laufmittelzusammensetzung (MeOH 62,5 %) werden Verteilungskoeffizienten im Bereich von 0,3-5 ermittelt. Die detektierten Substanzen sind alle bis auf Peak 3 unempfindlich im pH-Bereich von 3,0-7,4. Bei Peak 3 scheint es sich um eine Verbindung mit einer Säurefunktion zu handeln, da die Retentionszeit im neutralen gegenüber dem sauren pH-Wert stark zunimmt. Bei pH 7,4 läge das Molekül dann in der deprotonierten Form vor.

Bei Peak 3 ist wegen des  $\log P_{OW}$  von 2,77 bei pH 3,0 eine Penetration in die Schweinehaut zu erwarten. Bei pH 7,4 allerdings besitzt die Substanz einen  $\log P_{OW}$  von 10,27. Bei diesem pH-Wert dürfte keine Penetration mehr in die Schweinehaut möglich sein, da sie zu unpolar ist, um in die oberen Hautschichten der exzidierten Schweinehaut zu penetrieren. Zur Bestimmung der Verteilungskoeffizienten im Bereich von 2,5–10 (siehe Abschnitt 2.11) werden die Retentionszeiten der Standards und des Extraktes bei einer Laufmittelzusammensetzung von 87,5 % MeOH bei pH 3,0 und pH 7,4 gemessen. Der Extrakt zeigt im  $\log P_{OW}$  Bereich von 2,5-10 keine Änderungen des Refraktions-Index. Dies bedeutet, dass im Terminalia sericea Extrakt keine Substanzen mit einem  $\log P_{OW}$  Wert  $\geq 2,3$  vorhanden sind.

### 3.7 Penetration am Schweinehautmodell

Ziel ist es, die Wirksamkeit der in den Extrakten enthaltenen Substanzen und deren Verträglichkeit zu garantieren. Dazu muss eine Penetration in lebende Hautschichten bis in die Epidermis oder Dermis stattfinden. Die folgenden Penetrationsdaten sind im Rahmen der Arbeit von [54] nach der „OECD Guideline for testing chemicals“ (siehe Abschnitt 2.12 ) erhoben worden. Die Penetrationsmessungen sind mit der O/W Emulsion (siehe Abschnitt 6.3.2) durchgeführt worden.

Die Messung erfolgt bei einmaliger Applikation der Formulierung auf die Schweinehaut gegen ein unbehandeltes Stück Schweinehaut. Die Inkubationszeit beträgt 20 Stunden.

### 3.7.1 *Camellia sinensis*

Zur Penetrationsmessung ist der wasserlösliche Grüntee-Extrakt Nr. 11 (Grüntee Fraktion 1) verwendet worden. Da es sich um einen Trockenextrakt handelt, kann dieser ohne besondere galenische Maßnahmen als wässrige Wirkstoffphase in die O/W Emulsion eingerührt werden. Die Einsatzkonzentration des *Camellia sinensis* Extraktes beträgt 3,0 %. Der anschließend in der Formulierung gemessene Catechingehalt beläuft sich auf 0,88 %, was einem Catechingehalt von ca. 29 % entspricht. Bei dieser Einsatzkonzentration ist eine quantitative Erfassung der einzelnen Catechine in den jeweiligen Hautschichten gewährleistet. Die Formulierung ist 24 Stunden nach der Herstellung und nach Durchführung einer Nullwertbestimmung mittels LC/MS auf die Schweinehaut aufgetragen worden. Wegen des kurzen Intervalls zwischen Herstellung der Emulsion und Auftrag auf die präparierten Schweinehäute ist auf die Einarbeitung stabilisierender Zusätze wie z.B. Vitamin C verzichtet worden. Die Inkubationszeit betrug 20 Stunden bei +32 °C. 4 mit Formulierung behandelte Schweinehäute (Proben 1-4) sind gegen eine unbehandelte Schweinehaut gemessen worden. Die Mittelwerte der Proben 1-4 sind in Tabelle 3.18 aufgelistet. Coffein ist ebenfalls auf sein Penetrationsverhalten hin untersucht worden.

Tab.3.18:Mittelwerte der Wiederfindungsraten aus 4 behandelten Schweinehäuten der Catechine und des Coffeins in den einzelnen Hautschichten

	X (C)	X (EC)	X (ECG)	X (EGCG)	X (EGC)	X (Coffein)
WFR (%)	68,8	69,8	71,8	64,2	46,7	94,2
Verlust (%)	31,2	30,2	28,2	35,8	53,4	6,0
<b>Verteilung Catechine</b>						
Oberfläche (%)	27,9	26,0	25,6	24,6	19,4	28,0
Hornschicht (%)	39,0	41,4	42,9	36,8	25,9	45,4
Epidermis (%)	1,91	2,2	3,4	2,8	1,4	5,3
Dermis (%)	--	0,3	--	--	0,1	11,9
Rezeptorphase (%)	--	--	--	--	--	4,0

Die Wiederfindungsraten der Catechine nach der Inkubation gegenüber dem ermittelten Gehalt in der Emulsion direkt vor der Inkubation sind nur mäßig. Sie liegen zwischen 72 % beim Epicatechingallat (ECG) und 46 % beim Epigallocatechin (EGC). Demnach können nach 20 Stunden Inkubationszeit je nach Catechin 28 % (ECG) bis 54 % (EGC) der ursprünglich eingesetzten Menge nicht mehr nachgewiesen werden (Verlust). Ca. 25 % der Catechine verbleiben wiederum in der Emulsion (Oberfläche) und penetrieren somit nicht in die Schweinehaut. Der überwiegende Anteil der Catechine penetriert in die toten Zellschichten (Hornschicht). 1,5 %-3,5 penetrieren in die Epidermis. Eine Penetration in die Dermis konnte nur beim Epicatechin und beim Epigallocatechin festgestellt werden. Die Catechine penetrieren nicht in die Rezeptorphase. Ein möglicher Grund für die geringen Wiederfindungsraten der Catechine könnte in einer fehlenden Stabilisierung der Emulsion z.B. mit Vitamin C liegen. Während der 20-stündigen Inkubationszeit auf der Schweinehaut ist ein rascher Abbau der Catechine durch Oxidation denkbar.

Das Coffein penetriert zu ca. 4 % von der ursprünglich vorhandenen Menge in die Rezeptorphase und besitzt damit gute Penetrationseigenschaften, die zu einer Limitierung der Einsatzkonzentration von Grüntee-Extrakt führen könnten, da eine systemische Wirkung nicht auszuschließen ist. Bei einer angestrebten Einsatzkonzentration von 0,1-0,3 % Grüntee-Extrakt dürfte dies aber keine Rolle spielen.

Für die Abschätzung einer Wirksamkeit der in die Hautschichten penetrierenden Verbindung ist es unumgänglich, die Verteilung der Substanz auf die jeweiligen Hautschichten zu kennen. Als Beispiel sei hier das Epigallocatechingallat genannt.

Tab.3.19: Verteilung des Epigallocatechingallats (EGCG) auf die einzelnen Hautschichten in den 4 behandelten Schweinehäuten (Proben 1-4) bei +32 °C nach 20 Stunden

<i>EGCG</i>	<i>Probe 1</i>	<i>Probe 2</i>	<i>Probe 3</i>	<i>Probe 4</i>	<i>X</i>	<i>Sx</i>	<i>Srel</i>	<i>V</i>
WFR (%)	57,8	53,8	82,8	62,6	64,2	11,2	17,4	17,5
<b>Verteilung EGCG</b>								
Oberfläche (%)	18,9	21,7	28,5	29,4	24,6	5,1	20,8	8,0
Hornschicht (%)	36,1	30,2	51,1	29,8	36,8	9,9	27,0	15,5
Epidermis (%)	2,7	1,9	3,3	3,3	2,8	0,7	23,3	1,0
Dermis (%)	--	--	--	--				
Rezeptorphase (%)	--	--	--	--				

Die Penetration des EGCG wie auch die der anderen Catechine ist nur mäßig. Die in Abschnitt 3.6.1 ermittelten  $\log P_{OW}$ -Werte lassen eigentlich eine gute Penetration erwarten. Beim Epigallocatechingallat beträgt nach Tabelle 3.19 der nicht penetrierende Anteil 35,8 % (Verlust aus Wiederfindungsrate, siehe auch Tabelle 3.18) zuzüglich 24,6 %, die in der Emulsion zurückbleiben (Oberfläche), insgesamt also 60,4 %. Dementsprechend penetrieren nur 39,6 % in die Haut. 36,8 % der Catechine penetrieren in die Hornschicht und 2,8 % in die Epidermis. In der Dermis und in der Rezeptorphase konnte kein Epigallocatechingallat nachgewiesen werden. Von den gesamten in die Haut penetrierenden Catechinen (Hornschicht und Epidermis) finden sich 92,8 % in der Hornschicht, also in toten Zellschichten wieder. 7,2 % penetrieren in die Epidermis, also in Schichten mit lebenden Zellen, die für eine Wirksamkeit eines Stoffes in der Haut notwendig sind. Die deutlich erhöhten Penetrationswerte der Schweinehaut Nr. 3 (Probe 3) weisen auf eine beschädigte Schweinehaut hin. Die schlechten Penetrationsdaten stützen die Ergebnisse nach [43], bei der die dermale Penetration des Epigallocatechingallats (EGCG) an der Mäusehaut mit Hilfe der „Franz Zelle“ gemessen wurde. Dort betrug die Penetration von Epigallocatechingallat aus einer O/W Formulierung in die einzelnen Hautschichten nur 19 %, bezogen auf die eingesetzte Menge an Catechinen.

### 3.7.2 Terminalia sericea

Der Terminalia sericea Extrakt wurde mit einer Einsatzkonzentration 0,25 % in eine 5 %ige, ethanolhaltige Formulierung eingearbeitet. So konnten wegen der schlechten Wasser- und Öllöslichkeit des im Extrakt enthaltenen Sericosids Kristallbildungen in der Emulsion verhindert werden. Die Verteilung des Sericosids in den einzelnen Hautschichten ist in Tabelle 3.20 angegeben. Drei mit der Formulierung behandelte Schweinehäute (Proben 1-3) sind gegen eine unbehandelte Probe gemessen worden.

Tab.3.20: Verteilung des Sericosids auf die einzelnen Hautschichten in den 3 behandelten Schweinehäuten (Proben 1-3) bei +32 °C nach 20 Stunden

<i>Sericosid</i>	<i>Probe 1</i>	<i>Probe 2</i>	<i>Probe 3</i>	<i>X</i>	<i>Sx</i>	<i>Srel</i>	<i>V</i>
WFR (%)	93,7	93,0	93,3	93,4	0,3	0,3	0,7
<b>Verteilung Sericosid</b>							
Oberfläche (%)	66,1	71,5	65,5	67,7	3,3	4,9	8,3
Hornschicht (%)	26,8	19,6	26,6	24,3	4,1	16,8	10,1
Epidermis (%)	0,7	1,5	1,0	1,1	0,4	35,8	1,0
Dermis (%)	0,2	0,4	0,2	0,3	0,1	44,2	0,3
Rezeptorphase (%)	n.n.	n.n.	n.n.				

Die Einsatzkonzentration an Terminalia sericea Extrakt in der Emulsion mit Ethanolzusatz betrug 0,25 %. Der anschließend aus der Formulierung gemessene Gehalt an Sericosid betrug 0,22 %, was einem Sericosidgehalt im Extrakt von 88 % entspricht. Die Wiederfindungsrate liegt bei ca. 94 %, d.h. 6 % der ursprünglich gefundenen Menge an Sericosid (0,22 %) aus Terminalia sericea Extrakt können nicht erfasst werden. Das Sericosid penetriert nur zu 25,7 % in die Haut. Davon entfallen 24,3 % auf die Hornschicht, 1,1 % auf die Epidermis und 0,3 % auf die Dermis. Eine Penetration in die Rezeptorphase ist nicht festgestellt worden. Ca. 68 % verbleiben in der Emulsion (Oberfläche) und penetrieren somit nicht. Um eine Aussage über die Wirksamkeit machen zu können, ist es notwendig, die prozentuale Verteilung des Sericosids in den einzelnen Hautschichten zu kennen. Von der Gesamtmenge an Sericosid, die in die Haut penetriert (Hornschicht, Epidermis, Dermis, Rezeptorphase), entfallen 94,5 % auf die Hornschicht und 4,3 % auf die Epidermis.

In der Dermis werden noch 1,1 % gefunden, in die Rezeptorphase penetriert kein Sericosid. Dies bedeutet, dass sich der Großteil des Sericosids in der abgestorbenen Hautschicht (Hornschicht) befindet und somit keine Wirkung entfalten kann. Eine Wirksamkeit *in vivo* ist bei solch einer geringen Penetrationsleistung nicht zu erwarten.



## 3.8 Löslichkeitsprobleme bei Terminalia sericea Extrakt

### 3.8.1 Kristallbildung in Emulsionen

Der Terminalia sericea Trockenextrakt ist laut Datenblatt der Fa. Indena in Wasser schwer löslich. Ab einer Einsatzkonzentration von 0,05 % sind im Schaukeltestmuster nach 6 Tagen feine, ca. 25-70  $\mu\text{m}$  längliche Kristallnadeln in den Emulsionen zu sehen. Je nach Emulgatorotyp besitzen die Formulierungen einen mehr oder weniger intensiven lösungsvermittelnden Effekt, der eine unterschiedlich schnelle Kristallisation hervorruft. Die Kristallformen variieren je nach Lagerungsart. In den  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $+6\text{ }^{\circ}\text{C}$  und Schaukeltestmustern finden sich kürzere (ca. 30  $\mu\text{m}$ ), dicke Nadeln, während die  $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$  Muster dünne, längliche Fäden (bis 70  $\mu\text{m}$ ) aufweisen. Als Beispiel ist die Modellformulierung einer O/W Lotion (siehe Abschnitt 6.3.4) aufgeführt. Deutlich sind die Kristallnadeln des Sericosids zu erkennen. Die Aufnahme stammt von einem 6 Tage alten ( $-10\text{ }^{\circ}\text{C}/+40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) Schaukeltestmuster mit der Vergrößerung 1:1250.

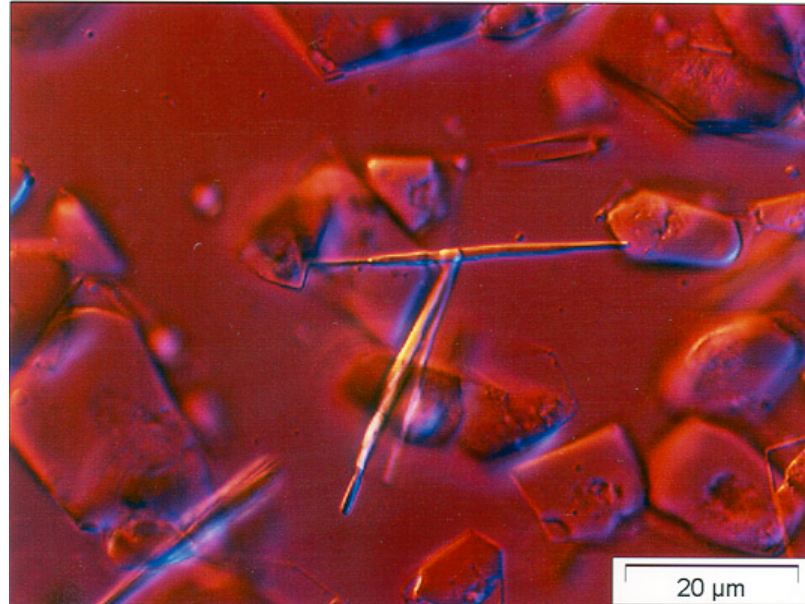


Abb.3.8:O/W Lotion mit 0,1 % Extrakt Nr. 1 (Sericoside)

### 3.8.2 Identifizierung durch IR-Raman Spektroskopie

Durch die Untersuchungen mittels Infrarot (IR)-Raman-Spektroskopie wird geprüft, ob es sich bei den in den Emulsionen vorhandenen Kristallen um Sericosid handelt oder ob eine Inkompatibilität eines Rohstoffes mit der Wirksubstanz vorliegt. Dazu wird eine Spatelspitze der Emulsion auf den Objektträger gestrichen und nach Waschen mit n-Hexan mittels IR-Raman Spektrometer untersucht.

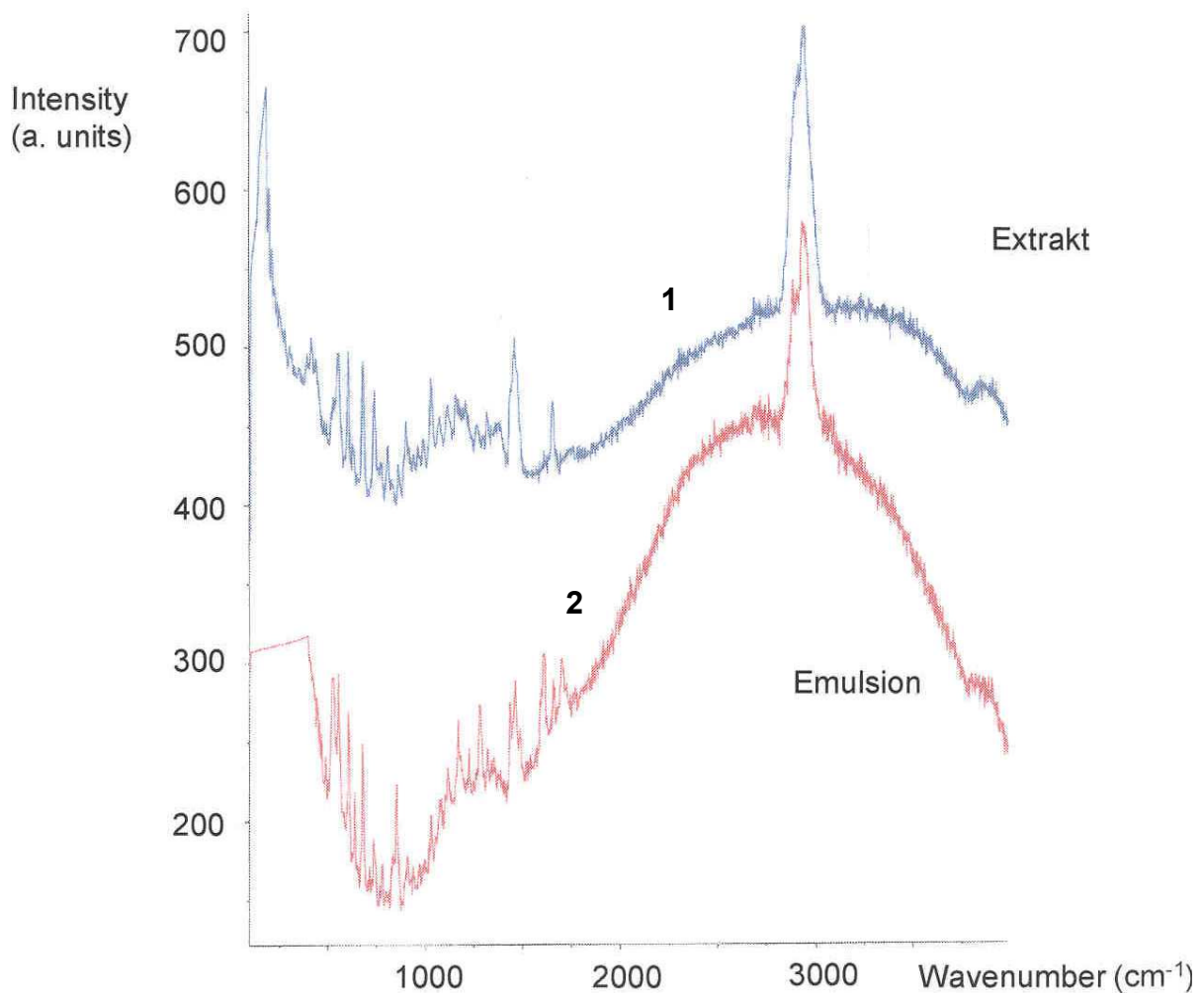


Abb.3.9:IR-Spektrum des Gelbholz-Extraktes (1), sowie das Spektrum der aus einem 4 Monate gelagerten +40 °C Muster isolierten Kristalle (2)

In Abbildung 3.9 ist zu erkennen, dass die Proben ein hohes Grundrauschen aufweisen. Die Zuordnung einzelner Molekülgruppen gestaltet sich sehr schwierig. Es ist daher nur eine qualitative Identifizierung der Kristalle in der Emulsion möglich. Als Standard ist der Terminalia-sericea Extrakt vermessen worden. Zur besseren Isolation der Kristalle aus der Formulierung ist diese vor der Messung mit n-Hexan gewaschen worden. Die dadurch enthaltene höhere Konzentration lässt das Grundrauschen des Spektrums der Kristalle aus der Formulierung geringer ausfallen als im Spektrum mit dem Extrakt, der nur einen Gehalt an Sericosid von 86 % aufweist. Die beiden Spektren stimmen größtenteils miteinander überein. Im Wellenlängenbereich von  $500\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$  finden sich identische Peaks, ebenso im Bereich von  $1100\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$  und  $500\text{-}750\text{ cm}^{-1}$  sowie bei  $1750$  und  $1500\text{ cm}^{-1}$ . Über die qualitative Identifizierung der Kristalle kann gezeigt werden, dass es sich bei den Kristallen in der Formulierung eindeutig um schwerlösliches Sericosid und nicht um einen weiteren in der Formulierung enthaltenen Rohstoff handelt.

### 3.9 Formulierungen mit Ethanol

Die in Abschnitt 3.8.1. ab einer Einsatzkonzentration von 0,05 % beschriebene Kristallbildung des Extraktes Nr. 1 machen eine Löslichkeitsverbesserung zur Anwendung in kosmetischen Formulierungen notwendig, da dort der angestrebte Konzentrationsbereich bei 0,1 % bis 0,5 % liegt. Über IR-Raman- und NMR-Untersuchungen (Abschnitt 3.8.2 und 3.8.3) konnte gezeigt werden, dass Sericosid als Hauptinhaltsstoff (ca. 86 %) aus Terminalia sericea Extrakt für die Kristallbildung verantwortlich ist. Das nach Bombardelli et al. [19] bis zu 10 % enthaltene Isomer Arjunglucosid wird ebenfalls Kristalle bilden.

#### 3.9.1 Löslichkeitsverbesserung durch Ethanolzugabe

Nach Zugabe von EtOH (96 %) kann eine Kristallbildung in einem Konzentrationsverhältnis Terminalia sericea Extrakt/Ethanol von 0,1:6, bezogen auf 100g der O/W- und W/O Formulierungen (siehe Abschnitte 6.3.1, 6.3.2, 6.3.4) verhindert werden.

Ethanol besitzt topisch appliziert leicht hautaustrocknende, kühlende Eigenschaften. Formulierungen, die einen antiirritativ wirksamen Wirkstoff wie Sericosid enthalten, sollten daher ethanolfrei sein. In Lotionen, Balsamen, etc. mit der Bezeichnung „sensitive“ verbietet sich daher der Einsatz von Ethanol grundsätzlich. Da diese Produkte aber die Haupteinsatzgebiete von antiirritativ wirksamen Wirkstoffen wie Sericosid aus Terminalia sericea Extrakt darstellen, muss eine Löslichkeitsverbesserung des Sericosids auf anderem Wege als einer Ethanolzugabe erreicht werden.

### **3.10 Verbesserung der Löslichkeit von Sericosid durch Komplexierung mit Cyclodextrinen**

Eine Möglichkeit zur Verhinderung der Kristallbildung liegt in dem Zusatz von Ethanol als Lösungsmittel (siehe Abschnitt 3.9.1). Eine Komplexierung von Sericosid mit verschiedenen Cyclodextrinen stellt eine weitere Alternative dar. Unter Beachtung der Molekülgröße von Sericosid bietet sich der Einsatz von Hydroxypropyl-gamma (HP- $\gamma$ ) und Hydroxypropyl-beta (HP- $\beta$ ) Cyclodextrinen als hydroxyalkylierte Derivate sowie von Methyl-beta (M- $\beta$ ) Cyclodextrin als alkyliertes Derivat an. Das gamma ( $\gamma$ ) Cyclodextrin ist das einzige unsubstituierte Cyclodextrinderivat, welches zu Komplexierungsversuchen herangezogen worden ist. Durch die komplexe Molekülstruktur von Sericosid und Arjunglucosid und wegen des Fehlens aliphatischer Ketten ist auf die Verwendung von  $\alpha$ -Cyclodextrin als Komplexbildner verzichtet worden. Der Durchmesser der Kavität des  $\alpha$ -Cyclodextrins ist für die Komplexierung einer aromatischen Verbindung nicht ausreichend groß genug [39,128,130].

#### **3.10.1 Überprüfung der statistischen Substitution der alkylierten Cyclodextrinderivate mittels MALDI-TOF**

Die substituierten Cyclodextrinderivate sind laut Datenblatt der Hersteller nur statistisch substituiert. Damit kann den Cyclodextrinen bis auf das unsubstituierte  $\gamma$ -Cyclodextrin keine einheitliche Molmasse zugeordnet werden.

Da sich durch die unterschiedliche Substitution der einzelnen Cyclodextrinderivate die chemisch-physikalischen Eigenschaften ändern, ist der statistische Substitutionsgrad der Cyclodextrine ermittelt worden und mit den Angaben der statistischen Substitutionsgrade des Herstellers (Fa. Wacker, Burghausen) verglichen worden. Die MALDI-TOF hat sich als eine sehr schonende analytische Methode erwiesen, bei der selten Zersetzung der zu untersuchenden Verbindung beobachtet wird. Die Ergebnisse werden an Beispielen des HP- $\gamma$ -Cyclodextrins in Abbildung 3.10 dargestellt.

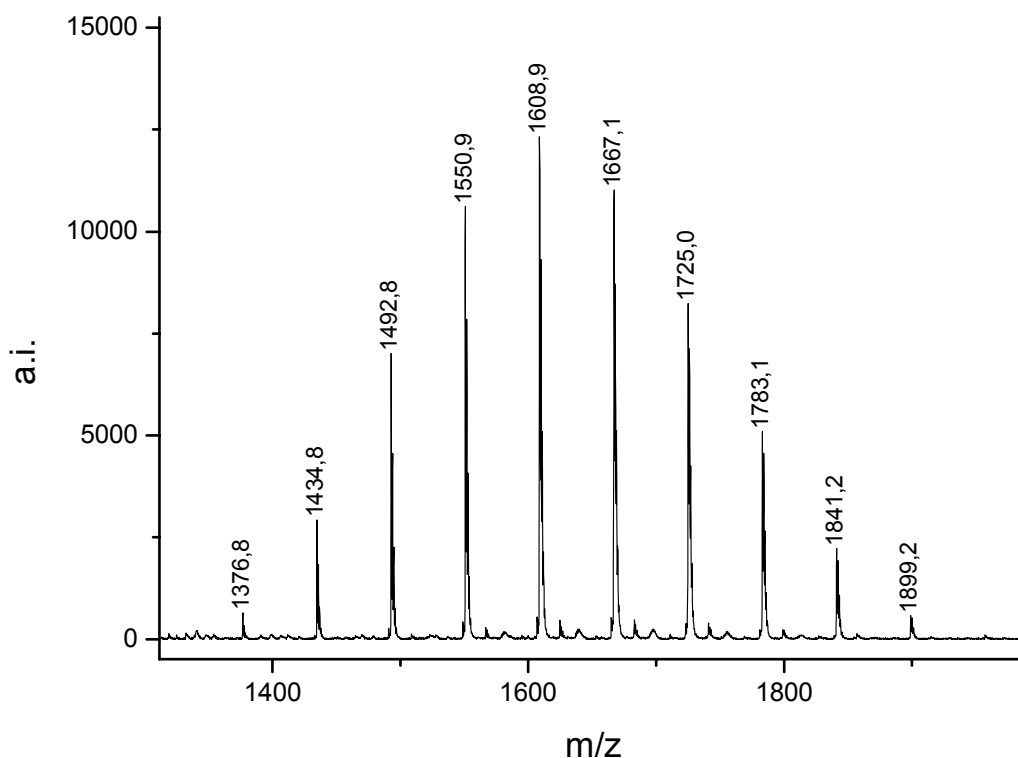


Abb.3.10:Spektrum des statistisch substituierten HP- $\gamma$ -Cyclodextrins

Die absolute Intensität (a.i.) ist gegen die Molekülmasse/Ladung ( $m/z$ ) aufgetragen. Die Fa. Wacker gibt eine statistische Substitution des HP- $\gamma$ -Cyclodextrins von 0,5-0,7 an. Der gemessene Bereich der Molekulargewichte von  $\gamma$ -Cyclodextrin liegt zwischen 1376 g/mol und 1899 g/mol. Die drei Hauptpeaks liegen zwischen 1550 g/mol und 1667 g/mol. Die gemessenen Massen beziehen sich auf den einfach geladenen  $[M + Na^+]$  Komplex. Nicht substituiertes  $\gamma$ -Cyclodextrin im  $Na^+$  Komplex (1320 g/mol) kann nicht nachgewiesen werden. Bei einer statistischen Substitution von 0,5-0,7 müssten die Molekulargewichte des HP- $\gamma$ -Cyclodextrins zwischen 1529 g/mol und 1622 g/mol liegen.

Nach dem erhaltenen Spektrum liegt die statistische Substitution bei der verwendeten Charge aber zwischen 0,53 und 1,03. Bei der Untersuchung von M- $\beta$ -Cyclodextrin sowie von HP- $\beta$ -Cyclodextrin sind ebenfalls leicht abweichende durchschnittliche Substitutionsgrade (DS) festgestellt worden (Spektren nicht gezeigt).

Tab.3.21: Durchschnittliche Substitutionsgrade der Cyclodextrinderivate

Cyclodextrinderivat	DS (Hersteller)	DS (gemessen)	Hersteller
M- $\beta$ -Cyclodextrin	1,6-1,9	1,54-1,93	Fa. Wacker
HP- $\beta$ -Cyclodextrin	0,6-0,9	0,55-0,99	Fa. Wacker
HP- $\gamma$ -Cyclodextrin	0,5-0,7	0,53-1,03	Fa. Wacker

### 3.10.2 Identifizierung des Isomers von Sericosid aus *Terminalia sericea* Extrakt mit Hilfe der $^{13}\text{C}$ -NMR

Nach Bombardelli et al. [18] enthält der *Terminalia sericea* Trockenextrakt der Fa. Indena (Extrakt Nr. 1) neben dem Sericosid noch ein  $\text{C}_4$  Atom Isomer (Arjunglucosid) in einer Konzentration bis zu 10 %. Ziel war es, über die Messung mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR das Arjunglucosid qualitativ, wenn möglich aber auch quantitativ nachzuweisen, da das Isomer ebenfalls einen Komplex mit dem Cyclodextrin eingehen kann. Damit fände eine Komplexierung mit Cyclodextrinen statt, die in Konkurrenz zum Sericosid/Cyclodextrinkomplex steht.

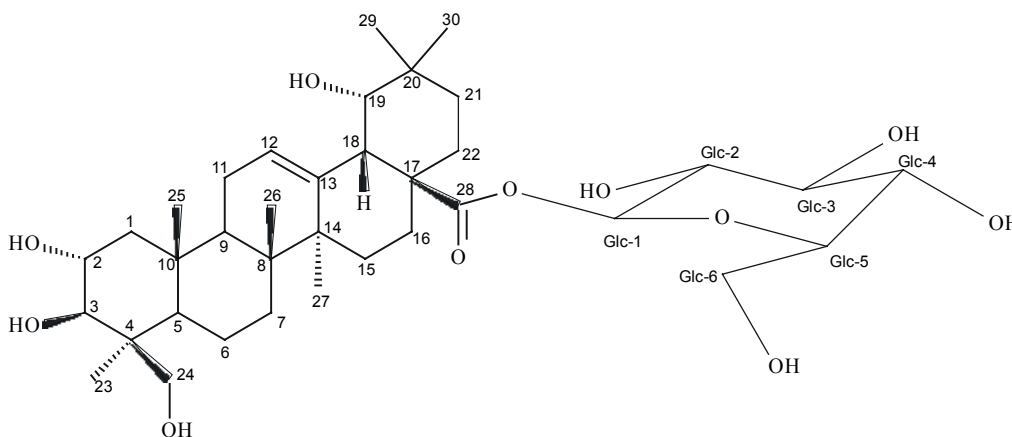


Abb.3.11: Struktur des Sericosids/Arjunglucosids mit einem chiralen Zentrum am  $\text{C}_4$ -Atom

Aufgrund von Signalüberlagerungen im  $^1\text{D}$ -Protonenspektrum ist die Bestimmung der chemischen Verschiebung der  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -Atome mit einem 2D-Korrelationsspektrum ermittelt worden.

Tab.3.22: Zuordnungen und chemischen Verschiebungen (ppm) der einzelnen  $^{13}\text{C}$  und  $^1\text{H}$  Atome von Sericosid/Arjunglucosid aus Terminalia sericea Extrakt

Position	$^{13}\text{C}$ -chemische Verschiebung	$^1\text{H}$ -chemische Verschiebung	Position	$^{13}\text{C}$ -chemische Verschiebung	$^1\text{H}$ -chemische Verschiebung
1	47,70	1,927/0,901	19	82,43	3,275
2	69,60	3,791	20	35,94	–
3	85,97	3,053	21	29,40	1,769/1,671
4	44,39	–	22	33,27	1,783/1,665
5	57,29	0,971	23	23,74	1,227
6	19,96	1,617/1,428	24	66,16	4,033/3,390
7	34,08	1,459/1,317	25	17,43	0,978
8	40,88	–	26	17,68	0,722
9	49,31	1,771	27	24,97	1,280
10	39,22	–	28	178,75	–
11	25,11	1,983	29	28,62	0,948
12	124,79	5,333	30	25,16	0,937
13	144,34	–	Glc-1	95,82	5,369
14	42,60	–	Glc-2	73,87	3,326
15	29,45	1,659/1,008	Glc-3	78,69	3,410
16	28,38	2,314/1,721	Glc-4	71,06	3,359
17	47,12	–	Glc-5	78,24	3,359
18	45,04	3,050	Glc-6	62,36	3,824/3,680

Als Lösungsmittel ist  $\text{d}_4$ -Methanol verwendet worden. Bei den Signalen der  $^{13}\text{C}$ -chemischen Verschiebungen 29,40 und 33,27 sowie 28,62 und 25,16 ist eine Zuordnung zu den C-Atomen nicht eindeutig möglich. Die C-Atome 21 und 22 sowie 29 und 30 können demnach vertauscht sein. Auf das Ergebnis hat dies jedoch keinen Einfluss, da zur Bestimmung des Arjunglucosids und des Sericosids das  $\text{C}_4$ -Atom von entscheidender Bedeutung ist.

Für eine genaue Strukturaufklärung von Sericosid und Arjunglucosid müssten beide Substanzen als reine Standardsubstanzen vorliegen. Nach den ermittelten Werten ist ein Vorliegen von Sericosid zu Arjunglucosid im Verhältnis 85:15 wahrscheinlich. Der relative Fehler liegt bei  $\pm 15\%$ . Das entspricht einem Arjunglucosidgehalt von 12,75-17,2 % und einem Sericosidgehalt von 72,25-97,75 %. Eine akzeptable Gehaltsbestimmung des Arjunglucosids im Terminalia sericea Extrakt ist somit nicht möglich. Aus diesem Grund wird ein nach Frauen et al. [54] gemessener Arjunglucosidgehalt im Extrakt von ca. 10 % angenommen.

### **3.11 Komplexierungsverhältnisse und Komplexbildungskonstanten**

#### **3.11.1 Vorversuche zur Abschätzung des Komplexbildungsverhältnisses zwischen Sericosid und Cyclodextrinen**

Zur Abschätzung des Komplexbildungsverhältnisses ist Extrakt Nr. 1 (Sericoside) mit den in Abschnitt 6.2 beschriebenen Cyclodextrinderivaten im molaren Verhältnis 1,0:1,1 und 1,0:2,2 in Wasser unter Wärmezufuhr equilibriert worden. Bei allen Versuchen ist ein Anstieg der Löslichkeit von Sericosid und Arjunglucosid beobachtet worden, unabhängig vom eingesetzten molaren Komplexierungsverhältnis. Nach Zugabe der Extrakt/Cyclodextrinlösungen zu den kalten O/W Emulsionen (siehe Abschnitt 6.3.2, 6.3.4) tritt bei allen  $\beta$ -Derivaten Rekristallisation des Sericosids ein. Dies äußert sich durch das Vorhandensein von Klümpchen, die kurz nach der Einarbeitung der Phase in die Formulierung sichtbar werden. Die mikroskopischen Bilder bestätigen eine Rekristallisation. Die Komplexe mit den  $\gamma$ -Derivaten zeigen über die Lagerungsdauer von 6 Monaten dagegen keine Rekristallisation. Die schnell eintretende Rekristallisation der  $\beta$ -Cyclodextrin/Extrakt Komplexe in den Formulierungen lässt auf eine Interaktion der Rohstoffe in der Formulierung mit den Cyclodextrinen schließen, die in der Lage sind, die hydrophobe Zone des Cyclodextrins anstelle des Sericosids zu besetzen. Da die Beobachtungen unabhängig von der Substitution der Cyclodextrine aber abhängig von der Anzahl der Glucopyranosen ist, scheint der Durchmesser der Cyclodextrine für die Interaktion verantwortlich zu sein.



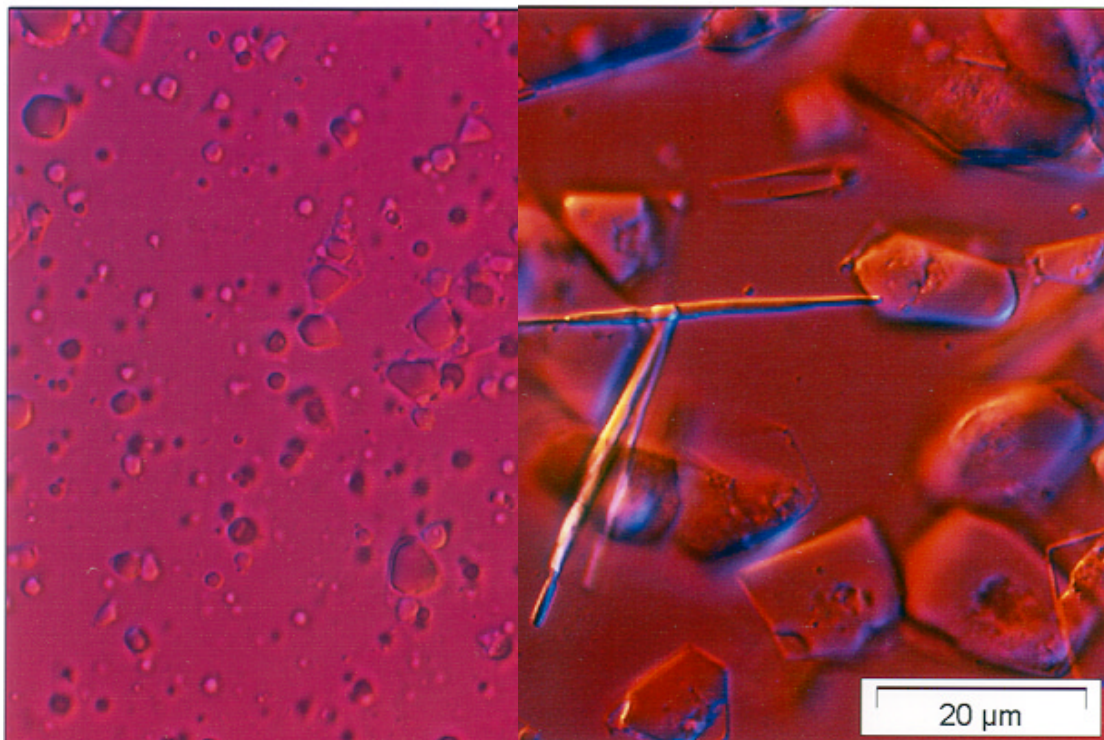


Abb.3.12.A + B:O/W Lotion nach 30 tägiger Stressung im Schaukelschrank (+40 °C/ -10 °C).

Die Abbildung 3.12.A weist im Gegensatz zur Abbildung 3.12.B keine Kristallbildung auf. Die Formulierung in Abbildung 3.12.B enthält 0,1 % Terminalia sericea Extrakt (Extrakt Nr. 1), die in Abbildung 3.12.A 0,3 % Extrakt Nr. 1 mit  $\gamma$ -Cyclodextrin im molaren Verhältnis 1,0:1,25. Die Aufnahmen sind mit einer Vergrößerung von 1:1250 gemacht worden. Die Kristallbildung bei der Emulsion in Abbildung 3.12.B zieht auch eine Zerstörung der Emulsionsstruktur nach sich. Während das linke Bild eine intakte Formulierung zeigt, ist rechts ein Zusammenlaufen der Fettphase zu beobachten. Eine Phasentrennung wird nicht beobachtet.

### 3.11.2 Bestimmung des Komplexierungsverhältnisses und der Komplexbildungskonstante von Extrakt/Cyclodextrin

Zur Bestimmung des Komplexierungsverhältnisses sowie der Komplexbildungskonstante (Methode siehe Abschnitt 2.15) ist ein Überschuss von Terminalia sericea Extrakt mit Cyclodextrinlösungen verschiedener Konzentrationen versetzt und die Veränderung der Löslichkeit des Sericosids nach der Equilibrierung ermittelt worden.

### 3.11.2.1 Einfluss des Arjunglucosids auf die Komplexbildung von Sericosid mit Cyclodextrinen

Vor der Berechnung des Komplexbildungsverhältnisses sowie der Komplexbildungskonstante von der Wirksubstanz Sericosid mit den Cyclodextrinderivaten ist der Einfluss des C<sub>4</sub> Atom Isomers Arjunglucosid auf die Komplexbildung untersucht worden. Die molare Masse des Sericosidisomers Arjunglucosid (AJG) ist identisch mit der des Sericosids, wird aber vermutlich wegen einer höheren Polarität ca. 1 min früher vom RI-Detektor erfasst (siehe Abschnitt 3.6.2).

Tab.3.23: Gemessene LC/MS Flächen von Sericosid und Arjunglucosid (AJG) gegen die  $\gamma$ -Cyclodextrin Konzentration

<i><math>\gamma</math> - Cycl. Verd. 1:4000</i>	<i>AJG (Fläche)</i>	<i>Sericosid (Fläche)</i>
Standard (0 %)	1,7028	1,6526
5,0 % Lösung	5,4356	10,9425
4,0 % Lösung	5,6124	9,0184
3,0 % Lösung	4,8731	7,7808
2,5 % Lösung	4,0219	7,3273
2,0 % Lösung	3,7622	6,4320
1,5 % Lösung	3,7852	5,3126
1,0 % Lösung	3,0439	4,0694

Da beide Moleküle die gleiche Molmasse besitzen, können die Flächen untereinander ins Verhältnis gesetzt werden. Die Verdünnung der  $\gamma$ -Cyclodextrin Konzentrationsreihe beträgt 1:4000. Der Arjunglucosidgehalt bei Zusatz von cyclodextrinhaltiger Equilibrierlösung ändert sich von ca. 1,7 Flächen ohne Cyclodextrinzusatz auf ca. 5,4 Flächen bei Zusatz von 5 %iger Cyclodextrinlösung. Wie aus Tabelle 3.23 ersichtlich, erhöht sich die detektierte Menge an Sericosid von 1,7 Flächen (Standard) auf 10,9 Flächen (5 %ige Lösung). Nach Zusatz von 5 %iger Cyclodextrinlösung ist die Löslichkeit des Arjunglucosids um den Faktor 3,19 gestiegen, die des Sericosids um den Faktor 6,62. Da bei der Methode nur der lösliche Überstand untersucht wird (der unlösliche Niederschlag wird zuvor abzentrifugiert), muss die quantitative Zusammensetzung der Wirkstoffe in der Lösung nicht mit der im Terminalia sericea Extrakt identisch sein.

Da das Arjunglucosid das polarere Isomer ist (frühere Detektion bei LC/MS) ist die Sättigungslöslichkeit in wässriger Lösung etwas höher als bei dem Sericosid. Das erklärt die nahezu identischen Sättigungslöslichkeiten in reinem Wasser, obwohl das Arjunglucosid im Extrakt nur zu 10 % vorhanden ist.

Aus Tabelle 3.23 ist ersichtlich, dass bei der Komplexbildung von Terminalia sericea Extrakt neben dem Sericosid auch das Arjunglucosid um die Komplexbildung mit dem Cyclodextrin konkurrieren wird. Ziel war es, den Einfluss des Arjunglucosids auf die Komplexbildung von Sericosids mit den Cyclodextrinen zu untersuchen.

### 3.11.2.2 Berechnung der Komplexbildungsverhältnisse von Sericosid mit Cyclodextrinen

Im folgenden Abschnitt soll das Komplexbildungsverhältnis und die Komplexbildungskonstante von Sericosid aus Terminalia sericea Extrakt und Cyclodextrinen ohne Einbeziehung des Arjunglucosids berechnet werden. Sericosid ist gegenüber dem Arjunglucosid unpolarer und lässt sich wegen der längeren Retentionszeit bei gleicher molaren Masse über LC/MS vom Arjunglucosid unterscheiden.

#### Extrakt/ $\gamma$ -Cyclodextrinkomplex

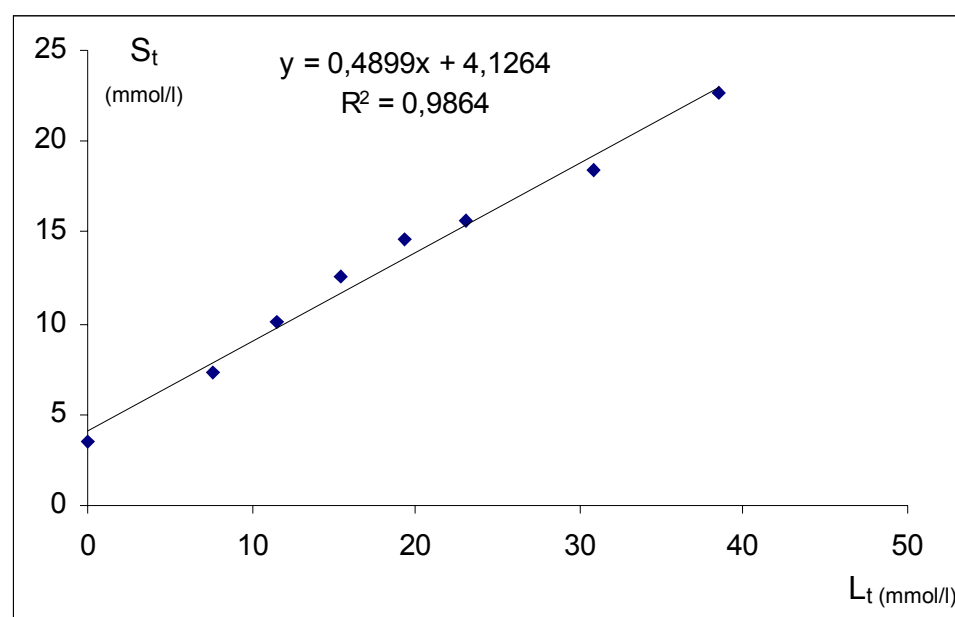


Abb.3.13:Lösungsisotherme von Sericosid mit  $\gamma$ -Cyclodextrin

In Abbildung 3.13 ist die Löslichkeit von Sericosid aus Terminalia sericea Extrakt in der wässrigen Phase ( $S_t$ ) gegen die Konzentration von  $\gamma$ -Cyclodextrin ( $L_t$ ) aufgetragen. Die Steigung der Geraden beträgt 0,4899. Man erhält eine Lösungsisotherme vom Typ  $A_L$  erhalten. Die Löslichkeit des reinen Sericosids in Wasser beträgt 3,45 mmol/l. Nach Zusatz einer 5 %igen  $\gamma$ -Cyclodextrinlösung (38,55 mmol/l) lösen sich 22,73 mmol Sericosid in Wasser. Damit komplexieren 38,55 mmol  $\gamma$ -Cyclodextrin 22,73-3,45 mmol Sericosid, also 19,28 mmol. Das molare Komplexierungsverhältnis beträgt demnach 1,0:2,0 ( $K_{1:2}$ ) für Sericosid/ $\gamma$ -Cyclodextrin. Dies widerspricht allerdings der Theorie, dass eine Lösungsisotherme vom Typ  $A_L$  entsteht. Nach Higuchi et al. [72] müsste man bei einem 1:2 Komplex eine Lösungsisotherme vom Typ  $A_P$  erhalten. Die Komplexbildungskonstante errechnet sich zu  $K_{1:2} = 233 \text{ mol}^{-1}$ .

#### Extrakt/HP- $\gamma$ -Cyclodextrinkomplex

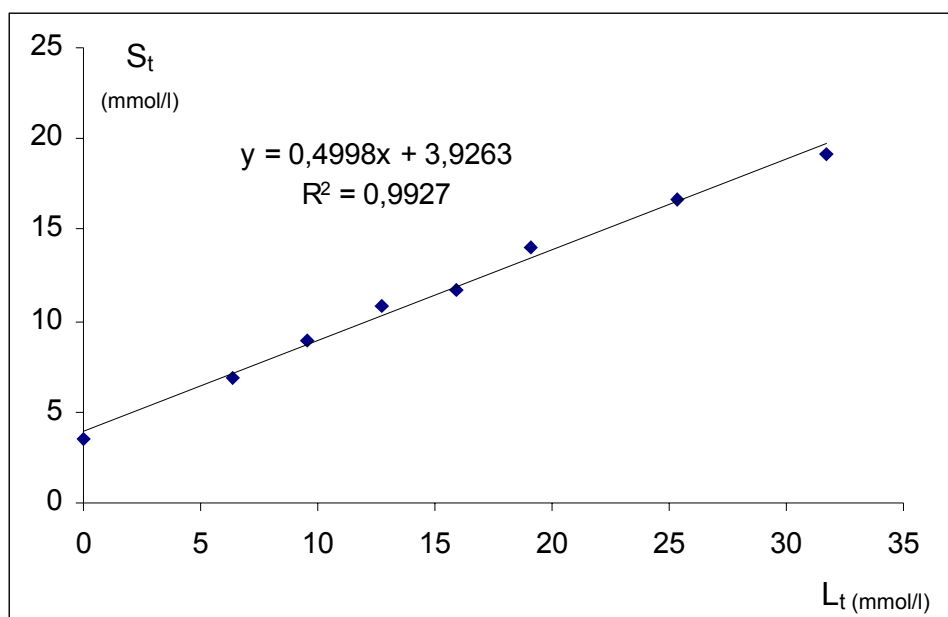


Abb.3.14.Lösungsisotherme von Sericosid mit HP- $\gamma$ -Cyclodextrin

Die Löslichkeit von Sericosid in der wässrigen Phase ( $S_t$ ) ist gegen die Konzentration von HP- $\gamma$ -Cyclodextrin ( $L_t$ ) aufgetragen. Die Steigung der Geraden beträgt 0,4899. Die Komplexierung von Sericosid mit HP- $\gamma$ -Cyclodextrin verläuft ebenfalls nach einer Lösungsisotherme vom Typ  $A_L$ . Nach Zusatz einer 5 %igen HP- $\gamma$ -Cyclodextrinlösung (31,73 mmol/l) lösen sich 19,22 mmol Sericosid in Wasser.

Die Löslichkeit von Sericosid beträgt 3,45 mmol/l. Damit komplexieren 31,73 mmol HP- $\gamma$ -Cyclodextrin 19,22-3,45 mmol Sericosid, also 15,77 mmol. Das molare Komplexierungsverhältnis beträgt 1,0:2,0 ( $K_{1:2}$ ) für Sericosid mit HP- $\gamma$ -Cyclodextrin. Auch hier müsste man nach der Theorie eine Lösungsisotherme vom Typ  $A_P$  erhalten. Die Komplexbildungskonstante errechnet sich zu  $K_{1:2} = 254 \text{ mol}^{-1}$ .

### Extrakt/M- $\beta$ -Cyclodextrinkomplex

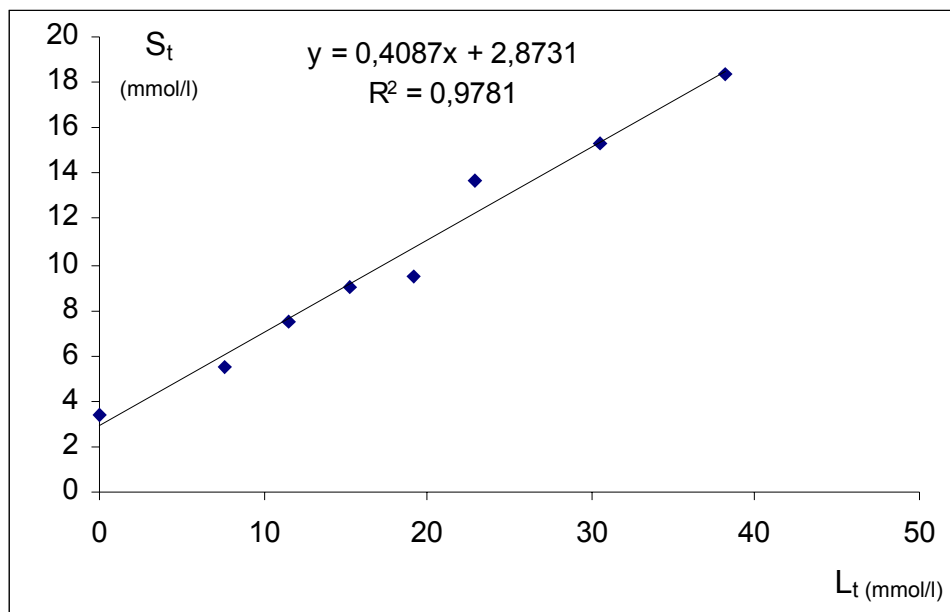


Abb.3.15:Lösungsisotherme von Sericosid aus Terminalia sericea Extrakt mit M- $\beta$ -Cyclodextrin

Die Löslichkeit von Sericosid in der wässrigen Phase ( $S_t$ ) ist gegen die Konzentration von eingesetztem M- $\beta$ -Cyclodextrin ( $L_t$ ) aufgetragen. Die Steigung der Geraden beträgt 0,4087. Die Komplexierung von Sericosid mit M- $\beta$ -Cyclodextrin verläuft analog den  $\gamma$ -Derivaten nach einer Lösungsisotherme vom Typ  $A_L$ . Nach Zusatz einer 5 %igen M- $\beta$ -Cyclodextrinlösung (38,17 mmol/l) gehen 18,38 mmol Sericosid in Lösung. Die Löslichkeit von Sericosid in Wasser beträgt 3,37 mmol/l. Das Verhältnis beträgt 38,17 mmol M- $\beta$ -Cyclodextrin zu 18,38-3,37 mmol Sericosid. Daraus ergibt sich ein molares Komplexierungsverhältnis von 1,0:2,6 ( $K_{1:2,6}$ ) für Sericosid mit M- $\beta$ -Cyclodextrin. Nach der Theorie müsste man hier ebenfalls eine Lösungsisotherme vom Typ  $A_P$  erhalten. Die Komplexbildungskonstante beträgt  $K_{1:2,6} = 241 \text{ mol}^{-1}$ .

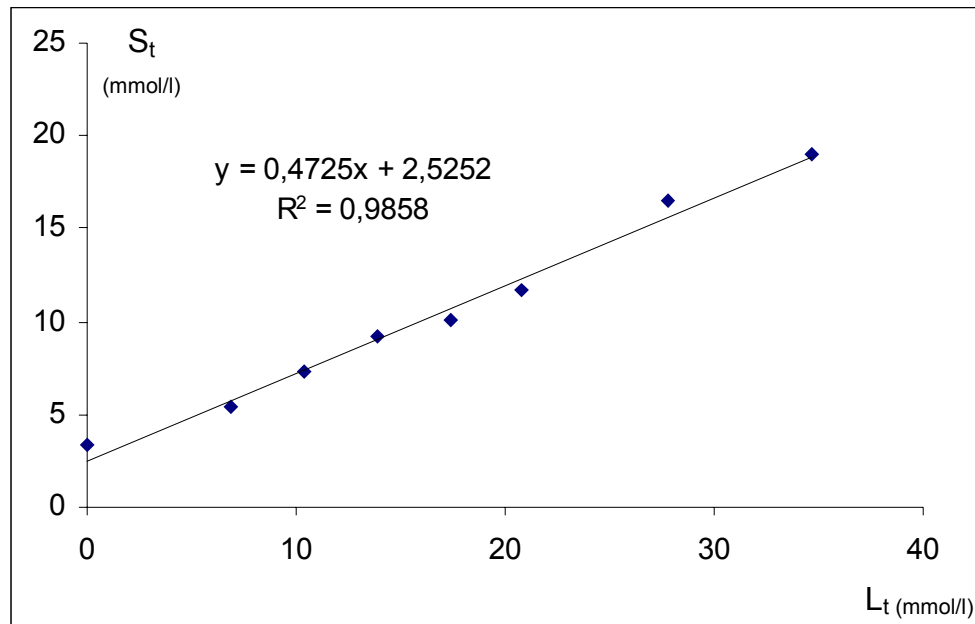
Extrakt/HP- $\beta$ -Cyclodextrinkomplex

Abb.3.16:Lösungsisotherme (Typ  $A_L$ ) von Sericosid mit HP- $\beta$ -Cyclodextrin

Die Löslichkeit von Sericosid in der wässrigen Phase ( $S_t$ ) ist gegen die Konzentration von HP- $\beta$ -Cyclodextrin ( $L_t$ ) aufgetragen. Die Steigung der Geraden beträgt 0,4725. Nach Zusatz einer 5 %igen HP- $\beta$ -Cyclodextrinlösung (34,72 mmol/l) lösen sich 19,05 mmol Sericosid in Wasser. Die reine Löslichkeit von Sericosid ohne Cyclodextrinzusatz beträgt 3,37 mmol/l. Somit ergibt sich ein molares Komplexierungsverhältnis von 1,0:2,2 ( $K_{1:2,2}$ ) für Sericosid mit HP- $\beta$ -Cyclodextrin. Die Komplexbildungskonstante errechnet sich zu  $K_{1:2,2} = 355 \text{ mol}^{-1}$ .

### 3.11.2.3 Berechnung der Komplexierungsverhältnisse von Sericosid und Arjunglucosid mit Cyclodextrinen

Die in Abschnitt 3.11.2.2 errechneten Komplexbildungsverhältnisse von Sericosid ohne die Einbeziehung von Arjunglucosid mit den Cyclodextrinderivaten liegen im Bereich von 1,0:2,0 bis 1,0:2,6. Die molaren Komplexierungsverhältnisse der  $\beta$ -Derivate sind mit 1,0:2,2 und 1,0:2,6 höher als die der  $\gamma$ -Derivate (beide 1,0:2,0). Dies steht im Widerspruch zu den in den Vorversuchen gemachten Beobachtungen in Abschnitt 3.11.1, die auf ein 1:1 Komplexierungsverhältnis hindeuten. In Abschnitt 3.11.2.1 konnte gezeigt werden, dass das Arjunglucosid ebenfalls einen Komplex mit den Cyclodextrinen eingeht. Um die Auswirkungen auf das Komplexierungsverhältnis von Sericosid ermitteln zu können, ist Arjunglucosid rechnerisch mit in die Gehaltsberechnung von Sericosid einbezogen worden. Nach erneuter Kalibrierung der Standards über eine Gerade (jetzt Sericosid und AJG) sind die Komplexierungsverhältnisse neu berechnet worden.

#### Extrakt/ $\gamma$ -Cyclodextrinkomplex

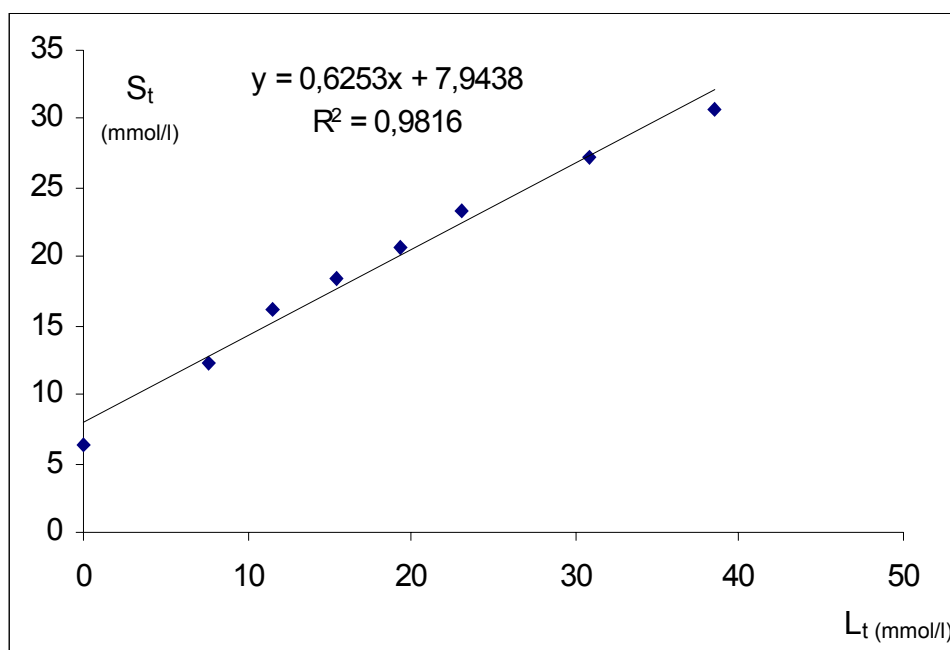


Abb.3.17:Lösungsisotherme von Sericosid und Arjunglucosid mit  $\gamma$ -Cyclodextrin

Die Löslichkeiten von Sericosid und Arjunglucosid in der wässrigen Phase ( $S_t$ ) sind gegen die  $\gamma$ -Cyclodextrin Konzentration ( $L_t$ ) aufgetragen. Die Steigung der Geraden beträgt 0,6253. Bei der Lösungsisotherme handelt es sich um einen Typ  $A_L$ . Die Löslichkeiten von Sericosid und Arjunglucosid ohne Cyclodextrinzusatz betragen insgesamt 6,31 mmol/l. Nach Zusatz einer 5 %igen  $\gamma$ -Cyclodextrinlösung (38,55 mmol/l) steigt die Löslichkeit auf 30,62 mmol. Das Komplexierungsverhältnis für Sericosid und Arjunglucosid zusammen errechnet sich zu 1,0:1,6 ( $K_{1:1,6}$ ). Die Komplexbildungskonstante errechnet sich zu  $K_{1:1,6} = 210 \text{ mol}^{-1}$ . Die Komplexbildungskonstante von Sericosid/ $\gamma$ -Cyclodextrin, also ohne Einbeziehung des Arjunglucosidgehaltes (Abbildung 3.13), beträgt  $K_{1:2} = 233 \text{ mol}^{-1}$ . Damit weisen die beiden Komplexbildungskonstanten nahezu identische Werte auf. Nach Gleichung 2.14 (siehe Abschnitt 2.15.1) übt die Sättigungslöslichkeit [ $S_0$ ] des Gastmoleküls (Sericosid bzw. Sericosid und Arjunglucosid) ohne Cyclodextrinzusatz einen großen Einfluss auf die Berechnung der Komplexbildungskonstante aus. Die Gastmoleküle besitzen meist nur eine sehr geringe Sättigungslöslichkeit. Entsprechend groß wirken sich die Abweichungen bei der analytischen Bestimmung auf die Sättigungslöslichkeit bzw. auf die Bestimmung der Komplexbildungskonstante aus. Nach Einbeziehung von Arjunglucosid in die Berechnungen der Komplexbildungskonstante von Sericosid/Cyclodextrin werden ähnlich große Werte erhalten. Somit weicht die Affinität des Isomers Arjunglucosid zum Cyclodextrin nicht wesentlich von der des Sericosids ab.



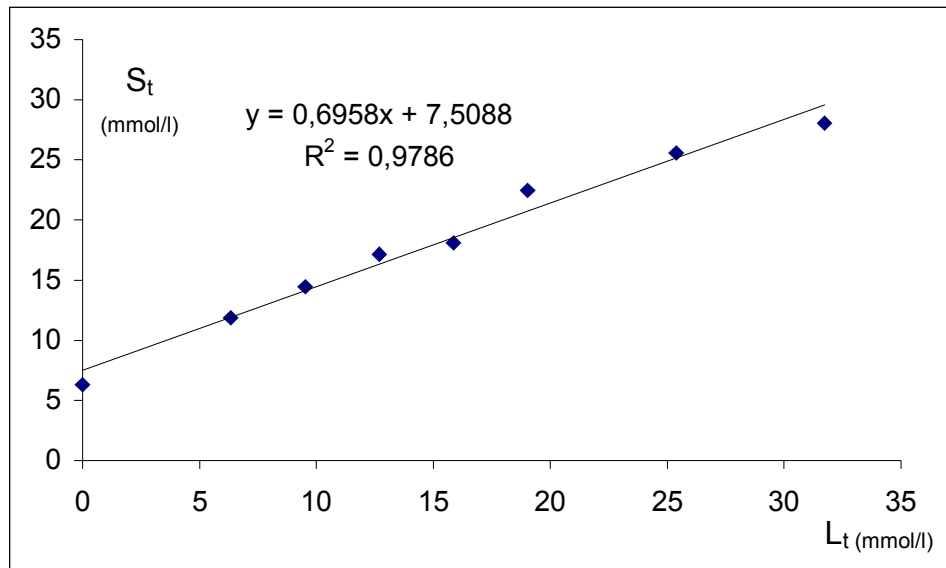
Extrakt/HP- $\gamma$ -Cyclodextrin

Abb.3.18:Lösungsisotherme (Typ  $A_L$ ) von Sericosid und Arjunglucosid mit HP- $\gamma$ -Cyclodextrin

Die Löslichkeiten von Sericosid und Arjunglucosid in der wässrigen Phase ( $S_t$ ) sind gegen die HP- $\gamma$ -Cyclodextrin Einsatzkonzentration ( $L_t$ ) aufgetragen. Die Steigung der Geraden beträgt 0,6958. Die Löslichkeit von Sericosid und Arjunglucosid ohne Cyclodextrinzusatz beträgt insgesamt 6,31 mmol/l. Nach Zusatz einer 5 %igen HP- $\gamma$ -Cyclodextrinlösung (34,77 mmol/l) steigt die Löslichkeit auf 28,26 mmol. Das Komplexierungsverhältnis für Sericosid und Arjunglucosid mit HP- $\gamma$ -Cyclodextrin errechnet sich somit zu 1,0:1,5 ( $K_{1:1,5}$ ). Die Komplexbildungskonstante beträgt  $K_{1:1,5} = 305 \text{ mol}^{-1}$ . Die Komplexbildungskonstante von Sericosid/HP- $\gamma$ -Cyclodextrin (Abbildung 3.14) beträgt  $K_{1:2} = 254 \text{ mol}^{-1}$ . Da beide Komplexbildungskonstanten nahezu identische Werte liefern, hat das Arjunglucosid keine höhere Affinität zum Cyclodextrin als das Sericosid.

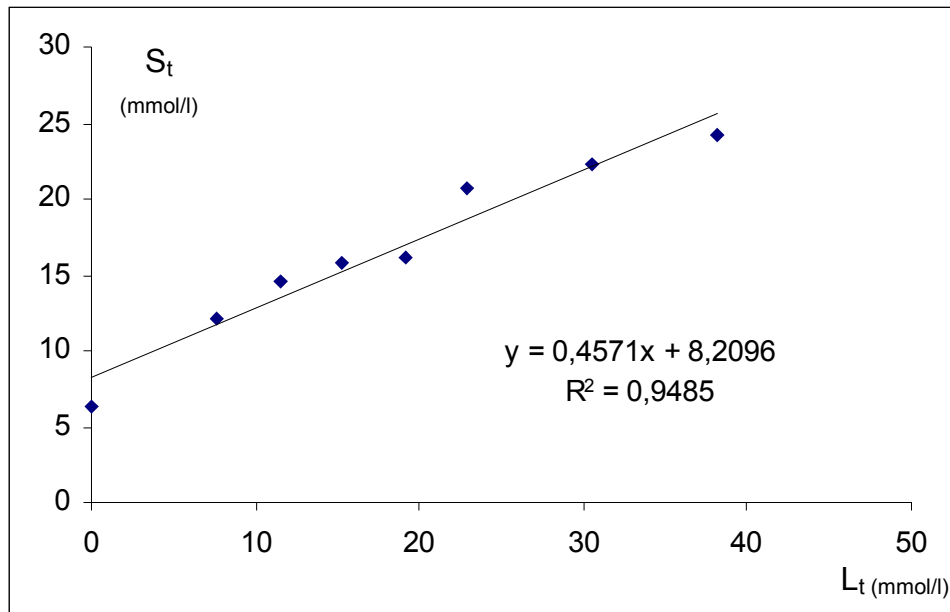
Extrakt/M- $\beta$ -Cyclodextrinkomplex

Abb.3.19:Lösungsisotherme (Typ  $A_L$ ) von Sericosid und Arjunglucosid mit M- $\beta$ -Cyclodextrin

Die Löslichkeiten von Sericosid und Arjunglucosid in der wässrigen Phase ( $S_t$ ) sind gegen die Konzentration des M- $\beta$ -Cyclodextrins ( $L_t$ ) aufgetragen. Die Steigung der Geraden beträgt 0,4571. Die Löslichkeit von Sericosid und Arjunglucosid ohne M- $\beta$ -Cyclodextrinzusatz beträgt insgesamt 6,36 mmol/l. Nach Zusatz einer 5 %igen M- $\beta$ -Cyclodextrinlösung (38,17 mmol/l) steigt die Löslichkeit auf 24,17 mmol. Daraus ergibt sich ein Komplexierungsverhältnis von Sericosid und Arjunglucosid mit M- $\beta$ -Cyclodextrin von 1,0:2,1 ( $K_{1:2,1}$ ). Die Komplexbildungskonstante errechnet sich zu  $K_{1:2,1} = 103 \text{ mol}^{-1}$ . Die Komplexbildungskonstante von Sericosid/Cyclodextrin errechnet sich aus Abbildung 3.15 zu  $K_{1:2,6} = 241 \text{ mol}^{-1}$ . Auch hier sind nur geringe Abweichungen zu erkennen, die durch den Messfehler bei der Bestimmung der Grundlöslichkeiten von Sericosid, bzw. Sericosid und Arjunglucosid erklärbar wären. Das Arjunglucosid besitzt demnach keine deutlich höhere Affinität zum M- $\beta$ -Cyclodextrin als das Sericosid.

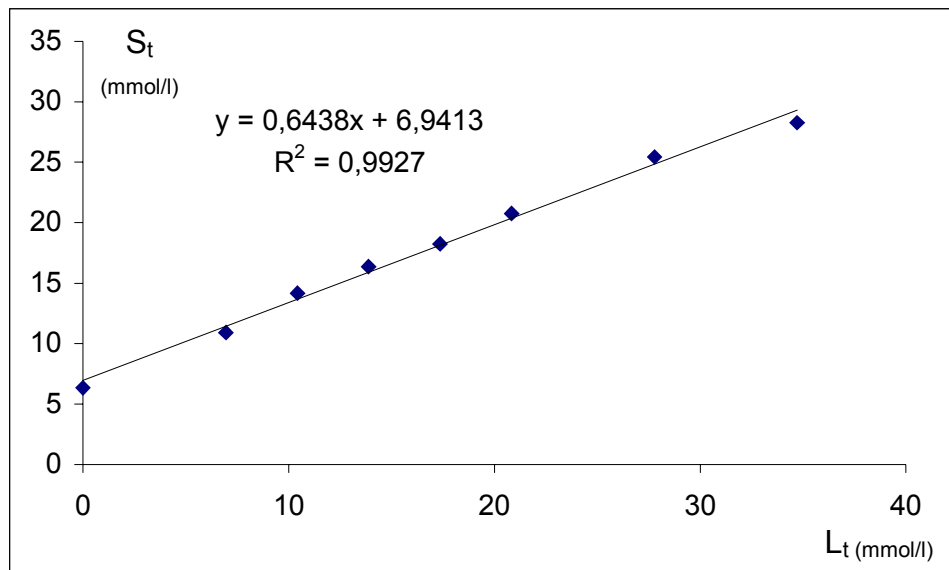
Extrakt/HP- $\beta$ -Cyclodextrinkomplex

Abb.3.20:Lösungsisotherme (Typ  $A_L$ ) von Sericosid und Arjunglucosid mit HP- $\beta$ -Cyclodextrin

Die Löslichkeiten von Sericosid und Arjunglucosid in der wässrigen Phase ( $S_t$ ) sind gegen die HP- $\beta$ -Cyclodextrin Einsatzkonzentration ( $L_t$ ) aufgetragen. Die Steigung der Geraden beträgt 0,6438. Nach Zusatz einer 5 %igen M- $\beta$ -Cyclodextrinlösung (34,72 mmol/l) steigt die Löslichkeit von Sericosid und Arjunglucosid von 3,66 mmol auf 28,26 mmol. Daraus ergibt sich ein Komplexierungsverhältnis von Sericosid und Arjunglucosid mit HP- $\beta$ -Cyclodextrin von 1,0:1,6 ( $K_{1:1,6}$ ). Die Komplexbildungskonstante beträgt  $K_{1:1,6} = 220 \text{ mol}^{-1}$ . Die Komplexbildungskonstante von Sericosid und Cyclodextrin, ohne die Einbeziehung des Arjunglucosids, beträgt  $K_{1:2,2} = 355 \text{ mol}^{-1}$  (Abbildung 3.16). Die Komplexbildungskonstante von Sericosid/Cyclodextrinen weicht nicht erheblich von der Komplexbildungskonstante von Sericosid und Arjunglucosid/Cyclodextrinen ab. Demnach besitzt das Arjunglucosid keine deutlich höhere Affinität zum Cyclodextrin als das Sericosid.

Zusammenfassen lässt sich sagen, dass das Sericosid und das Arjunglucosid aus Terminalia sericea Extrakt mit allen verwendeten Cyclodextrinderivaten Komplexe eingeht. Die Substituenten der alkylierten Cyclodextrine nehmen im gemessenen Konzentrationsbereich keinen Einfluss auf die Art der Lösungsisothermen. Somit wird bei allen verwendeten Cyclodextrinderivaten die Sättigungslöslichkeit des entstandenen Komplexes nicht überschritten.

Alle Komplexe von Terminalia sericea Extrakt mit Cyclodextrinen zeigen Lösungsisothermen vom  $A_L$ -Typ (siehe Abschnitt 2.15.1), die einen 1:1 Komplex anzeigen, obwohl man bei einem molaren Komplexierungsverhältnis von z.B. 1:2 oder höher eine Lösungsisotherme vom Typ  $A_P$  erhalten müsste. Da nach Bestimmung der Komplexierungsverhältnisse der Inhaltsstoffe mit Cyclodextrinen aus den Abbildungen 3.13 bis 3.20 rechnerisch kein 1:1 Komplex ermittelt wird, lassen sich nur scheinbare Komplexbildungskonstanten von Sericosid/Cyclodextrinen bzw. Sericosid und Arjunglucosid/Cyclodextrinen berechnen. Die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, dass es sich bei dem Gelholz-Extrakt um ein Vielstoffgemisch handelt und nicht um eine Reinsubstanz. Geht ein anderer im Extrakt enthaltener Stoff (wie z.B. das Arjunglucosid) ebenfalls Komplexe mit den Cyclodextrinen ein, stehen diese bei Komplexierung mit Sericosid nicht mehr zur Verfügung. Das führt bei der Auswertung zu einem fälschlicherweise zu hoch berechneten Komplexierungsverhältnis, da ein Teil der eingesetzten Cyclodextrine für die Komplexierung des Arjunglucosids verbraucht wird. Demnach kann für einen Sericosid/Cyclodextrinkomplex nur eine scheinbare Komplexbildungskonstante berechnet werden, obwohl ein 1:1 Komplexierungsverhältnis vorliegt.

#### 3.11.2.4 Änderung der Extrakt/ $\gamma$ -Cyclodextrin Komplexierungseigenschaften in Abhängigkeit vom pH-Wert

Eine 5 %ige  $\gamma$ -Cyclodextrin Lösung ist auf die pH- Werte 3, 5, 7 und 9 eingestellt worden. Anschließend wird ein Überschuss an Terminalia sericea Extrakt (Extrakt Nr. 1) zugegeben und bis zur Gleichgewichtseinstellung equilibriert (Methode siehe Abschnitt 2.15.2). Anschließend ist der Einfluss des pH- Wertes auf die Komplexbildung von dem Wirkstoff Sericosid mit  $\gamma$ -Cyclodextrin im pH-Bereich von pH 3- pH 9 untersucht worden.

Tab.3.24: Molaren Löslichkeiten von Sericosid (mmol/l) in einer 5 %igen  $\gamma$ -Cyclodextrinlösung im pH-Bereich von pH 3-pH 9

Nr.	pH	Sericosid (mmol/l)
1	3	23,26
2	5	23,35
3	7	19,62
4	9	21,36

Die gemessenen Löslichkeiten von Sericosid liegen-ausgenommen die Messung bei pH 7-alle im Bereich zwischen 21,36 mmol/l und 23,35 mmol/l. Die Löslichkeit bei pH 7 beträgt nur 19,62 mmol/l. Eine pH-Abhängigkeit der Löslichkeit von Sericosid im Bereich von pH 3 bis pH 9 ist nicht zu erkennen. Der pH-Bereich ist interessant, da die pH-Werte kosmetischer Cremeformulierungen im Allgemeinen zwischen pH 7,5 und pH 3,5 liegen.

## 3.12 Analytik der Extrakt/Cyclodextrinkomplexe

### 3.12.1 Röntgendiffraktometrie (XRD)

Mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie können kristalline Strukturen auf ihre Identität hin untersucht werden. Im Falle der Wirkstoff/Cyclodextrinkomplexe dient sie zur Verifizierung der entstandene Komplexe. Ein kristalliner Wirkstoff geht nach der molekularen Einlagerung (vollständige Komplexierung) mit amorphen Cyclodextrinen in einen amorphen Zustand über. Damit verschwinden die charakteristischen Peaks des Gastmoleküls im Spektrum. Bei einer unvollständigen Einlagerung dagegen bleiben die charakteristischen Peaks bestehen, da ein Teil des kristallinen Wirkstoffes frei vorliegt. Die Anwesenheit von unkomplexierten Wirkstoff in der Probe kann bei den bei der Messung verwendeten Geräten (siehe Abschnitt 6.5.11) erst ab einer Konzentration von ca. 5 % festgestellt werden.

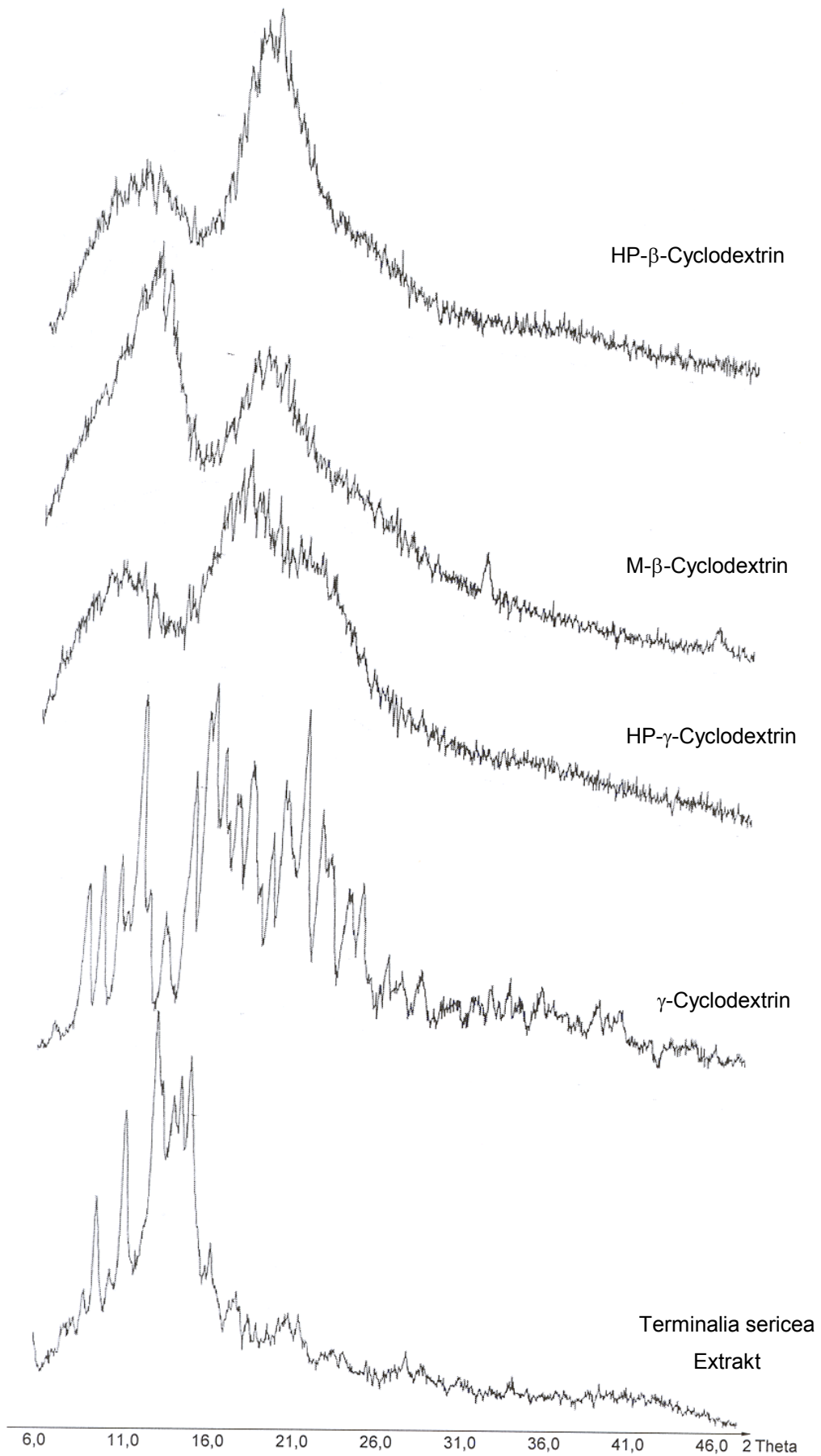


Abb.3.21:XRD-Spektren von Terminalia sericea Extrakt und der Cyclodextrine in der Reihenfolge  $\gamma$ -Cyclodextrin, HP- $\gamma$ -Cyclodextrin, M- $\beta$ -Cyclodextrin und HP- $\beta$ -Cyclodextrin

Zuerst wird der Gelbholz-Extrakt im Vergleich zu den Cyclodextrinderivaten gemessen, um die Spektren von Wirkstoff und Cyclodextrin auf eine evtl. auftretende Überlappung vorhandener Peaks hin zu untersuchen. Die Spektren der Cyclodextrinstandards der Abbildungen 3.22 zeigen keine Übereinstimmungen der Peaks mit den Peaks im Spektrum vom Terminalia sericea Extrakt. Charakteristisch für den Terminalia sericea Extrakt sind die Peaks des Sericosids im Bereich zwischen 11 und 16 (2 Theta). Beim kristallinen  $\gamma$ -Cyclodextrin sind mehrere charakteristische Peaks bei 12, 15 und 21 (2 Theta) zu sehen. Das HP- $\gamma$ -Cyclodextrin zeigt aufgrund seiner amorphen Eigenschaften nur ein erhöhtes Grundrauschen bei ca. 11 und 17 (2 Theta). Die  $\beta$ -Derivate besitzen ebenfalls wegen ihrer amorphen Eigenschaften keine scharfen Peaks, sondern nur ein Grundrauschen. Erhöhte Ausschläge findet man bei ca. 10 und 20 (2 Theta).

Um einen neu entstandenen Komplex identifizieren zu können, werden die physikalischen Mischungen aus Wirkstoff- und Cyclodextrinderivat im molaren Verhältnis 1,0:1,1 gegen den Komplex (molares Verhältnis 1,0:1,1) vermessen (Methode siehe Abschnitt 2.14.1-2.14.2). Das Spektrum der physikalischen Mischung setzt sich aus den Einzelspektren von Wirkstoff und Cyclodextrin zusammen (siehe Abbildung 3.22). Entsprechend findet man in der physikalischen Mischung die Peaks der Extraktinhaltsstoffe und die amorphen Kurven bzw. im Falle des kristallinen  $\gamma$ -Cyclodextrins die Peaks des Cyclodextrins. Eine Elimination der Peaks von Terminalia sericea Extrakt aus dem Röntgenspektrum beweist, dass ein Komplex mit den Cyclodextrinen entstanden sein muss, da eine Einlagerung der Wirkstoffe auf molekularer Ebene erfolgt ist.

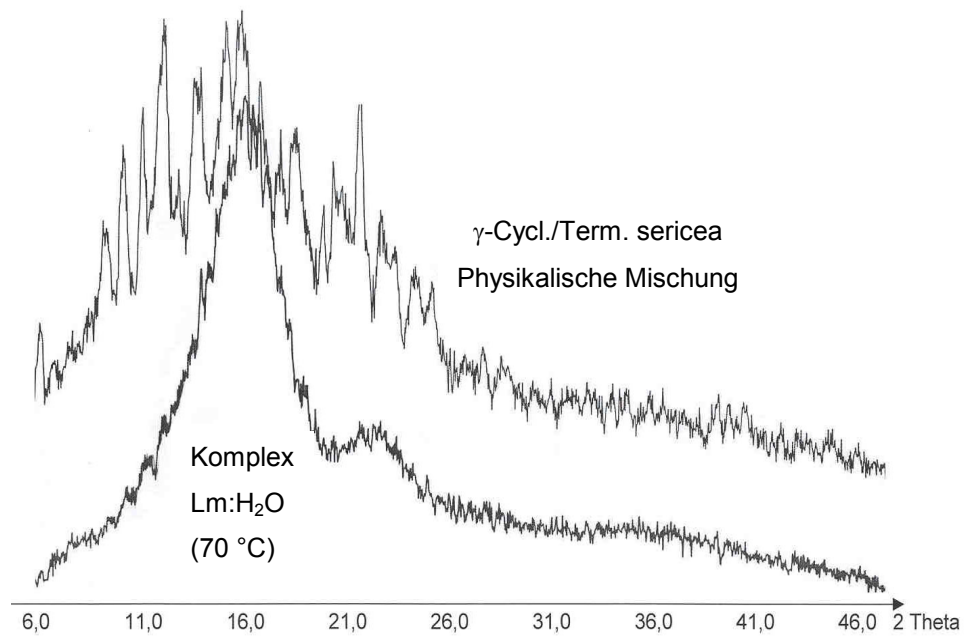


Abb.3.22.A:XRD-Spektren von Terminalia sericea Extrakt/ $\gamma$ -Cyclodextrinkomplex und der physikalischen Mischung

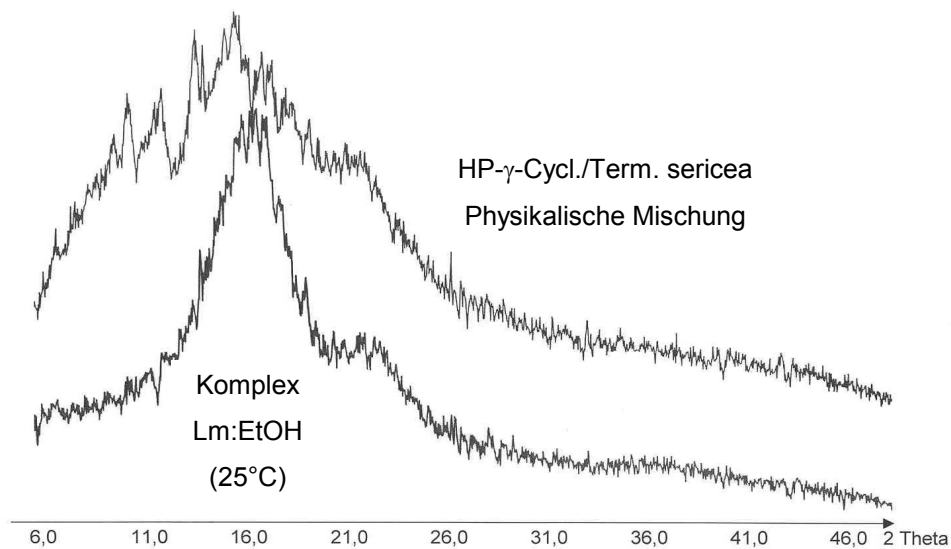


Abb.3.22.B:XRD-Spektren von Terminalia sericea Extrakt/HP- $\gamma$ -Cyclodextrinkomplex und der physikalischen Mischung



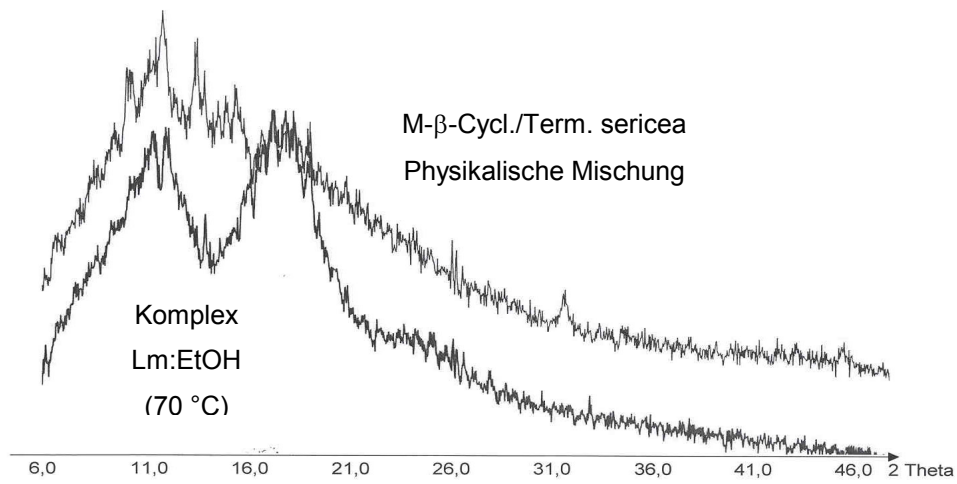


Abb.3.22.C:XRD-Spektren von Terminalia sericea Extrakt/M-β-Cyclodextrinkomplex und der physikalischen Mischung

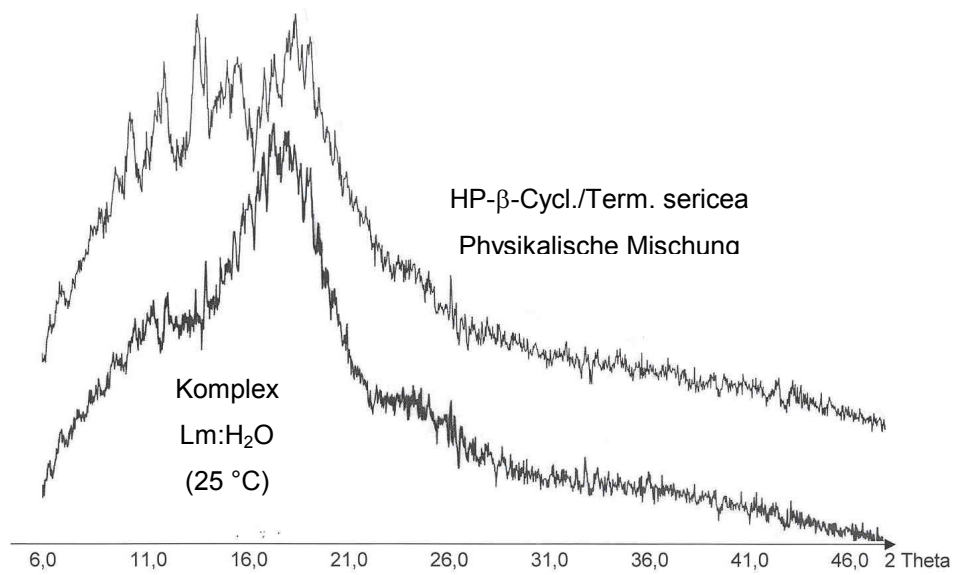


Abb.3.22.D:XRD-Spektren von Terminalia sericea Extrakt/HP-β-Cyclodextrinkomplex und der physikalischen Mischung

Bei den Komplexen in den Abbildungen 3.22 A-D sind die verwendeten Lösungsmittel (Wasser oder Ethanol) sowie die Equilibrierungstemperaturen (+25 °C oder +70 °C) mit angegeben. Die Spektren der Extrakt/Cyclodextrinderivate unterscheiden sich alle von den Spektren der dazugehörigen physikalischen Mischung durch verschwinden der Peaks der Extraktinhaltsstoffe bzw. durch das Auftreten einer Peakverschiebung. Die Spektren der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Derivate weisen nur ein amorphes Grundrauschen auf. Demnach hat eine Komplexierung zwischen Sericosid aus *Terminalia sericea* Extrakt und allen untersuchten Cyclodextrinderivaten stattgefunden. Erstaunlich ist, dass der Extrakt/ $\gamma$ -Cyclodextrinkomplex ebenfalls eine amorphe Kurve ohne Peaks liefert. Aufgrund der Kristallinität des  $\gamma$ -Cyclodextrins müssten im Spektrum Peaks zu sehen sein, die von den Peaks des *Terminalia sericea* Extraktes abweichen. Allerdings ist in Abbildung 3.22 A im Spektrum von  $\gamma$ -Cyclodextrin neben den Peaks im Bereich von 6-16 (2 Theta) auch ein amorpher Bereich von 26-46 (2 Theta) zu sehen. Dies deutet auf ein mit amorphen Bestandteilen verunreinigtes  $\gamma$ -Cyclodextrin hin. Dies könnte der Grund für das Fehlen der kristallinen Bereiche (Peaks) im Spektrum aus Abbildung 3.22 A sein. Die in verschiedenen Lösungsmitteln und bei unterschiedlichen Temperaturen gebildeten Komplexe eines Cyclodextrinderivates liefern identische Spektren. Die Komplexierung erfolgt demnach unter den durchgeführten Bedingungen unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel Wasser oder Ethanol (Spektren hier nicht gezeigt). Die bei der Equilibrierung verwendeten Temperaturen von +25 °C und +70 °C haben ebenfalls keine Auswirkungen auf die Komplexierung.

### 3.12.2 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Um eine vollständige Komplexierung von Sericosid mit Cyclodextrinderivaten mit einem weiteren Verfahren nachzuweisen, sind die Muster mittels DSC vermessen worden. Über die DSC lässt sich der Schmelzpunkt einer kristallinen Substanz bestimmen. Bei einem entstandenen Komplex, d.h. bei einer molekularen Einlagerung des Gastmoleküls in das amorphe Cyclodextrin, verschwindet der Schmelzpunkt des kristallinen Gastes in der DSC-Kurve. Tritt eine Verschiebung des Schmelzpunktes auf, hat entweder eine unvollständige Komplexierung stattgefunden

oder bei dem verwendeten Cyclodextrinderivat handelt es sich nicht um ein amorphes, sondern um ein kristallines Derivat. Die untersuchten Muster der Extrakt/Cyclodextrinkomplexe wurden nach Abschnitt 2.14.1 und 2.14.2 aufgearbeitet. Der Gelbholz-Extrakt und die Cyclodextrine lagen alle in Form von Pulvern vor und sind direkt ohne Aufarbeitung als Standards verwendet worden. Die Proben sind aus den gleichen Mustern entnommen worden, die auch für die Röntgendiffraktometrie (siehe Abschnitt 3.12.1) verwendet worden sind. Das Komplexierungsverhältnis Extrakt/Cyclodextrin beträgt 1,0:1,1.

### 3.12.2.1 Bestimmung der in den Proben enthaltenen Restfeuchte

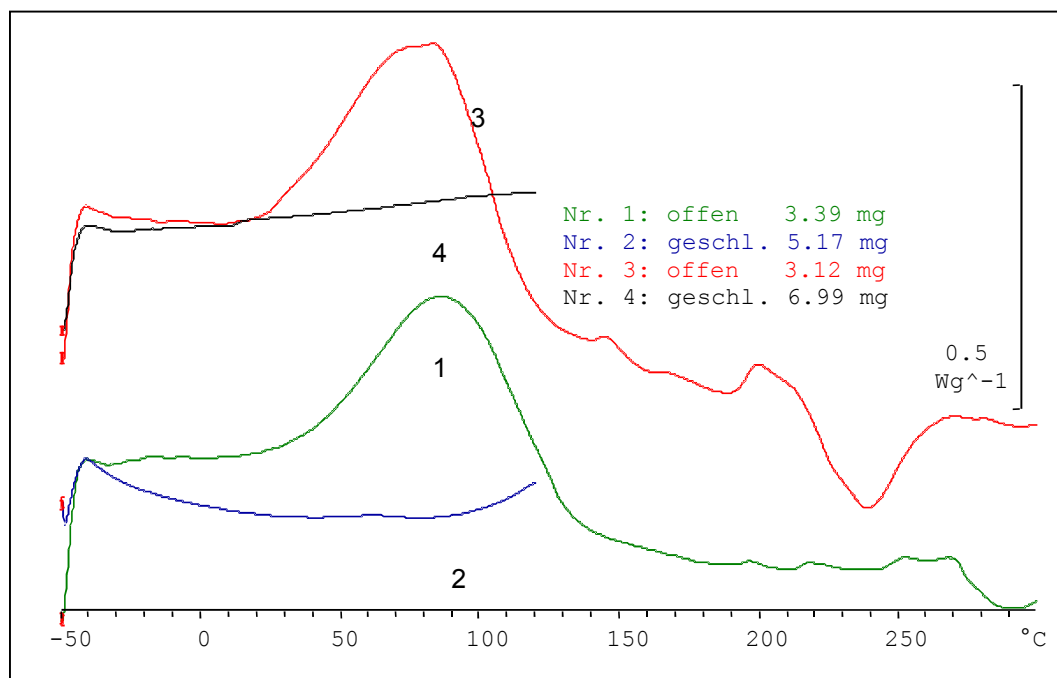


Abb.3.23:Enthalpieänderung (W/g) von Terminalia sericea Extrakt (Nr. 3 und Nr.4), sowie von Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin (Nr. 1 und Nr. 2) im Temperaturbereich von -50 °C bis +300 °C

Die Proben der Kurven Nr. 1 und Nr. 3 (Extrakt) sind im offenen Tiegel gemessen worden, die Proben der Kurven Nr. 2 und Nr. 4 (Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin) bei geschlossenem Tiegel. Der Temperatur-Messbereich betrug -50 °C bis +300 °C. Sowohl der Extrakt als auch das Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin zeigen bei den im offenen Tiegel gemessenen Mustern einen großen endothermen Peak zwischen +50 °C und +110 °C.

Dieser Peak ist sowohl bei den allen Ausgangsmaterialien (Extrakt und Cyclodextrine) als auch bei den komplexierten Proben zu sehen. Bei dem endothermen Peak bei +206 °C in Kurve Nr. 3 handelt es nach Informationen der Fa. Indena um den Schmelzpunkt von Sericosid aus Terminalia sericea Extrakt. Das HP- $\beta$ -Cyclodextrin (Kurve Nr. 1) zersetzt sich ab einer Temperatur von ca. +300 °C. Die DSC-Kurven der bei geschlossenen Tiegeln gemessenen Proben zeigen im Bereich von +50 °C bis +110 °C keinen Peak mehr, da bei geschlossenem Tiegel keine flüchtigen Substanzen wie z.B. Lösungsmittelreste entweichen können. Somit ändert sich die Enthalpie der Probe nicht, sofern nicht ein endothermer Vorgang aufgrund eines Schmelzens vorliegt. Bei dem endothermen Peak im Bereich von +50 °C bis +110 °C handelt es sich daher um Lösungsmittelrückstände der Komplexe bzw. Restfeuchten von Terminalia sericea Extrakt bzw. den Cyclodextrinen.

### 3.12.2.2 Identifizierung der Extrakt/Cyclodextrinkomplexe

#### Extrakt/ $\gamma$ -Cyclodextrinkomplexe

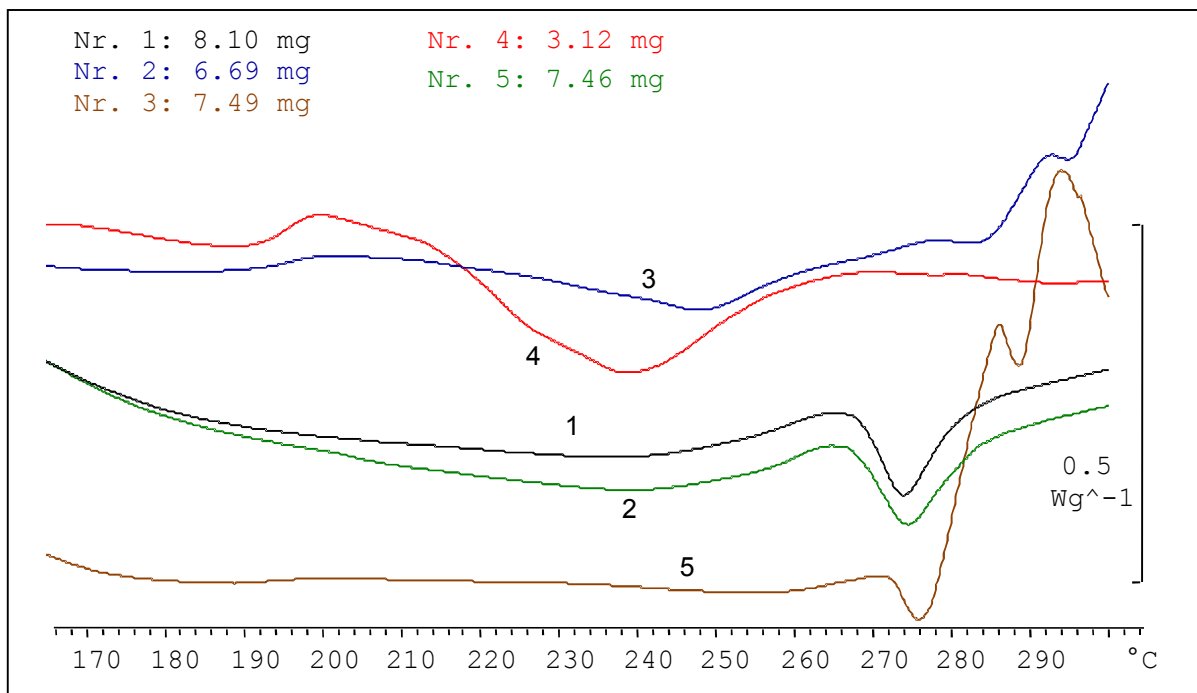


Abb.3.24:DSC-Kurven 1-5 von  $\gamma$ -Cyclodextrin und Terminalia sericea Extrakt einzeln, als physikalische Mischung oder als Komplex im Temperaturbereich von -50 °C bis +300 °C

Kurve Nr. 1:Komplex bei +70 °C mit Wasser als Lösungsmittel

Kurve Nr. 2:Komplex bei +25 °C mit Wasser als Lösungsmittel

Kurve Nr. 3:Physikalische Mischung Extrakt/ $\gamma$ -Cyclodextrin

Kurve Nr. 4:Terminalia sericea Extrakt

Kurve Nr. 5: $\gamma$ -Cyclodextrin

Die bei +25 °C und +70 °C komplexierten Proben wiesen nahezu identische Kurven auf (Nr. 1 und Nr. 2). Bei dem Terminalia sericea Extrakt (Kurve Nr. 4) ist ein leichter endothermer Peak bei ca. +206 °C erkennbar, der den Schmelzpunkt des Sericosids markiert. Bei der physikalischen Mischung ist ein geringes Schmelzen in diesem Bereich zu beobachten. Bei +206 °C ist bei den komplexierten Proben kein Schmelzen erkennbar. Bei ca. +265 °C ist ein breiter endothermer Umwandlungsbereich zu sehen, der auch beim  $\gamma$ -Cyclodextrin (Kurve Nr. 5) vorhanden ist. Dabei handelt es sich um den Schmelzpunkt des kristallinen  $\gamma$ -Cyclodextrins. Die Komplexe zersetzen sich bei +275 °C, das  $\gamma$ -Cyclodextrin zersetzt sich ebenfalls bei +275 °C. Da der Schmelzpunkt des Sericosids aus Terminalia sericea Extrakt bei +206 °C der komplexierten Proben in Kurve Nr. 1 und Nr. 2 nicht mehr vorhanden ist, hat eine Komplexierung von Sericosid und  $\gamma$ -Cyclodextrin stattgefunden. Bei dem endothermen Umwandlungsbereich bei +265 °C in den Kurven Nr. 1 und Nr. 2 wird es sich wahrscheinlich um den Schmelzpunkt des kristallinen  $\gamma$ -Cyclodextrins handeln. Ein Vorliegen geringer Mengen an freiem Sericosid, welches ebenfalls zu einer Verschiebung des Schmelzpunktes führen würde, kann jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden. Da das  $\gamma$ -Cyclodextrin selbst kristallin ist, muss ein Schmelzbereich zu sehen sein. Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse aus dem XRD-Spektrum aus Abbildung 3.22 A (Abschnitt 3.12.2.1). Das Spektrum zeigt einen amorphen Extrakt/ $\gamma$ -Cyclodextrinkomplex, der in der DSC keinen Schmelzbereich aufzeigen dürfte. Eine Erklärung liefert das verwendete  $\gamma$ -Cyclodextrin. Wie im XRD-Spektrum aus Abbildung 3.21 ersichtlich, enthält das verwendete  $\gamma$ -Cyclodextrin große Mengen an amorphen Zusätzen. Der scheinbar amorphe Extrakt/ $\gamma$ -Cyclodextrinkomplex im XRD-Spektrum ist auf das mit amorphen Stoffen verunreinigte  $\gamma$ -Cyclodextrin zurückzuführen.

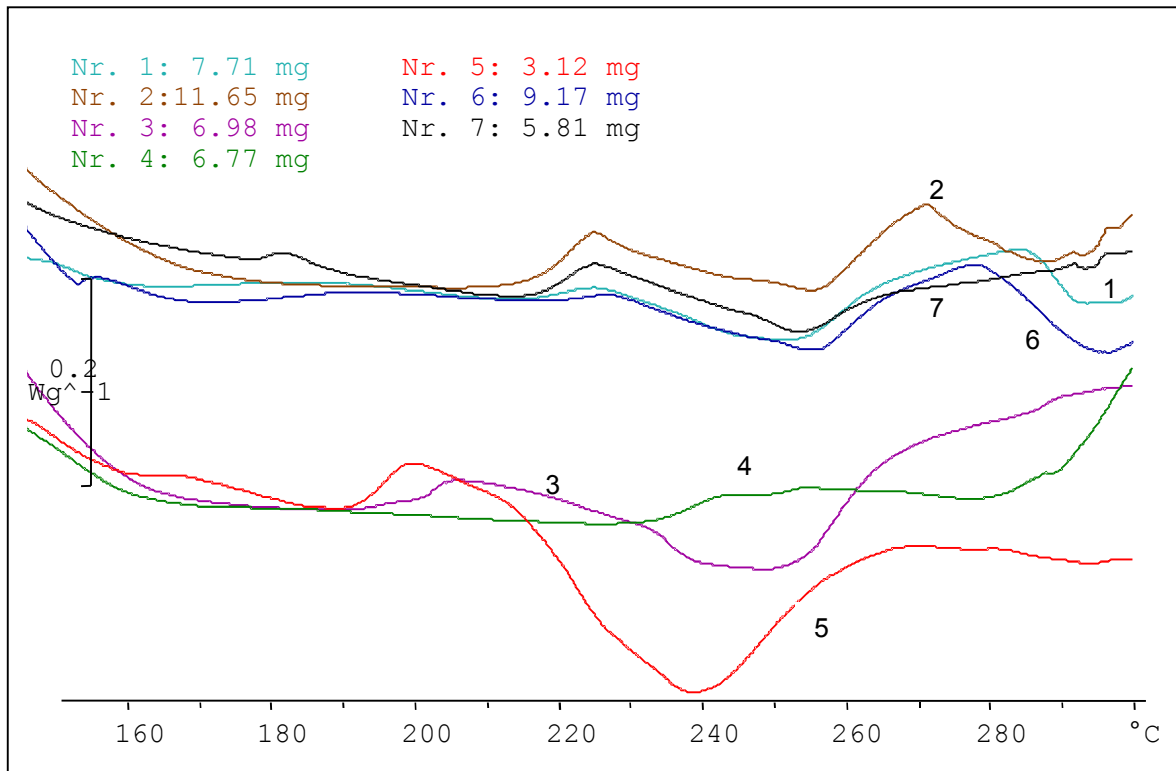
Extrakt/HP- $\gamma$ -Cyclodextrinkomplexe

Abb.3.25:DSC-Kurven 1-7 von HP- $\gamma$ -Cyclodextrin und *Terminalia sericea* Extrakt einzeln, als physikalische Mischung oder als Komplex im Temperaturbereich von  $-50\text{ °C}$  bis  $+300\text{ °C}$

Kurve Nr. 1:Komplex bei  $+70\text{ °C}$  mit Ethanol als Lösungsmittel

Kurve Nr. 2:Komplex bei  $+70\text{ °C}$  mit Wasser als Lösungsmittel

Kurve Nr. 3:Physikalische Mischung

Kurve Nr. 4:HP- $\gamma$ -Cyclodextrin

Kurve Nr. 5:*Terminalia sericea* Extrakt

Kurve Nr. 6:Komplex bei  $+25\text{ °C}$  mit Ethanol als Lösungsmittel

Kurve Nr. 7:Komplex bei  $+25\text{ °C}$  mit Wasser als Lösungsmittel

In den Kurven Nr. 3 und Nr.5 (Extrakt und physikalische Mischung) ist bei  $+202\text{ °C}$  bis  $+206\text{ °C}$  ein endothermer Peak zu erkennen, der auf das Schmelzen des Sericosids zurückzuführen ist. Das amorphe HP- $\gamma$ -Cyclodextrin zeigt kein Schmelzverhalten. Es zersetzt sich ab ca.  $+280\text{ °C}$ . Die Kurven der komplexierten Muster sind untereinander nahezu identisch. Bei  $+206\text{ °C}$  ist kein endothermer Peak zu beobachten, wohl aber bei ca.  $+225\text{ °C}$ .

Dies bedeutet, dass durch die eingetretene Schmelzpunktverschiebung geringe Mengen an freiem, nicht komplexiertem Sericosid aus Terminalia sericea Extrakt in den Proben vorhanden sind. Da mittels XRD-Spektrum (Abbildung 3.22 B, Abschnitt 3.12.2.1) kein freies Sericosid nachgewiesen werden konnte, dürfte der unkomplezierte Anteil an Sericosid in der Probe auf Grund der Genauigkeit der XRD-Methode unter 5 % liegen.

### Extrakt/M- $\beta$ -Cyclodextrinkomplexe

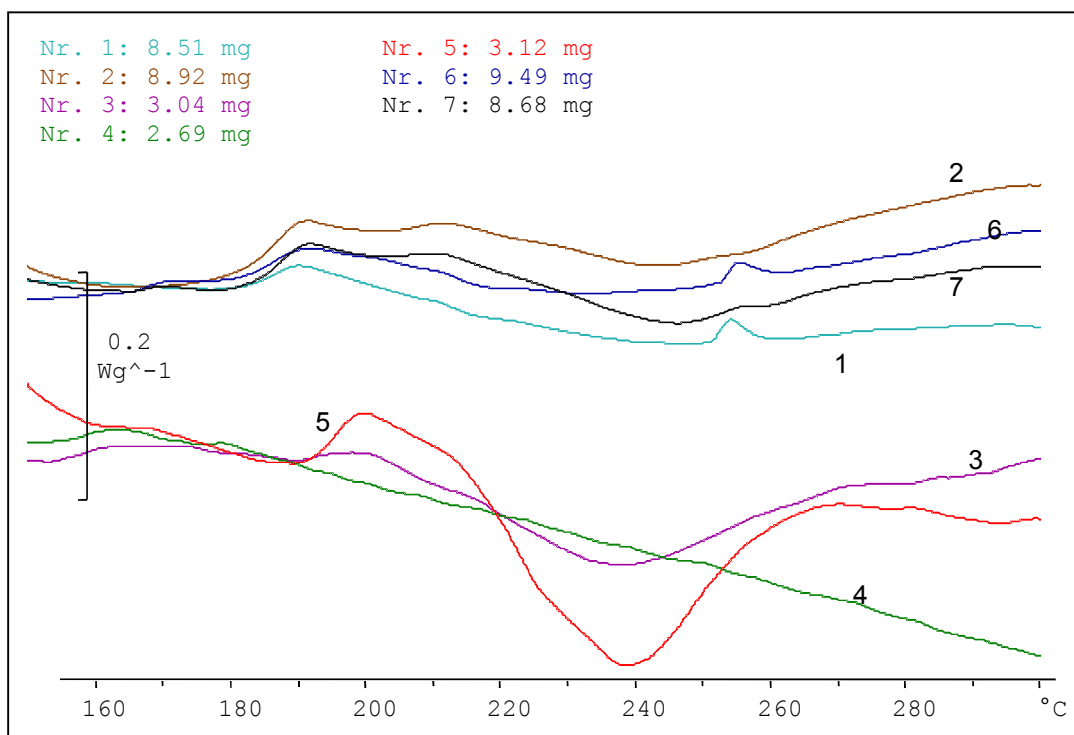


Abb.3.26:DSC-Kurven 1-7 von M- $\beta$ -Cyclodextrin und Terminalia sericea Extrakt einzeln, als physikalische Mischung oder als Komplex im Temperaturbereich von  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis  $+300\text{ }^{\circ}\text{C}$

Kurve Nr. 1:Komplex bei  $+70\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit Ethanol als Lösungsmittel

Kurve Nr. 2:Komplex bei  $+70\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit Wasser als Lösungsmittel

Kurve Nr. 3:Physikalische Mischung

Kurve Nr. 4:M- $\beta$ -Cyclodextrin

Kurve Nr. 5:Terminalia sericea Extrakt

Kurve Nr. 6:Komplex bei  $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit Ethanol als Lösungsmittel

Kurve Nr. 7:Komplex bei  $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit Wasser als Lösungsmittel

Der Extrakt (Probe Nr. 5) und die physikalische Mischung (Probe Nr. 3) besitzen bei +206 °C einen Peak, der den Schmelzpunkt des Sericosids markiert. Alle komplexierten Muster weisen bei +190 °C einen endothermen Peak auf. Da bei allen mit M- $\beta$ -Cyclodextrin komplexierten Proben eine Schmelzpunktverschiebung von +206 °C zu +190 °C stattgefunden hat, hat eine unvollständige Komplexierung zwischen Sericosid und Cyclodextrin stattgefunden. Da das XRD-Spektrum (Abbildung 3.22 C in Abschnitt 3.12.2.1) eine amorphe Verbindung zeigt, muss der Anteil des unkomplexierten Sericosids unter 5 % liegen. Die Proben der Kurven Nr. 2 und Nr. 7, bei denen Ethanol als Lösungsmittel verwendet worden ist, besitzen bei ca. +255 °C einen weiteren Peak, der einen endothermen Vorgang anzeigt. Bei den mit Wasser equilibrierten Proben ist ein breiter endothermer Umwandlungsbereich bei ca. +210 °C zu erkennen.

### Extrakt/HP- $\beta$ -Cyclodextrinkomplexe

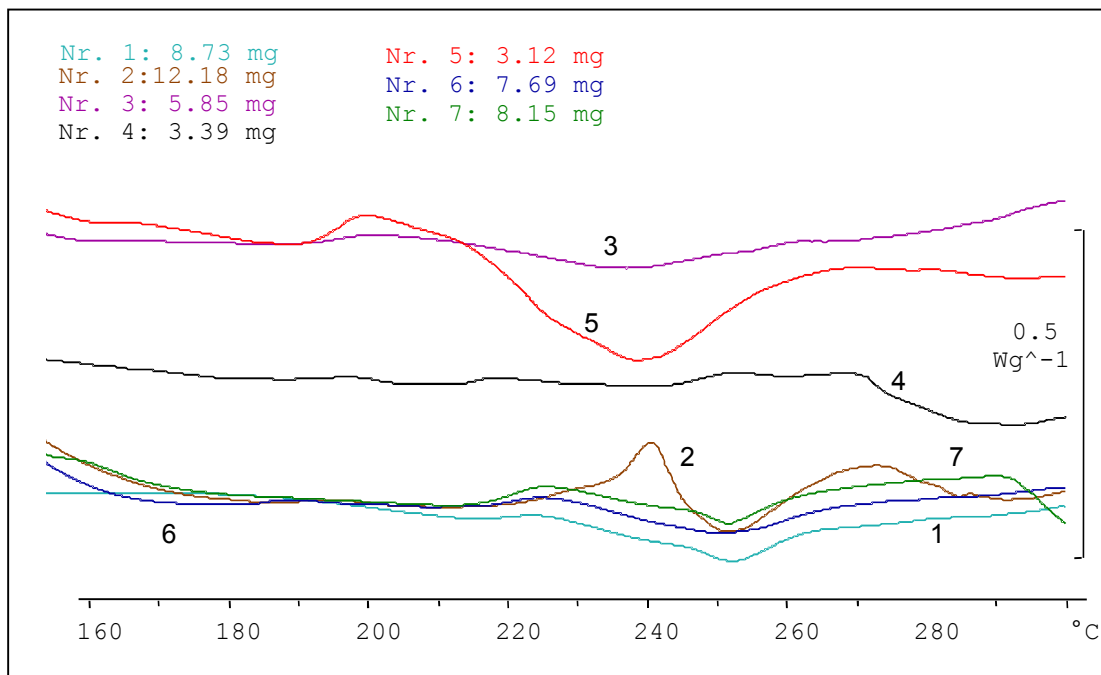


Abb.3.27:DSC-Kurven 1-6 von HP- $\beta$ -Cyclodextrin und Terminalia sericea Extrakt einzeln, als physikalische Mischung oder als Komplex im Temperaturbereich von -50 °C bis +300 °C



Kurve Nr. 1:Komplex bei +70 °C mit Ethanol als Lösungsmittel

Kurve Nr. 2:Komplex bei +70 °C mit Wasser als Lösungsmittel

Kurve Nr. 3:Physikalische Mischung

Kurve Nr. 4:Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin

Kurve Nr. 5:Komplex bei +25 °C mit Ethanol als Lösungsmittel

Kurve Nr. 6:Komplex bei +25 °C mit Wasser als Lösungsmittel

Bei dem Terminalia sericea Extrakt und der physikalischen Mischung ist bei +206 °C ein endothermer Peak zu erkennen, der wiederum den Schmelzpunkt des Sericosids angibt. Das HP- $\beta$ -Cyclodextrin besitzt bei +206 °C keinen Schmelzpunkt. Die Komplexe zersetzen sich bei ca. +250 °C. Alle komplexierten Proben (Nr. 1, 2, 5, 6) besitzen bei ca. 225 °C einen endothermen Umwandlungsbereich. Die Schmelzpunktverschiebung von +206 °C auf +225 °C zeigt eine unvollständige Komplexierung des Sericosids mit HP- $\beta$ -Cyclodextrin an. Da das XRD-Spektrum (Abbildung 3.22 D in Abschnitt 3.12.2.1) eine amorphe Struktur aufweist, dürfte der Anteil an unkomplexierten Sericosid nicht über 5 % liegen, da ab dieser Größenordnung Verunreinigungen im XRD-Spektrum sichtbar wären. Der Komplex bei +70 °C und Wasser als Lösungsmittel weicht leicht von den anderen Extrakt/Cyclodextrinkomplexen ab, da bei ca. +240 °C eine endotherme Umwandlung stattfindet.

Bei allen komplexierten Proben von Terminalia sericea Extrakt mit den 4 untersuchten Cyclodextrinderivaten hat eine Verschiebung des Schmelzpunktes der Komplexe gegenüber dem Schmelzpunkt des Extraktes und der physikalischen Mischung stattgefunden. Die Schmelzpunktverschiebung bei den substituierten (amorphen) Cyclodextrinderivaten weisen auf ein Vorliegen geringer Mengen von unkomplexierten Sericosid hin. Beim kristallinen  $\gamma$ -Cyclodextrin dagegen kann die Schmelzpunktverschiebung sowohl eine Komplexbildung als auch das Vorliegen geringer Mengen an unkomplexierten Sericosid anzeigen. Die Muster mit der physikalischen Mischung zeigen im Gegensatz zum Extrakt bei +206 °C nur einen geringen endothermen Umwandlungsbereich. Durch das molare Komplexierungsverhältnis von Extrakt:Cyclodextrin von 1,0:1,1 in der physikalischen Mischung entfallen ca. 67 % der Einwaage auf das Cyclodextrin und nur 33 % auf das Sericosid, d.h. dass bei +206 °C nur ein Drittel der sich in der Einwaage befindlichen Masse schmelzen kann. Folglich wird ein endothermer Vorgang bei ähnlicher Einwaage der Probe mit einer geringeren Intensität angezeigt. Der Schmelzpunkt des entstandenen Komplexes muss in der DSC-Kurve nicht unbedingt von der des unkomplexierten Sericosids

abweichen. Die Schmelzpunktverschiebung zwischen den Proben, die mit Ethanol oder Wasser equilibriert wurden, sind unter den gewählten Herstellungsparametern nicht festgestellt worden. Das Komplexierungsverhalten wird durch die Temperatur im untersuchten Bereich ebenfalls nicht beeinflusst.

### 3.12.3 Thermogravimetrie (TGA)

Zur Unterstützung der Interpretation auf den Grundlagen der aus der DSC gewonnenen Daten ist zusätzlich eine thermogravimetrische Bestimmung durchgeführt worden. Ziel war es, den Anteil der noch in den Proben enthaltenen flüchtigen Anteile zu bestimmen. Ferner sollte herausgefunden werden, ob ein Zusammenhang zwischen flüchtigen Anteilen und verwendetem Lösungsmittel besteht. Der Übersichtlichkeit halber werden nur die +70 °C Muster der Terminalia sericea Extrakt/HP- $\gamma$ -Cyclodextrinkomplexe sowie der Extrakt/M- $\beta$ -Cyclodextrinkomplexe gezeigt.

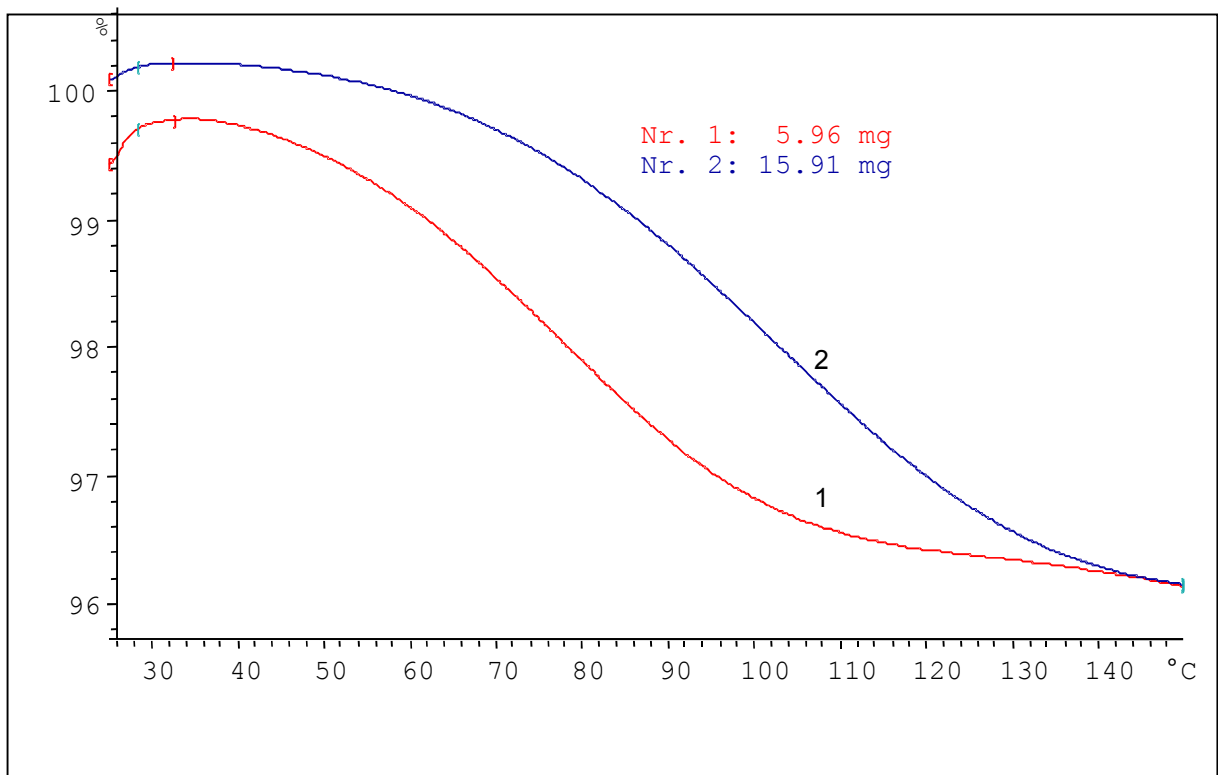


Abb.3.28:TGA-Kurven der mit unterschiedlichen Lösungsmitteln hergestellten Extrakt/HP- $\gamma$ -Cyclodextrinkomplexe

Bei Probe Nr. 1 ist als Lösungsmittel Ethanol, bei Probe Nr. 2 Wasser verwendet worden. Die Komplexierung erfolgte bei einer Temperatur von +70 °C. Probe Nr. 1 besitzt 3,6 % flüchtige Anteile, Probe Nr. 2 besitzt 4 % flüchtige Anteile.

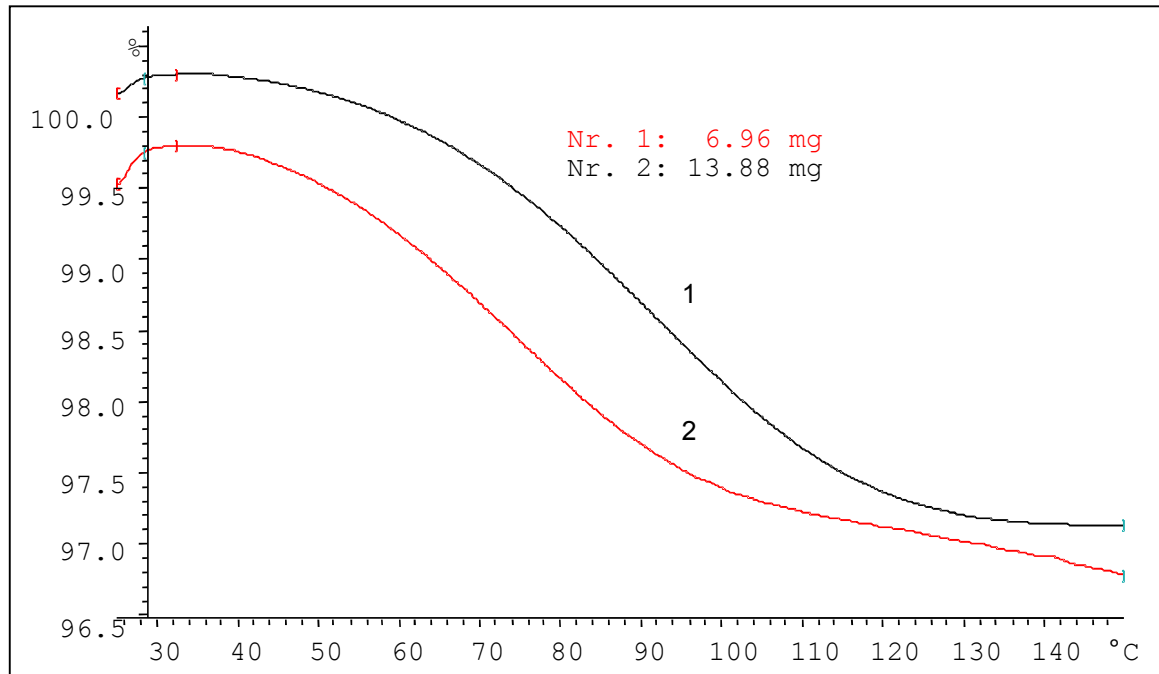


Abb.3.29:TGA-Kurven der mit unterschiedlichen Lösungsmitteln hergestellten Extrakt/M- $\beta$ -Cyclodextrinkomplexe

Die Komplexierung der Proben erfolgte bei Nr. 1 und Nr. 2 bei einer Temperatur von +70 °C. Bei Probe Nr. 1 ist Ethanol, bei Probe Nr. 2 Wasser als Lösungsmittel verwendet worden. Die Probe Nr. 1 besitzt 3,2 %, Probe Nr.2 2,6 % flüchtige Anteile. Die Proben, die mit Ethanol als Lösungsmittel equilibriert worden sind, besitzen eine um durchschnittlich ca. 0,5 % geringere Anfangsmasse als die Proben, welche mit Wasser equilibriert worden sind. Beim Vergleich des Einflusses des Lösungsmittels auf die Komplexierung sind diese Beobachtungen auch bei den verbleibenden +70 °C, bzw. +25 °C Mustern sowie bei allen anderen Extrakt/Cyclodextrinkomplexen gemacht worden (Daten nicht gezeigt). Dieses Phänomen kann durch Verdampfen des Ethanols unmittelbar vor der Messung erklärt werden. Kurz vor der Messung wird der Tiegel per Autosampler angestoßen und die Proben anschließend vermessen. Dabei verdampft Lösungsmittel in der Zeit zwischen dem Anstecken der Probe und der Messung der Probe, da diese zuerst über einen Greifarm in die Messkammer gelegt werden muss.

Das in dieser kurzen Zeit abgedampfte Lösungsmittel ist für den Massenverlust zu Beginn der Messung verantwortlich. Die Proben der HP- $\beta$ -Cyclodextrinkomplexe und der  $\gamma$ -Cyclodextrinkomplexe (Daten nicht gezeigt) enthalten ebenfalls flüchtige Anteile im Bereich von 4,0 %-8,0 %. Flüchtige Anteile unter 4,3 % und über 120 °C sind nicht gemessen worden. Neben den mit Lösungsmittel hergestellten Mustern zeigen auch die physikalischen Mischungen und die einzelnen Ausgangssubstanzen flüchtige Anteile im Bereich von 4 % bis 8 %. Die Herstellung in Lösungsmitteln hat demnach keinen bedeutenden Einfluss auf die Gesamtrestfeuchte der Proben. Eine Tendenz zu geringeren Restfeuchtegehalten bei den Ausgangssubstanzen kann nicht festgestellt werden.

#### **3.12.4 MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation Time Of Flight Mass Spectrometry)**

Ziel der Untersuchungen war es, den entstandenen Extrakt/Cyclodextrinkomplex über das Molekulargewicht erfassen zu können und damit einen Nachweis zu erbringen, dass das Sericosid und das Arjunglucosid aus Terminalia sericea Extrakt mit den Cyclodextrinen einen Komplex eingehen. Der Komplex kann über LC/MS nicht erfasst werden, da in der Säule eine Zerstörung des Komplexes stattfindet.

Die MALDI-TOF hat sich als eine sehr schonende analytische Methode erwiesen, bei der selten eine Zerstörung der zu untersuchenden Verbindung beobachtet wird. Weiterhin ist der reine Terminalia sericea Extrakt auf evtl. vorhandene, noch nicht detektierte Verbindungen untersucht worden. Eine Aussage über die quantitative Zusammensetzung eines Vielstoffgemisches wie z.B. eines Extraktes ist über MALDI-TOF jedoch nicht machbar. Die MALDI-TOF lässt bislang nur qualitative oder halbquantitative Aussagen zu, da sich die Stärke der Peaks der detektierten Verbindungen nach der Polarisierbarkeit der Verbindungen richtet und nicht nach der Anzahl der vorhandenen Moleküle. Die Ergebnisse werden am Beispiel des Extrakt/ $\gamma$ -Cyclodextrinkomplexes dargestellt. Die Extrakt/ $\gamma$ -Cyclodextrinkomplex Probe ist bei +25 °C mit Wasser als Lösungsmittel hergestellt worden. Die absoluten Intensitäten (a.i.) sind gegen die Masse pro Ladung der Moleküle ( $m/z$ ) aufgetragen.

Eine Detektion des intakten Sericosid/Cyclodextrinkomplexes aus Terminalia sericea Extrakt ist auch mittels der MALDI-TOF nicht möglich (siehe Abbildung 3.30). Es tritt wie bei der Bestimmung mittels LC/MS eine Zerstörung des Komplexes ein.

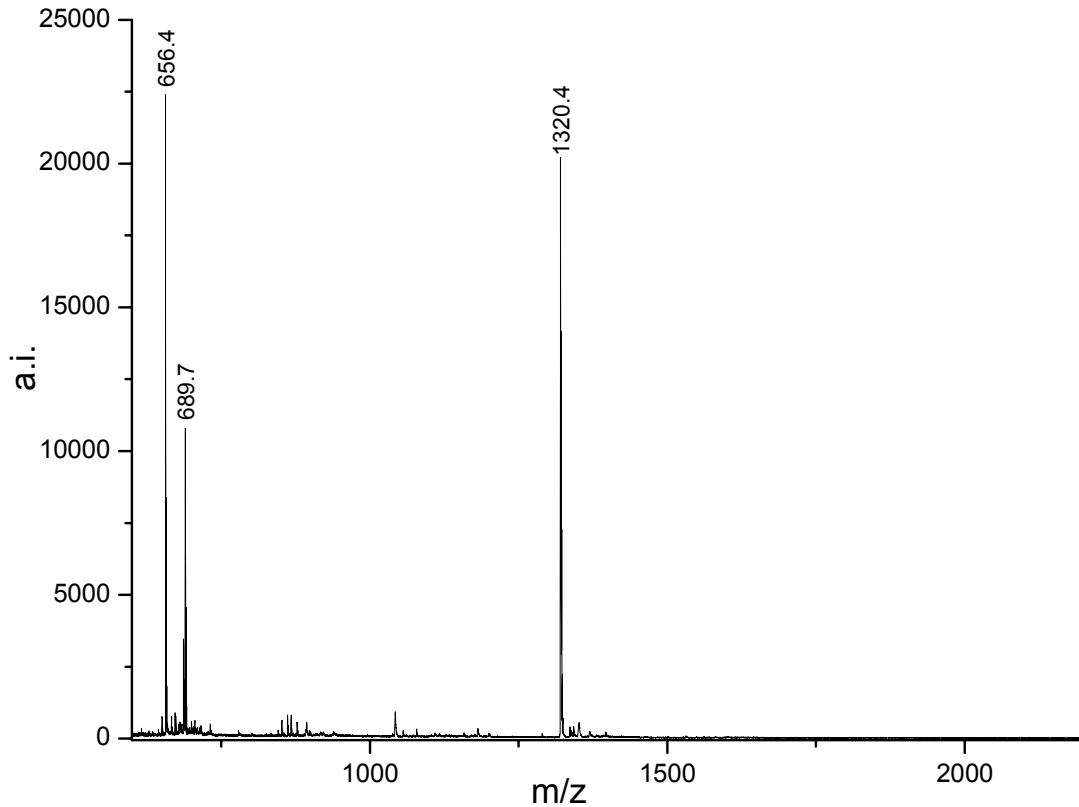


Abb.3.30: MALDI-TOF Spektrum des Extrakt/ $\gamma$ -Cyclodextrinkomplexes von 600 m/z-2200 m/z

Ein Sericosid/ $\gamma$ -Cyclodextrinkomplex bzw. ein Arjunglucosid/ $\gamma$ -Cyclodextrinkomplex müsste einen Peak bei einer Masse/Ladung von 1987 m/z enthalten. Dieser war im Spektrum aber nicht auszumachen. Die Komplexe der anderen Cyclodextrinderivate (HP- $\beta$ , M- $\beta$ , HP- $\gamma$ ) lassen sich ebenfalls nicht detektieren (Daten nicht gezeigt). Beim Extrakt/ $\gamma$ -Cyclodextrinkomplex waren nur im Bereich von 400-1400 m/z Peaks zu finden (siehe Abbildung 3.31).

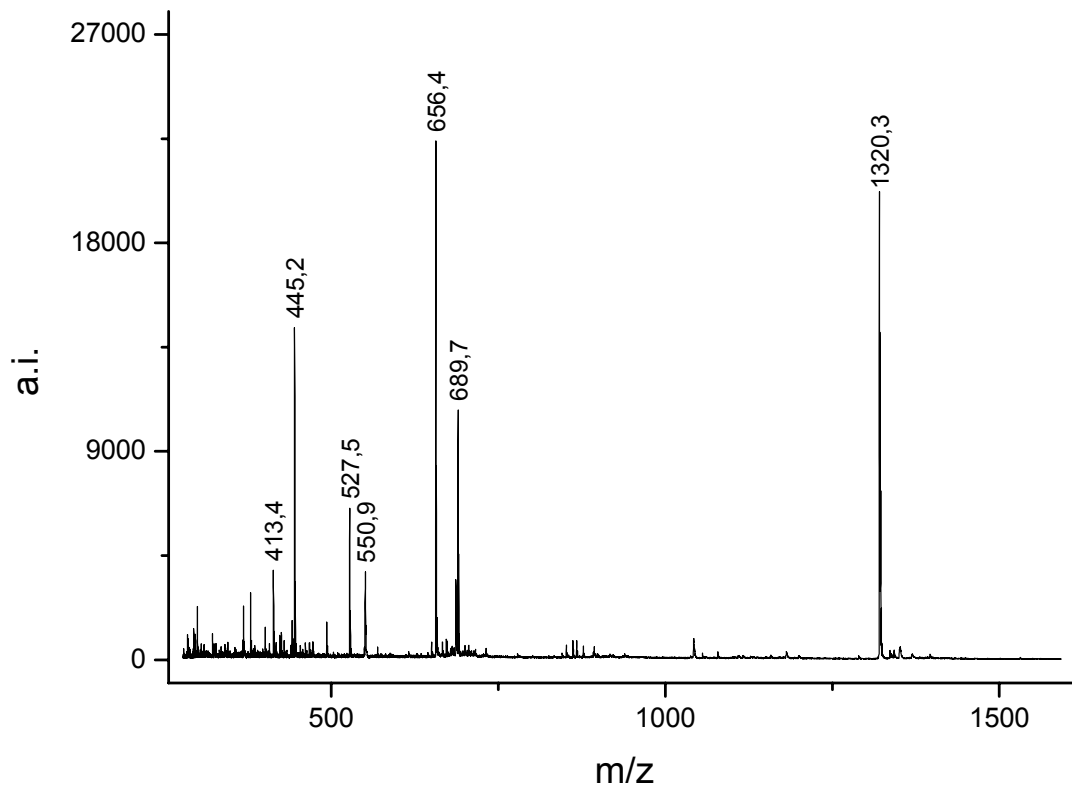


Abb.3.31: MALDI-TOF Spektrum des Extrakt/ $\gamma$ -Cyclodextrinkomplexes im Bereich von 400-1500 m/z

Allerdings ist es möglich, einigen im Spektrum in Abbildung 3.31 detektierten Massen Inhaltsstoffe aus *Terminalia sericea* Extrakte zuzuordnen.

Tab.3.25: Zuordnung einiger im MALDI-TOF Spektrum enthaltener Peaks zu den in Terminalia sericea Extrakt/ $\gamma$ -Cyclodextrinkomplex enthaltenen Inhaltsstoffen

<i>m/z</i>	<i>Zusammensetzung Komplex</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Bemerkungen</i>
1320,3	[M + Na <sup>+</sup> ]	$\gamma$ - Cyclodextrin	MG:1297 + 23 g/mol
689,7	[M + Na <sup>+</sup> ]	Sericosid	MG:667 + 23 g/mol
527,5	[M + Na <sup>+</sup> ]	Sericinsäure (Aglycon des Sericosids)	MG:504 + 23 g/mol Isomer: Arjungenin
550,9	[M + 2Na <sup>+</sup> ]		Dinatrium-Addukt von Sericinsäure
656,4; 445,2; 413,4		4- Hydroxy- $\alpha$ -Zimtsäure	Matrix

Auf der Suche nach evtl. noch bisher unbekanntem im Terminalia sericea Extrakt enthaltenen Verbindungen ist die Probe im Bereich von 800 m/z-1000 m/z aufgeschlüsselt worden, da nach Betrachtung des vergrößerten Spektrums relevante Peaks zu erkennen waren. Diese sind in Abbildung 3.32 dargestellt.

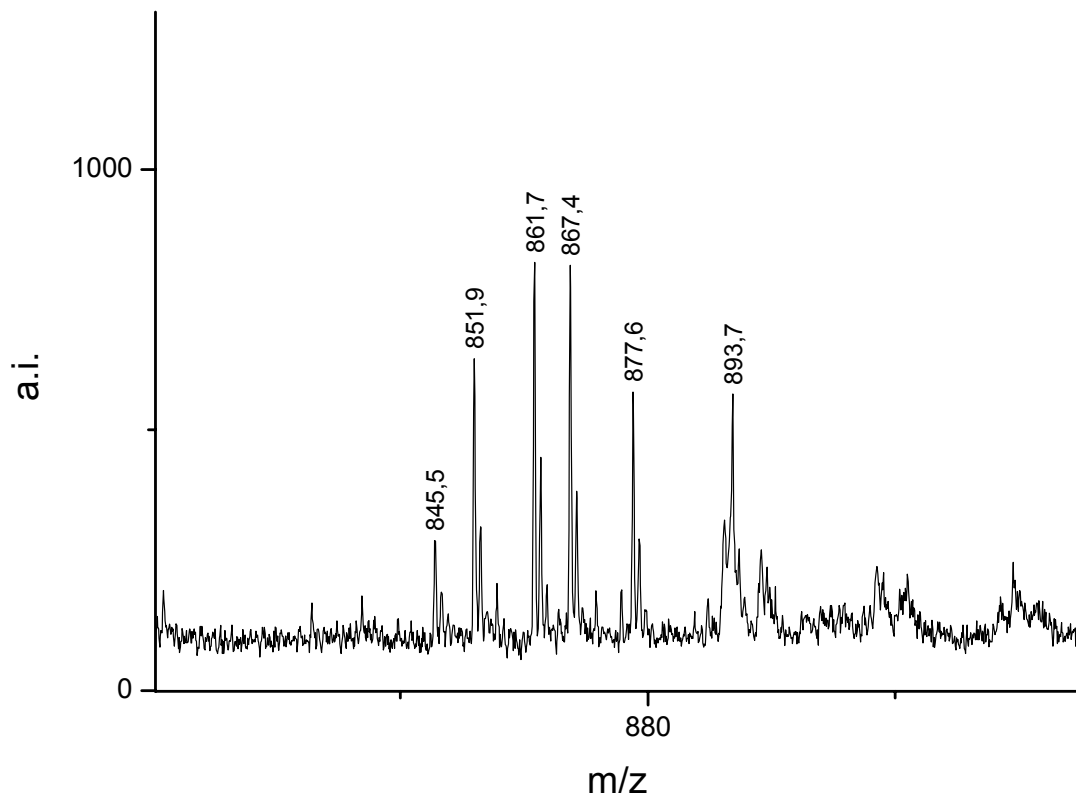


Abb.3.32:Ausschnitt aus dem Extrakt/ $\gamma$ -Cyclodextrin Spektrum im Bereich von ca. 800 m/z-1000 m/z

Bei den Massen von m/z 845,5 und 867,4 handelt es sich um die 4-Hydroxy- $\alpha$ -Zimtsäure (Matrix). Bei den Peaks mit einer Masse pro Ladung (m/z) von 851,9; 861,7; 877,6 und 893,7 könnte es sich um weitere, bisher nicht bekannt Verbindungen im Terminalia sericea Extrakt handeln. Diese könnten ebenfalls auf Grund ihrer ähnlichen Polarität mit Cyclodextrinen Komplexe bilden und hätten ebenfalls, wie in Abschnitt 3.11.2.3 am Arjunglucosid nachgewiesen, einen Einfluss auf die Berechnungen der molaren Komplexierungsverhältnisse sowie die Komplexbildungskonstanten von Sericosid.



### 3.13 Penetration am Schweinehautmodell

#### 3.13.1 Penetration des Sericosid/ $\gamma$ -Cyclodextrinkomplexes

In Abschnitt 3.7.2 ist auf die Penetration von Sericosid aus Terminalia sericea Extrakt aus der 5% igen ethanolischen O/W Emulsion eingegangen worden. Die Penetration des Sericosids in die Hautschichten war mit 26 % unbefriedigend gewesen. Ziel sollte es nun sein, neben der Löslichkeitsverbesserung des Sericosids auch zu prüfen, ob durch die Komplexierung mit Cyclodextrinen die Penetration des Sericosids erhöht werden kann. Wegen der Fähigkeit der  $\gamma$ -Cyclodextrinderivate, die Löslichkeit von Terminalia sericea Extrakt zu erhöhen und nach Einarbeitung in die Emulsionen eine Rekristallisation zu unterdrücken, sind zwei Penetrationsstudien mit Extrakt/ $\gamma$ -Cyclodextrinkomplex im molaren Verhältnis von 1,0:1,25 und 1,0:2,5 durchgeführt worden. Die Konzentration an Extrakt beträgt wie bei der Penetrationmessung aus der ethanolischen Formulierung (Abschnitt 3.7.2) 0,25 %. Dies entspricht einem Sericosidgehalt von 0,22 %. Die O/W Grundlage entspricht der verwendeten ethanolischen Formulierung aus Abschnitt 3.7.2, jedoch ohne Alkoholzusatz. Der Massenanteil des Ethanolis ist durch Cyclodextrin und Wasser ausgeglichen worden.

Tab.3.26: Mittelwerte und Standardabweichungen der Penetrationmessung der ethanolhaltigen O/W Emulsion (Emulsion A) aus Abschnitt 3.7.2

<i>Sericosid</i> ( <i>Emulsion A</i> )	<i>X</i>	<i>Sx</i>	<i>Srel</i>
WFR (%)	93,4		
Oberfläche	67,7	3,3	4,9
Hornschicht	24,3	4,1	16,8
Epidermis	1,1	0,4	35,8
Dermis	0,3	0,1	44,2
Rezeptorphase	n.n.		

Ca. 68 % des wiedergefundenen Sericosids verbleiben an der Oberfläche der Schweinehaut in der Emulsion (Oberfläche) und penetrieren somit nicht in die Haut. Unter Einbeziehung der Wiederfindungsrate (ca. 93 %) addiert sich der nicht penetrierende Anteil auf ca. 75 % der ursprünglich eingesetzten Menge an Sericosid. Die Penetrationsergebnisse der unkomplexierten Formulierung (Emulsion A) sind bereits ausführlich in Abschnitt 3.7.2 diskutiert worden. Die Daten der mit  $\gamma$ -Cyclodextrin komplexierten Emulsionen sind in Tabelle 3.15 (Emulsion B, molares Verhältnis 1:1,25) und 3.26 (Emulsion C, molares Verhältnis 1:2,5) dargestellt.

Tab.3.27: Verteilung von Sericosid in den untersuchten Hautschichten von zwei Schweinehäuten (Probe 1 und Probe 2) bei einem molaren Komplexierungsverhältnis Extrakt/ $\gamma$ -Cyclodextrin von 1,0:1,25

<i>Sericosid</i> ( <i>Emulsion B</i> )	<i>Schweine-</i> <i>haut 1</i> ( <i>Probe 1</i> )	<i>Schweine-</i> <i>haut 2</i> ( <i>Probe 2</i> )	X	Sx	Srel
Gehalt (%) Extrakt in Emulsion	0,25	0,25			
Gehalt (%) Sericosid	0,23	0,23			
Einwaage Emulsion (mg)	23,06	23,68			
Sericosidgehalt, theoretisch ( $\mu$ g)	53,94	55,39			
Sericosidgehalt, gefunden ( $\mu$ g)	54,96	48,72			
<b>WFR Sericosidgehalt (%)</b>	<b>101,89</b>	<b>87,96</b>			
Deckel (5 ml)	0,0	0,0	--	--	--
Oberfläche (20 ml)	25,8	28,1	26,9	1,6	6,0
Hornschicht (4 ml)	66,8	54,5	60,6	8,7	14,4
Epidermis (4 ml)	7,9	4,6	6,3	2,3	37,3
Dermis (5 ml)	1,4	n.	--	--	--
Rezeptorphase (6 ml)	n.	n.	--	--	--

Das molare Komplexierungsverhältnis von Sericosid/ $\gamma$ -Cyclodextrin beträgt 1,0:1,25. Angegeben ist die Wiederfindungsrate von Sericosid (%), die in der entsprechenden Menge an Extraktionsmittel (ml) gefunden worden ist. Nach Einarbeitung von 0,25 % Terminalia sericea Extrakt in die O/W Emulsion wurde ein Sericosidgehalt von 0,23 % ermittelt.

Die Wiederfindung des Sericosids in den einzelnen Hautschichten beträgt im Vergleich zum gemessenen Ausgangsgehalt in der Formulierung bei der Schweinehaut Nr. 1 101,9 %, bei Schweinehaut Nr. 2 88,0 %. 60,6 % des Sericosid finden sich in der Hornschicht wieder. 26,9 % Verleiben an der Oberfläche, d.h. in der Emulsion zurück und penetrieren somit nicht in die Haut. In der Epidermis können noch 6,3 % an Sericosid nachgewiesen werden. Der Rest verteilt sich auf die Dermis (1,4 % bei Probe 1) und die Rezeptorphase.

Tab.3.28: Verteilung von Sericosid in den untersuchten Hautschichten von zwei Schweinehäuten (Probe 1 und Probe 2) bei einem molaren Komplexierungsverhältnis Extrakt/ $\gamma$ -Cyclodextrin von 1,0:2,5

<i>Sericosid</i> (Emulsion C)	Schweine- haut 3 (Probe 3)	Schweine- haut 4 (Probe 4)	X	Sx	Srel
Gehalt (%) Extrakt in Emulsion	0,25	0,25			
Gehalt (%) Sericosid	0,23	0,23			
Einwaage Emulsion (mg)	22,77	22,42			
Sericosidgehalt, theoretisch ( $\mu$ g)	53,03	52,21			
Sericosidgehalt gefunden ( $\mu$ g)	53,74	48,14			
<b>WFR Sericosidgehalt(%)</b>	<b>101,34</b>	<b>92,20</b>			
Deckel (5 ml)	0,0	n.	--	--	--
Oberfläche (20 ml)	45,6	21,6	33,6	17,0	50,7
Hornschicht (4 ml)	52,6	65,3	59,0	9,0	15,2
Epidermis (4 ml)	2,0	4,3	3,2	1,6	49,6
Dermis (5 ml)	n.	n.	--	--	--
Rezeptorphase (6 ml)	n.	n.	--	--	--

Das molare Komplexierungsverhältnis von Sericosid/ $\gamma$ -Cyclodextrin beträgt 1,0:2,5. Angegeben ist die Wiederfindungsrate von Sericosid (%), die in der entsprechenden Menge an Extraktionsmittel (ml) gefunden worden ist.

Der Gehalt an Sericosid in der Emulsion beträgt 0,23 % bei einem Terminalia sericea Extrakt Gehalt von 0,25 %.

In Schweinehaut Nr. 3 (Probe 3) werden nach Addition der Wiederfindungsraten an der Oberfläche und in den einzelnen Hautschichten 101 % des anfangs in der Emulsion vorhandenen Sericosids wiedergefunden, in Schweinehaut 4 (Probe 4) nur 92 %. 33,6 % des wiedergefundenen Sericosids penetrieren nicht in die Haut, verbleiben also in der Emulsion (Oberfläche). In der Hornschicht findet sich mit 58,9 % der größte Teil des penetrierenden Sericosids wieder. In der Rezeptorphase konnte kein Sericosid mehr nachgewiesen werden. In der Epidermis finden sich durchschnittlich 3,2 % des Wirkstoffes wieder, in der Dermis konnten nur noch Spuren (0,01% bei Probe 4) nachgewiesen werden. Der Anteil an Sericosid, der in die Haut penetriert, errechnet sich durch Addition der Wiederfindungsraten von Sericosid aus der Hornschicht, der Epidermis, der Dermis sowie der Rezeptorphase. Das komplexierte Sericosid in den Emulsionen B und C penetriert demnach durchschnittlich zu 66,9 % (Emulsion B) und 62,2 % (Emulsion C) in die Haut, bei der ethanolhaltigen Emulsion A sind dies nur 25 % (siehe Tabelle 3.26, 3.27 und 3.28). Damit penetriert das Sericosid aus dem Sericosid/Cyclodextrinkomplex um den Faktor 2,5-2,7 besser in die Haut als das nicht komplexierte Sericosid aus der alkoholischen Formulierung. Die Penetration ändert sich nicht, wenn das molare Komplexierungsverhältnis von 1,0:1,25 auf 1,0:2,5 angehoben wird. Die prozentuale Verteilung des Sericosids in den einzelnen Hautschichten aus den komplexierten Formulierungen ändert sich im Vergleich mit der ethanolhaltigen Formulierung nicht. Dies stützt die These nach [144], wonach das  $\gamma$ -Cyclodextrin die Hautbarriere nicht direkt beeinflusst, sondern durch eine erhöhte Verteilung auf der Hautoberfläche, bzw. durch einen entstehenden Gleichgewichtseffekt zwischen gelösten und komplexierten Wirkstoff, bei dem der Cyclodextrinkomplex als Nachschubreservoir dient, die Penetration des Sericosids erhöht. Damit dürfte der Einsatz von  $\gamma$ -Cyclodextrin in dem kosmetischen Produkt als unbedenklich eingestuft werden.

## 4 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Sicherstellung der Stabilität und der Verträglichkeit eines Wirkstoffes aus einem Extrakt pflanzlichen Ursprungs in dermalen Formulierungen. Die Auswahl der Wirkstoffe erfolgte unter Berücksichtigung vorhandener *in vitro* Wirksamkeits- und Toxizitätsdaten. Die Arbeit war in die Entwicklung eines Phyto-kosmetikums eingebunden. Bearbeitet wurden Extrakte von *Camellia sinensis* (Grüner Tee) und *Terminalia sericea* (Gelbholz). Die antioxidativ wirkenden Catechine bei *Camellia sinensis*, insbesondere das (-)-Epigallocatechingallat und das (-)-Epicatechin eignen sich als Wirksubstanzen zur Behandlung empfindlicher und trockener Hautzustände. Sericosid aus *Terminalia sericea* Extrakt besitzt antiinflammatorische Eigenschaften. Nach der Untersuchung mehrerer handelsüblicher Pflanzenextrakte mittels TLC wurden Extrakte mit einer hohen Wirkstoffkonzentration ausgesucht und weiterbearbeitet. Zur Bestimmung der Lagerstabilität der Wirkstoffe wurden die ausgewählten Extrakte in verschiedene halbfeste und flüssige Formulierungen vom Typ W/O, O/W und W/O/W eingearbeitet und über 6 Monate unter definierten Bedingungen gelagert und mittels LC/MS analysiert. Die Catechine unterlagen nach Einarbeitung und Lagerung in den entsprechenden Formulierungen einem raschen Abbau, so dass nach 6 monatiger Lagerung je nach Emulsionsstyp (O/W, W/O) keine oder nur Spuren von Catechinen nachweisbar waren. Nach Zusatz von wasserlöslichem Antioxidans (Vitamin C) und sauerstofffreier Herstellung der Formulierungen mit anschließender Abfüllung in gasdichte Packmittel konnte die Lagerstabilität der Catechine signifikant verbessert werden. Stabilisierungsversuche durch Zusatz von lipophilen Antioxidantien wie Butylhydroxytoluol (BHT) und Propylgallat (PG) sowie Chelatbildnern wie EDTA und Chitosanderivaten einzeln und in Kombination führten zu keinem Erfolg. Stabilisierungsversuche durch Einarbeitung von Grüntee-Extrakt in die innere Wasserphase mit niedrigem pH-Wert einer W/O/W Emulsion schlugen ebenfalls fehl. Durchgeführte *in vitro* Penetrationsstudien ergaben keine Hinweise auf eine systemische Wirkung. Die Catechine penetrieren gut in die Hornschicht, besitzen aber eine schlechte Penetration in die Epidermis und in die Dermis.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die schwer zu stabilisierenden Catechinderivate durch Zusatz eines wasserlöslichen Antioxidans ausreichend stabilisie-

ren lassen. Chelatbildner und fettlösliche Antioxidantien üben keinen stabilisierenden Effekt aus.

Das wasserunlösliche Sericosid aus *Terminalia sericea* Extrakt erwies sich über die Lagerzeit von 6 Monaten als stabil. Es löste sich aber in kosmetischen Formulierungen nur bis ca. 0,05 %, darüber hinaus trat Kristallbildung in den betroffenen Formulierungen auf. Mittels der IR-Raman Spektroskopie konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den Kristallen um das Sericosid aus dem Extrakt handelte. Durch die Komplexierung mit Cyclodextrinderivaten der Typen  $\gamma$ -, HP- $\gamma$ -, M- $\beta$ - und HP- $\beta$ -Cyclodextrin erhöhte sich die Löslichkeit des Sericosids signifikant. Das Vorliegen eines Komplexes bei allen 4 verwendeten Cyclodextrinderivaten konnte mittels XRD, DSC und TGA bestätigt werden. Die Berechnung der Komplexierungsverhältnisse und der Komplexbildungskonstante von Sericosid/Cyclodextrinen über die Aufstellung einer Lösungsisotherme (Typ  $A_L$ ) war nicht möglich, da zuvor mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR und MALDI-TOF nachgewiesen wurde, dass der Extrakt außer Sericosid noch zahlreiche andere Verbindungen enthält, die durch Cyclodextrine komplexiert werden können und somit in Konkurrenz zum Sericosid stehen. Durchgeführte Löslichkeitsversuche und das Vorliegen einer Lösungsisotherme vom Typ  $A_L$  weisen aber auf ein molares Komplexierungsverhältnis Extrakt/Cyclodextrin von 1:1 hin. Nach der Einarbeitung von komplexiertem *Terminalia sericea* Extrakt in Formulierungen blieben nur die Formulierungen der  $\gamma$ -Derivat Komplexe kristallfrei. Bei den Formulierungen mit Extrakt/ $\beta$ -Derivat Komplexen trat nach kurzer Zeit wieder Kristallbildung ein, die auf eine Interaktion der  $\beta$ -Cyclodextrine in den getesteten Formulierungen mit Rohstoffen hinweist. Der Wirkstoff Sericosid penetrierte in einer ethanolhaltigen O/W Emulsion bis in die Dermis, allerdings verbleiben 76 % des Sericosids an der Oberfläche zurück. Nach Komplexierung des Extraktes mit  $\gamma$ -Cyclodextrin im Verhältnis 1,0:1,25 konnte die Penetration aus der ethanolfreien O/W Emulsion um den Faktor 2,6 erhöht werden. Dabei änderte sich die prozentuale Wirkstoffverteilung in den einzelnen Hautschichten nicht. Das  $\gamma$ -Cyclodextrin geht somit keine Interaktionen mit den oberen Hautschichten ein, sondern führt durch die erhöhte Sättigungslöslichkeit und einen sich einstellenden Gleichgewichtseffekt zwischen frei vorliegendem und komplexiertem Wirkstoff zu einer erhöhten Penetration.

Durch die Komplexierung von *Terminalia sericea* Extrakt mit  $\gamma$ -Cyclodextrin konnte schwerlösliches Sericosid erstmals in wirksamkeitsrelevanten Mengen in eine kosmetische Formulierung eingearbeitet werden.

## 5 Summary

The aim of my research was to guarantee the stability and skin compatibility of the main active components in a plant extract in a dermatological formula for topical use. It facilitated the intended commercialisation of an efficient and skin-compatible product with regard to the existence of in vitro/in vivo-effectiveness and toxic properties. We investigated different plant extracts of *Camellia sinensis* (green tea) and *Terminalia sericea* (silver terminalia). The derivatives of catechins with antioxidant activities, especially (-)-epigallocatechin-gallate and (-)-epicatechin were found in the plant of *Camellia sinensis*. They were suitable for treating the sensitive and dry skin. Sericoside from *Terminalia sericea* is a compound with an antiinflammatory activity. After investigating commercial plant extracts via TLC, we selected the plant extracts with a high active ingredient concentration. For analysis the selected extracts were incorporated in formulae, and then stored under defined conditions for about 6 months. The storage stability was analysed with LC/MS. The degradation of catechin derivatives of *Camellia sinensis* extract was inferior. In addition of the type of emulsion (o/w or w/o) no or just traces of catechins were detectable. After addition of ascorbic acid and the production under oxygen-free conditions, we draw the formulations into airtight containers. The storage stability increased significantly. The incorporation of butylated hydroxytoluene (BHT), propyl gallate (PG), Trisodium-EDTA and derivatives of chitosan isolated or in combination did not improve the storage stability. After the realization of in vitro penetration studies we had no indication for a systemical effect. Only traces of catechins penetrated into the dermis and the epidermis. Nevertheless the dermatological formulation showed a positive in vivo effect to the dehydrated skin. The disturbed barrier of the dehydrated skin, which allows better skin penetration could explain this phenomenon. In short we were able to improve the stability of catechin derivatives significantly after incorporating a water-soluble antioxidant like ascorbic acid. In contrast Trisodium-EDTA, chitosan derivatives and water-insoluble antioxidants were not able to stabilise the catechins.

The water-insoluble sericoside of *Terminalia sericea* extract showed a good stability during a six-months' storage of dermatological formulations. Formulations containing more than 0.05 % sericoside unfortunately resulted in crystallisation.

By means of IR-Raman spectroscopy we were able to show that the crystals in the formulations were identical with the crystals of the pure compound sericoside. After complexation with derivatives from the types of  $\gamma$ -, HP- $\gamma$ -, M- $\beta$ -, HP- $\beta$ -cyclodextrins we were able to improve the solubility of sericoside in water. The new complexes of sericoside and cyclodextrin were characterised through DSC, TGA and XRD. There was no chance to calculate the ratio of the sericosid/cyclodextrin complex and the stability constant due to of the type  $A_L$  of the phase solubility diagramm, because after characterising by  $^{13}\text{C}$ -NMR and MALDI-TOF in the terminalia sericea extract we found many other compounds close to sericoside. These were able to get stable complexes with cyclodextrins. They were in competition with the cyclodextrin-sericoside complex. Due to solubility experiments with terminalia sericea extract and cyclodextrins an the arise of the stability constant of the type  $A_L$  a complex ratio of terminalia sericea extract-cyclodextrin of 1:1 was determined. After incorporating sericoside-cyclodextrin complexes in dermatological formulations, only the complexes with  $\gamma$ -cyclodextrins were stable upon storage. The incorporation of  $\beta$ -cyclodextrin complexes resulted in crystallisation. This proved an interaction between  $\beta$ -cyclodextrin and a material existing in dermatological formulations. Sericoside penetrated in an ethanolic formulation into the dermis, unfortunately 76 % of the applied sericoside didn't penetrate in any skin layer. The complexation of extract with a molar ratio of 1.0:1.25 resulted in a 2.6 fold higher percutaneous penetration as compared to pure sericoside. The percentage division of sericoside in skin layers didn't change. Therefore  $\gamma$ -cyclodextrin has no interactions with the skin layers, but conducts over a balance effect between complexed and pure sericoside to a significantly higher penetration.

For the first time we were able to improve the solubility of the water insoluble sericoside significantly due to the complexation of terminalia sericea extract with  $\gamma$ -cyclodextrin. Furthermore the percutaneous penetration into the dermis and epidermis improved significantly.



## 6 Chemikalien und Geräte

### 6.1 Extrakte

#### 6.1.1 Grüner Tee Konzentrat (INCI: *Camellia sinensis*)

Hellbraunes, sprühgetrocknetes Pulver aus den Blättern von *Camellia sinensis*.

Hersteller: Dragoco (Holzminden)

Extraktionsmittel: Methanol

Hauptinhaltsstoffe: 1. *Catechinderivate*

(+)-Catechin (C)

(-)-Epicatechin (EC)

(-)-Epicatechingallat (ECG)

(-)-Epigallocatechin (EGC)

(-)-Gallocatechingallat (GCG)

(-)-Epigallocatechingallat (EGCG)

2. *Coffein*

Löslichkeit: Wasser, Ethanol

#### 6.1.2 Sericoside (INCI: *Terminalia sericea*)

Hellgelbes, kristallines Pulver aus der Rinde und der Wurzel von *Terminalia sericea*.

Hersteller: Indena (Milano, Italien)

Extraktionsmittel: Diverse Extraktionsstufen (alkoholisch), anschließend Umkristallisation in 2-Propanol

Hauptinhaltsstoffe: 1. *Triterpenderivate*

Sericosid

Arjunglucosid (Isomer)

Löslichkeit: Ethanol

## 6.2 Cyclodextrine

Cyclodextrin	Molekulargewicht (MG)/ Durchschnittlicher Sub- stitutionsgrad (DS)	Hersteller
Hydroxypropyl-beta Cyclo- dextrin (HP-β)	MG:~1440, DS:0,6-0,9	Wacker, Burghausen
Methyl-beta Cyclodextrin (M-β)	MG:~1310, DS:1,6-1,9	Wacker, Burghausen
Gamma-Cyclodextrin (γ)	MG:1297	Wacker, Burghausen
Hydroxypropyl-gamma Cyclodextrin (HP-γ)	MG:~1576, DS:0,5-0,7	Wacker, Burghausen

## 6.3 Emulsionen (Pool-Rezepturen)

Die aufgeführten Formulierungen entsprechen den in der Arbeit verwendeten Basisrezepturen, die je nach Anforderungen entsprechend modifiziert worden sind. Beispielhaft sei die Zugabe von Wirkstoff, Antioxidans, Cyclodextrin und Ethanol als Lösungsvermittler genannt. Damit das Verhältnis der einzelnen Fett- und Wasserphasen zueinander konstant bleibt, ist bei der Einarbeitung eines Rohstoffes/Wirkstoffes die entsprechende Menge (g) an Lösungsmittel der Phase herausgenommen worden, in der sich der einzuarbeitende Stoff löst. Die angegebenen Inhaltsstoffe sind nach der INCI deklariert:

### **6.3.1 Wasser in Öl Emulsion (W/O Creme)**

Aqua, Ethylhexyl Cocoate, Isopropyl Stearate, Cyclomethicone, Glycerin, Caprylic/Capric Triglyceride, Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearate, C20-40 Alkyl Stearate, Polyisobutene, Polyglyceryl-3 Diisostearate, Macadamia Ternifolia, Hydrogenated Castor Oil, Magnesium Sulfate, Glycine, Tocopheryl Acetate, Methylparaben, Phenoxyethanol, Sodium Lactate, Citric Acid, Butylparaben, Ethylparaben, Isobutylparaben, Propylparaben.

### **6.3.2 Öl in Wasser Emulsion (O/W Creme)**

Aqua, Ethylhexyl Cocoate, Caprylic/Capric Triglyceride, Glycerin, Hydrogenated Co-co-Glycerides, Cetyl Alcohol, Myristyl Alcohol, Glyceryl Stearate Citrate, Butyrospermum Parkii, Tridecyl Stearate, Tridecyl Trimellitate, Tocopheryl Acetate, Dipentaerythryl Hexacaprylate/Hexacaprate, Carbomer, Phenoxyethanol, Methylparaben, Butylparaben, Ethylparaben, Isobutylparaben, Propylparaben.

### **6.3.3 Wasser in Öl in Wasser Lotion (W/O/W)**

Aqua, Isohexadecane, PPG-15 Stearyl Ether, Caprylic/Capric Triglyceride, PEG-30 Dipolyhydroxystearate, Poloxamer 407, Magnesium Sulfate, Xanthan Gum, DMDM Hydantoin.

### **6.3.4 Wasser in Öl Lotion (O/W Lotion)**

Aqua, Isopropyl Palmitate, Cyclomethicone, Glyceryl Lanolate, Triceteareth-4 Phosphate, Carbomer, Phenoxyethanol, Methylparaben, Trisodium EDTA, BHT, Butylparaben, Ethylparaben, Isobutylparaben, Propylparaben, Citric Acid.

## 6.4 Standards

Substanz	Hersteller	R-und S-Sätze	Gefahrensymbol
(±)-Catechin	Sigma, Deisenhof	R 36/37/38 S 26-36	Xi
(-)-Catechingallat	Sigma, Deisenhof	R 36/37/38 S 26-36	Xi
(-)-Epicatechin	Sigma, Deisenhof	R 36/37/38 S 26-36	Xi
(-)-Epicatechingallat	Sigma, Deisenhof	R 36/37/38 S 26-36	Xi
(-)-Epigallocatechin	Sigma, Deisenhof	R 36/37/38 S 26-36	Xi
(-)-Epigallocatechingallat	Sigma, Deisenhof	R 36/37/38 S 26-36	Xi
(-)-Gallocatechin	Sigma, Deisenhof	R 36/37/38 S 26-36	Xi
(-)-Gallocatechingallat	Sigma, Deisenhof	R 36/37/38 S 26-36	Xi
Gallussäure	Carl Roth, Karlsruhe		
Sericosid	Indena, Milano		

## 6.5 Geräte, Chemikalien und Lösungsmittel nach Methoden

### 6.5.1 Dünnschichtchromatographie (TLC)

Material	Bezeichnung	Hersteller
TLC Fertigplatten Alu	Kieselgel 60 F <sub>254</sub> , 20 x 20 cm, Schichtdicke: 0,2 mm	Merck, Darmstadt
PSC Fertigplatten Glas	Kieselgel 60 F <sub>254</sub> , 20 x 20 cm, Schichtdicke: 1,0 mm	Merck, Darmstadt
TLC Trennkammern	10 x 10 cm, Stahldeckel	Camag, Berlin
PSC Trennkammern	20 x 20 cm, Stahldeckel	Camag, Berlin
Extrakt-Lösungsmittel für Camellia sinensis	Wasser	
Extrakt-Lösungsmittel für Terminalia sericea	Ethanol/Wasser (40:60)	
TLC-UV-Detektorlampe	Camag Serie 022.9120 254/366 nm	Camag, Berlin
Detektionsreagenz	Anisaldehyd/ Schwefelsäure	Merck Darmstadt
Laufmittel bei Camellia sinensis	Chloroform/Methanol/ Eisessig (3,2:0,8:1,0)	Merck, Darmstadt, Carl Roth, Karlsruhe
pH-Chemikalien (pH 4-7)	Essigsäure, Ammoniak	Carl Roth, Karlsruhe
Laufmittel bei Terminalia sericea	Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:5)	Merck, Darmstadt, Carl Roth, Karlsruhe

### 6.5.2 UV-Vis Spektroskopie (UV-VIS)

Material	Bezeichnung	Hersteller
UV-Spektrometer	Hewlet Packard Diode Array Spectrometer 8452 AX	Hewlet Packard
Extrakt-Lösungsmittel für Camellia sinensis	Wasser	
Extrakt-Lösungsmittel für Terminalia sericea	Ethanol/Wasser (40:60)	

### 6.5.3 Herstellung der Grüntee/Gelbholzextrakt Emulsionen im Labormaßstab (≤ 2 kg)

Material	Bezeichnung	Hersteller
Planetenrührer	Kitchen Aid „Classic“ KSM 45	Kitchen Aid, Michigan, USA
Homogenisator	Homozenta A, FZ 290 L1 Homozenta B, FZ 100 L1	Zehnder, Zürich, Schweiz
Ansatzwaage	Satorius LP 6200 S Max. 6200 g, d= 0,01 g	Satorius, Göttingen
Analysenwaage	Satorius BP 301 S Max. 303 g, d= 0,0001 g	Satorius, Göttingen
Steuerprogramm (Rezeptureinwaagen)	Ancol ® (Ansatz Computer Laborsystem)	Beiersdorf AG, Hamburg

### 6.5.4 Herstellung der Grüntee-Extrakt Emulsionen im Technikumsmaßstab (2-5 kg)

Material	Bezeichnung	Hersteller
Mischer	Ankerrührer-Mischer mit Zahnkranzhomogenisator (Beco-Lab Mini 2,5)	Berents, Stuhr
Ansatzwaage	Satorius LP 6200 S Max. 6200 g, d= 0,01 g	Satorius, Göttingen
Analysenwaage	Satorius BP 301 S Max. 303 g, d= 0,0001 g	Satorius, Göttingen
Steuerprogramm (Rezeptureinwaagen)	Ancol® (Ansatz Computer Laborsystem)	Beiersdorf AG, Hamburg

### 6.5.5 Lagerstabilitätsuntersuchungen

Material	Bezeichnung	Hersteller
Schrank (-10°C/+40°C)	Rumed 3501	Rubarth, Laatzen
Kühlschrank (+6°C)	Liebherr Gastro Line UKS 5700	Liebherr, Ochsenhausen
Eisschrank (-10°C)	Liebherr Profi Line UGS 65200	Liebherr, Ochsenhausen
Brutschrank (+40°C)	Hereaus B 6200	Hereaus, Hanau
pH-Meter	Knick 762 Mikroprozessor mit pH-Einstab-Messkette Schott N 6280	Knick, Berlin Schott, Hofheim
Viskosimeter	Haake Viscotester VT-02	Haake, Karlsruhe
Konsistenzmesser	Eigenentwicklung BDF	Beiersdorf AG, Hamburg

Mikroskop	Olympus BX 50 F	Olympus, Japan
Aufnahmen Mikroskop	Sony DXC-930 P	Sony, Japan

### 6.5.6 Verteilungskoeffizient ( $\log P_{OW}$ )

Material	Bezeichnung	Hersteller
Computersoftware Log $P_{OW}$ Bestimmung	ACD/Log P dB v.4.5	Advanced Chemistry Development (ACD)
HPLC-Pumpen	Merck L 6200	Merck, Darmstadt
HPLC-Säule	Phenomenex Luna RP 18/3 $\mu$ m Durchfluss: 0,8 ml/min	Phenomenex, Torrance, USA
Brechzahl-detektor	Merck L 7490	Merck, Darmstadt
Pufferchemikalien pH 3,0; pH 7,4	Eisessig; Essigsäure; Na <sup>+</sup> -Acetat;	Merck, Darmstadt
Probenlösungsmittel	Methanol/Wasser Mi- schungen (62,5 %; 87,5 % je nach $\log P_{OW}$ Bereich)	Merck, Darmstadt

### 6.5.7 Penetration an exzidierte Schweinehaut (PEN)

Material	Bezeichnung	Hersteller
Schweinehäute	Rückenhaut weiblicher Schlachtschweine ca. 5 cm <sup>2</sup> ; 3-4 mm dick	
Lösungs-/Extraktionsmittel	2-Propanol	Merck, Darmstadt
Blutimitat	0,9 % Natriumchlorid,	



Elektrische Schere	0,1 % Gentamycin 1,0 % Albumin in Phosphatpuffer pH 7,4	
Magnetrührer	GT 102 „Favorita 2“	Aesculap, Tuttlingen
Heizthermostat	Multipoint HP	Variomag, Dayton Beach, USA
Klebefilm	CS-C	Lauda, Königshofen
	4129/25 mm	Tesa AG, Hamburg

### 6.5.8 IR-Raman Spektroskopie

Material	Bezeichnung	Hersteller
IR-Raman Spektrometer	LABRAM System	ISA, Bensheim
Waschlösung für Kristalle	n-Hexan	Merck, Darmstadt

### 6.5.9 Herstellung der Sericosid/Cyclodextrinkomplexe zur Bestimmung der Komplexbildungskonstante $K_{m:n}$

Material	Bezeichnung	Hersteller
Mixer	Vortex Genie 2 G-560 E	Scientific Industrie, Bohemia, USA
Lösungsmittel	Wasser	
Pufferchemikalien (pH 3;5;7;9)	Eisessig, Essigsäure, Na <sup>+</sup> -Acetat, Ammoniak	Merck, Darmstadt
Schwenktisch	GFL 3014	GFL, Burgwedel

### 6.5.10 Herstellung der Sericosid/Cyclodextrinkomplexe (Pulver)

Material	Bezeichnung	Hersteller
Lösungsmittel	Wasser bzw. Ethanol 96 %	
Magnetrührer	Heidolph MR 3001 K, mit Temperaturfühler EKT 3001,	Heidolph, Schwabach
Lösungsmittelverdampfer	Vortex Evaporator	Scientific Industrie, Bohemia, USA
Brutschrank (+40°C)	Hereaus B 6200	Hereaus, Hanau

### 6.5.11 Röntgendiffraktometrie (XRD)

Material	Bezeichnung	Hersteller
Folie	Polyethylenterphthalat (PETP)	Du Pont, Bad Homburg
Messgerät	PSD Supply Unit	Stoe, Darmstadt
Momochromator	Germanium Kupfer $\alpha$ 1 Strahlung (40 KV, 30 mA, 2,2 KW)	

**6.5.12 Differential Scanning Kalorimetrie (DSC)**

<b>Material</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Messgerät	Mettler Toledo DSC 30	Mettler, Schweiz
Detektor	Mettler Toledo TC 15	Mettler, Schweiz
Analysenwaage	Mettler Toledo AT 261	Mettler, Schweiz
Messtiegel	40 µl Alu Tiegel, (offen, geschlossen)	
Spülgas	Stickstoff 5.0	

**6.5.13 Thermogravimetrie (TGA)**

<b>Material</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Messgerät	Mettler Toledo TGAA SD TA 851 <sup>e</sup>	Mettler, Schweiz
Analysenwaage	Mettler Toledo AT 261	Mettler, Schweiz
Messtiegel	40 µl Alu Tiegel, (offen)	
Spülgas	Stickstoff 5.0	

**6.5.14 Nuclear Magnetic Resonanz Spektroskopie (<sup>13</sup>C-NMR)**

<b>Material</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Messgerät	Bruker DRX	Bruker, Bremen
Lösungsmittel	d <sub>4</sub> -Methanol	Merck, Darmstadt

### 6.5.15 Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation Time Of Flight Mass Spektroskopie (MALDI-TOF)

<b>Material</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Messgerät	Bruker Biflex	Bruker, Bremen
Detektor	AF 820	ETP, Australien
Na <sup>+</sup> -Anionenaustauscher	DOWEX 50 WX 8	Fluka, Buchs
Matrix	4-Hydroxy- $\alpha$ -Zimtsäure	Sigma, Deisenhof
Lösungsvermittler		Merck, Darmstadt
Tetrahydrofuran		
Silbernitrat		Merck, Darmstadt

## 7 Literatur

1. Agarwal, R., Mukhtar, H.(1995). Cancer chemoprevention by polyphenolic compounds from green tea. *DN&P Vol.8, No.4: 216-225*
2. Ahmad, N., Cheng, P., Mukhtar, H.(2000). Cell cycle dysregulation by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. *Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol.275, No.2: 328-334*
3. Ahmad, N., Mukhtar, H.(2001). Cutaneous photochemprotection by green tea: a brief review. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol. Vol.14, No.2: 69-76*
4. Alexis, A.F., Jones, V.A., Stiller, M.J.(1999). Potential therapeutic applications of tea in dermatology. *Int. J. of Dermatology Vol.38: 735-743*
5. Amann, M., Dressnandt, G.(1993). Solving problems with cyclodextrins in cosmetis. *Cosmet. Toilet. Vol.108, No. 11: 90-95*
6. Antony, J.I.X., Shankaranaryana, M.I.(1997). Polyphenols of green tea. *IFI No.5: 47-52*
7. Arnold, H.J., Gulumian, M.(1984). Pharmacopoeia of traditional medicine in Venda. *J. Ethnopharm No.12: 35-74*
8. Atkins, P.W., Beran, J.A.(1996), Strukturaufklärung mit Beugungsmethoden, *Chemie einfach alles, 1.Aufl.*
9. Backensfeld, T.(1990). Cyclodextrineinschlusskomplexe: Lösungsvermittlung-Stabilisierung-Struktur, *Dissertation Universität Kiel*
10. Balentine, D.A., Wiseman, S.A., Bouwens, L.C.M.(1997). The chemistry of tea flavonoids. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. Vol.37, No.8: 693-704*
11. Bertoldi, M., Gonsalvi, M., Borri Voltattorni, C.(2001). Green tea polyphenols: novel irreversible inhibitors of dopa decarboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol.284, No.1: 90-93*
12. Bertram, B.(1998). Krebsvorbeugende und krebshemmende Wirkung von Tee. *Wiss. Informationsdienst Tee No.6: 11-18*
13. Biffi, E.(1991). Irritatione cutanea primaria irritatione oculare, *Biolab SGS, Test Report 90/704*
14. Biffi, E.(1991). Iterative Primary skin irritation, *Biolab SGS, Test Report 90/703*
15. Biffi, E.(1992). Acute eye irritation in rabbits. *Biolab SGS, Test Report No.92/14243: 1-11*

16. Blot, W.J., McLaughlin, J.K., Chow, W.H.(1997). Cancer rates among drinkers of black tea. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. Vol.37, No.8: 739-760*
17. Bombardelli, E., Bonati, A., Gabetta, B., Mustich, G.(1974). Triterpenoids of *Terminalia sericea*. *Phytochemistry Vol.13, No.11: 2559-2562*
18. Bombardelli, E., Crippa, F., Pifferi, G.(1986). Sericoside, a new glucoside in functional cosmetics. *Preprints of the 14<sup>th</sup> F.S.C.C. Congress, Barcelona No.2: 975-986*
19. Bombardelli, E., Cristoni, A., Morrazoni, P.(1993). PHYTOSOME®s in functional cosmetics. *Fitoterapia Vol.65, No.5: 386-401*
20. Bombardelli, E., Curri, S.B., Della Loggia, R., Del Negro, P., Tubaro, A., Gariboldi, P.(1989). Complexes between phospholipids and vegetal derivatives of biological interest. *Fitoterapia Vol.60, Suppl. Al No.1: 1-9*
21. Bombardelli, E., Martinelli, E.M., Mustich, G.(1975). Plants of Mozambique. A new hydroxystilbene glycoside from *Terminalia sericea*. *Fititherapia Vol.96: 199-200*
22. Bombardelli, E., Patri, G.F., Pozzi, R.(1988). Complexes of saponins with phospholipids and pharmaceutical and cosmetic compositions containing them. *Europäische Patentanmeldung EP 0283713 B 1 Fa. Indena*
23. Brandis, D.(1898) in: Engler, A., Prantl, K. (Hrsg.). Die natürlichen Pflanzenfamilien. W. Engelmann, Leipzig Bd.2: 7 + 106-130
24. Braun-Falco, O., Plewig, G., Wolff, H.H.(1996). Dermatologie und Venerologie. Springer Verlag: 407-408
25. Braun-Falco, O., Plewig, G., Wolff, H.H.(1996). Dermatologie und Venerologie. Springer Verlag: 671-674
26. Bruno, C.(1991). Tolerability and cutaneous sensitisation study in healthy volunteers after topical application of the produkt Sericoside PHYTOSOME® Gel 3%, Università Degli Studi Di Urbino, Test Report
27. Burger, A., Wachter, H.(1998). Hunnius pharmazeutisches Wörterbuch, de Gruyter Verlag 8.Aufl.
28. Challa, A., Katiyar, S.K., Cooper, K.D., Mukhtar, H.(1998). Inhibition of UV-radiation-caused induction of oxidative stress and immunosuppression in C3H/HeN mice by polyphenols from green tea. *Dermatology Vol.110, No.4: 695*

29. Chen, Z.Y., Chan, P.T., Ma, H.M., Fung, K.P., Wang, J.(1996). Antioxidative effect of ethanol tea extracts on oxidation of canola oil. *JAOCS* Vol.73, No.3: 375-380
30. Chinemana, F., Drummond, R.B., Mavi, S., De Zoysa, I.(1985). Indigenous plant remedies in Zimbabwe. *J. Ethnopharm No.14: 159-172*
31. Chisaka, T., Matsuda, H., Kumbomura, Y., Mochizuki, M., Yamahara, J., Fujimura, H.(1988). The effect of crude drugs on experimental hypercholesteremia: Mode of action of Epigallocatechin-gallate in tea leaves, *Chem. Pharm. Bull. Vol.36, No.1: 227-233*
32. Citernesi, U., Sciacchitano, M.(1995). Cyclodextrins in functional dermocosmetics. *Cosmet. Toiletries Vol.110, No.3: 53*
33. Conti, M.(1991). Sericoside PHYTOSOME®:Acute toxicity by intraperitoneal and oral route in rats, *Inverni Della beffa, Test Report 01/91*
34. Conti, M., Marchesini, I.(1992). Terminalia furified extract: Acute intraperitoneal toxicity in rats. *Inverni Della Beffa, Test Report No.5/92.2: 1-19*
35. Demeule, M., Brossard, M., Pagé, M., Gingras, D., Béliveau, R.(2000). Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Bioch. Biophys. Acta No.1478: 51-60*
36. Deutsches Arzneibuch 1997, Amtliche Ausgabe. *Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart*
37. Diembeck, W., Grimmert, A.(1995). Cosmetic Ingredients:Guidelines for percutaneous absorption/ Penetration (Standard Protokoll). *COLIPA, The European Cosmetic Toiletry And Perfumery Association*
38. Dorrego, A.B., Garcia-Rio, L., Herves, P., Leis, J.R., Mejuto, J.C., Perez-Juste, J.(2000). Micellbildung oder Bildung eines Cyclodextrin-Komplexes, *Angewandte Chemie Vol.112, No.16: 3060-3062*
39. Duchene, D.(1987). Cyclodextrins and their industrial uses, *Les Editions de Santé, Paris*
40. Duchene, D., Ponchel, G., Wouessidjewe, D.(1999). Cyclodextrins in targeting. Application to nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev. Vol.36, No.1: 29-40*
41. Duchene, D., Wouessidjewe, D., Poelman, M.C.(1999). Cyclodextrins in cosmetics. *Cosmet. Sci. Technol. Ser. Vol.19: 275-293*
42. Duchene, D., Wouessidjewe, D., Ponchel, G.(1999). Cyclodextrins and carrier systems. *J. Control Release Vol.62, No.1-2: 263-268*

43. Dvorakova, K., Dorr, R.T., Valcic, S., Timmermann, B., Alberts, D.S.(1999). Pharmacokinetics of green tea derivative, EGCG, by the route of administration in mouse and human skin. *Cancer Chemother. Pharmacol. Vol.43: 331-335*
44. Elmets, C.A., Singh, D., Tubesing, K., Matsui, M., Katiyar, S., Mukhtar, H.(2001). Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *J. A. Acad. Dermatol. Vol.44, No.3: 425-232*
45. Engelhardt, U.(1998). Polyphenole in Tee. *Wiss. Informationsdienst Tee. No.6:1-10*
46. Engelhardt, U., Galensa, R.(1997). Analytik und Bedeutung von Polyphenolen in Lebensmitteln. *Analytiker Taschenbuch Bd.15, Springer Verlag Heidelberg. 149-178*
47. Falbe, J., Römpp, H.(1999). *Römpp Lexikon Chemie, Thieme Verlag, 10. Aufl. Bd.2*
48. Falbe, J., Römpp, H.(1999). *Römpp Lexikon Chemie, Thieme Verlag, 10. Aufl. Bd.5*
49. Falbe, J., Römpp, H.(1999). *Römpp Lexikon Chemie, Thieme Verlag, 10. Aufl. Bd.6*
50. Fiedler, H.(1996). *Lexikon der Hilfsstoffe, Editio Cantor Verlag, 4.Aufl.*
51. Flaten, T.P., Odegard, M.(1988). Tea, aluminium and alzheimer`s disease *Food. Chem. Toxicol Vol.26, No.11/12: 959-960*
52. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W.(1990). Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, 5.Auflage, *Bibliographisches Institut, Mannheim, Wien, Zürich*
53. Franke, G.(1975). Nutzpflanzen der Tropen und Subtropen. *Hirzel Verlag, Leipzig. Bd.1, 80-114*
54. Frauen, M.(2001). Analytik kosmetisch wirksamer Pflanzenextrakte mit der Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS). *Dissertation Fachbereich Chemie Universität Hamburg.*
55. Frömmling, K.H.(1973). Einschlußverbindungen und ihre pharmazeutische Verwendungsmöglichkeiten, *Pharmazie in Unserer Zeit No.2:109*
56. Frömmling, K.H., Weyermann, I.(1972). Erhöhung der in vitro Lösungsgeschwindigkeit durch Einschlußverbindungen mit beta-Cyclodextrin, *Archiv der Pharmazie No.305:290*



57. Geczy, J., Bruhwyler, J., Scuvee-Moreau, J.(2000). The inclusion of fluoxetine into gamma-cyclodextrin increases its bioavailability. *Psychopharmacology Vol.151, No.4: 328-334*
58. Gerloczy, A., Fonagy, A., Keresztes, P.; Perlaky, L., Szejtli, J.(1985). Absorption, distribution, excretion and metabolism of orally administered 14C-beta-cyclodextrin in rat. *Arzneimittelforschung Vol.35, No.7: 1042-1047*
59. Graham, H.N.(1984). Tea: The plant and its manufacture; Chemistry and consumption of the beverage. In: *The Methylxanthine Beverages and Foods: Chemistry, Consumption, and Health Effects, Alan R. Liss, New York: 29-74*
60. Gupta, N., Levy, L.(1973). Delayed manifestation of ultraviolet reaction in the guinea-pig caused by anti-inflammatory drugs. *Br. J. Pharmac. No.47:240-248*
61. Habon, I., Fritsch, S., Szejtli, J.(1984). Simulation of pharmacokinetic behaviour of drug-cyclodextrin complexes. *Pharmazie Vol.39, No.12: 830-834*
62. Hänsel, R., Keller, K., Rimpler, H., Schneider, G.(1993). Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, *Bd.4, 5.Aufl., Springer Verlag*
63. Hänsel, R., Keller, K., Rimpler, H., Schneider, G.(1994). Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, *Bd.6, 5.Aufl., Springer Verlag*
64. Hamada, S., Kontani, M., Hosono, H., Ono, H., Tanaka, T., Ooshima, T., Mitsunaga, T., Abe, I.(1996). Peroxidase-catalyzed generation of catechin oligomers that inhibit glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*. *FEMS Microbiol. Letter No.143: 35-40*
65. Hara, Y., Matzuzaki, S., Nakamura, K.(1989). Anti tumor activity of tea catechins. *Nippon Eujo Shokuryo Gakaishi Vol.42, No.1: 39-45*
66. Harborne, J.(1988). The Flavonoids-Advances in Research. *Chapman and Hall, London*
67. Hegenauer, R.(1962-1992). Chemotaxonomie der Pflanzen. *Birkhäuser Verlag Basel, Stuttgart, Bd.1-10*
68. Heilmann, J., Merfort, I.(1998). Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden. *Pharmazie unserer Zeit Vol.27, No.4:173-183*
69. Hemmer, W., Focke, M., Wolf-Abdolvahab, S., Bracun, R., Wantke, F., Götz, M., Jarisch, R.(1996). Group allergy to tri- and ortho-diphenols (catechols) in a patient sensitized by propyl gallate. *Contact Dermatitis No.35: 110-112*
70. Herrmann, K.(1983). Wertgebende Bestandteile des Tees—eine Übersicht. *Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem. Vol.37: 30-35*

71. Higuchi, T., Connors, K.A.(1965). Phase-solubility techniques, *Adv. Anal. Chem. Instr. Vol.4: 117-212*
72. Hollman, P.C.H., Tijburg, L.B.M., Yang, C.S.(1997). Bioavailability of flavonoids of green tea. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. Vol.37, No.8: 719-738*
73. Hooker, J.(1879). Flora of British India. *Reeve & Co, London, Bd.2: 443-449*
74. Hopf, G.(1965). Empfehlung für die Prüfung kosmetischer Präparate auf Hautverträglichkeit und Sensibilisierung. *Fette, Seifen, Anstrichmittel Vol.67, No.12: 974-977*
75. Huang, Y., Chan, N.W.K., Lau, C.W., Yao, X.Q., Chan, F.L., Chen, Z.Y.(1999). Involvement of endothelium/nitric oxide in vasorelaxation induced by purified green tea epicatechin. *Bioch. Biophys. Acta No.1427: 322-328*
76. Imamura, K., Tsuchiyama, Y., Tsunekawa, H., Okamura, K., Okamoto, R., Harada, K.(1991). Cosmetics containing water-insoluble cyclodextrin polymers as scrubbing particles. *Japanische Patentanmeldung JP 05105619 A2 Fa. Merican*
77. Industrieverband Körperpflege-und Waschmittel e.V. (2000). Kosmetik und Recht, *7.Seminar des Industrieverbandes Körperpflege- und Waschmittel e.V. zum nationalen und internationalen Kosmetikrecht. 1. Aufl.*
78. Jeong, S.H., Lee, C.K., Cho, W.G., Kang, S.H., Uekama, K.(2000). Improvement in some physicochemical and biological properties of LG106W by inclusion complexation with beta-cyclodextrin and its derivatives. *J. Cosmet. Sci. Vol.51: 227-237*
79. Kajtar, M., Vikmon, M., Morlin, E., Szeytli, J.(1989). Aggregation of amphotericin B in the presence of gamma-cyclodextrin. *Biopolymers Vol.28, No.9: 1585-1596*
80. Katiyar, S.K., Matsui, M.S., Elmets, C.A., Mukhtar, H.(1999). Polyphenolic antioxidant Epigallocatechingallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leucocytes in human skin. *Photochem.Photobiol. Vol.69, No.2: 148-153*
81. Kim, J., Hwang, J., Cho, Y., Han, Y., Jeon, Y., Yang, KH.(1998). Protective effects of green tea polyphenols on the ultraviolet-induced dermal extracellular damage, *Dermatology Vol.110, No.4: 599*
82. Koenen, E.(1978). Heil-und Giftpflanzen in Südwestafrika. *Akadem Verlag, Windhuk: 112*

83. Kruse, I., Schönrock, U.(1998). Verwendung von Flavanonen bzw. Flavonoiden zum Schutze von Ascorbinsäure und/oder Ascorbylverbindungen gegen Oxidation. *Deutsche Patentanmeldung DE 19807774 A 1 der Fa.Beiersdorf*
84. Lange, S., Pickenhagen, W.(1998). Grüntee-Extrakt enthaltende O/W-Emulsionen. *Deutsche Patentanmeldung DE 19840730 A 1 der Fa. DRAGOCO*
85. Lehmann, W.(1996). Massenspektrometrie in der Biochemie. *Spektrum Akad. Verlag Heidelberg, Berlin*
86. Lehner, S.J., Müller, B.W., Seydel, J.K.(1994). Effect of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on the antimicrobial action of preservatives. *J. Pharm. Pharmacol Vol.46, No.3: 186-191*
87. Liben, L.(1968). Combretaceae. *Publication subventionnée par le Ministère de l'Agriculture*
88. Lindner, K., Saenger, W.(1978). Beta-Cyclodextrin-Dodecahydrat: Häufung von Wassermolekülen in einer hydrophoben Höhlung, *Angew. Chem. Vol.90: 738-740*
89. Loftsson, T.(2000). Cyclodextrins in skin delivery, *Cosmetic & Toiletries Magazine Vol.115, No.10:59-66*
90. Luo, M., Kannar, K., Wahlqvist, M., O'Brien, R.C.(1997). Inhibition of LDL oxidation by green tea extract. *Lancet Vol.349, No1:9048*
91. Mabberely, D.J.(1990). Terminalia. *The plant book, Cambridge University Press: 573*
92. Maekawa, A.(1989). Antiperspirant aerosol compositions containing cyclodextrin. *Japanische Patentanmeldung JP03170415 A2 Fa. Sunstar*
93. Marks, V., Kelly, J.(1973). Absorption of caffeine from beverages. *Lancet Apr No.14: 827; corrected in:Lancet No.9: 1313*
94. Matsuda, H., Ito, K.(1991). Body deodorants containing hydroxyalkylated cyclodextrins. *Japanische Patentanmeldung JP 03284616 A2 Fa. Shiseido*
95. Mercier, O.(1989). Test to evaluate the sensitizing potential in the guinea pig. *Hazleton France, Test Report No.906330: 1-44*
96. Meyer, V.(1990). Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. *Otto Salle Verlag, Frankfurt. 6.Aufl.:18-20*
97. Middleton, E.(1996). Biological properties of plant flavonoids: an overview. *Int. J. Pharmacognosy Vol.34, No.5: 344-348*

98. Minocha, R., Dani, H.M.(1986). Evaluation of carcinogenicity of infusion from green tea leaves by microsomal degranulation technique. *Indian J. of Experimental Biology Vol.24: 224-228*
99. Morton, J.J.P., Malone, M.H.(1972). Evaluation of vulnerary activity by an open wound procedure in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. No.196: 117-126*
100. Motwani, M., Zatz, J.L.(1997). Applications of cyclodextrins in skin products. *Cosmet. Toilet. Vol.112, No.7: 39-47*
101. Mueller-Goymann, C.C.(1992). New excipients for dermatics and cosmetics. *Parfuem. Kosmet. Vol.73, No.7: 452-460*
102. Mukthar, H., Katiyar, S.K., Agarwal, R.(1994). Green tea and skin-anticarcinogenic effects. *J. Invest. Derm. Vol.102, No.1: 3-7*
103. Murari, R., Natarajan, S., Seshadri, T.R., Ramaswamy, A.S.(1972). Some new pharmacological properties of black tea polyphenols. *Current Science Vol.41: 435-437*
104. Mustich, G.(1974). Pentacyclic triterpenes obtainable from *Terminalia sericea* and their derivatives. *Patentanmeldung 1493926, The Patent Office London*
105. Natarajan, S., Seshadri, T.R.(1972). Recent advances in the chemistry of tea. *Current Sci India Vol.41, No.16: 585-593*
106. No, J.K., Soung, D.Y., Kim, Y.J., Shim, K.H., Jun, Y.S., Rhee, S.H., Yokoza-wa, T., Chung, H.Y.(1999). Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sciences Vol.65, No.21: 242-246*
107. Nose, M., Nakataki, Y., Yamanishi, Z.(1971). Studies of the flavor of green tea. *Agricult. Biol. Chem Vol.35, No.2: 261-271*
108. OECD (1989). Partition coefficient (n-octanol/water), High Performance liquid Chromatography (HPLC) Method. *Guideline for testing of chemicals No.117, adopted on 30.03.1998*
109. Oliver, D.(1871). Flora of tropical Africa. *Reeve & Co, London, Bd.2: 415-417*
110. Palmer, E., Pitman, N.(1972). Trees of Southern Afrika. A. A. *Balkema, Kapstadt*
111. Pelle, E., Muizzuddin, N., Mammone, T., Marenus, K., Maes, D.(1999). Protection against endogenous an UVB-induced oxidative damage in stratum corneum lipids by an antioxidant-containing cosmetic formulation. *Photodermatol. Photoimmuno. Photomed. Vol.15: 115-119*

112. Pifferi, G., Zini, G.F., Cristoni, A. Pharmacological study of sericoside and sericic acid, *Inverni Della beffa, Test Report*
113. Rapp, C., Heinsohn, G.(1999). Raman Spectroscopy- a versatile Method for the Analysis of Sunscreens. 46. *SEPAWA Kongress, 13.10.-15.10.1999 Bad Dürkheim*
114. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G.(1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free rad. Bio. Med. Vol.20, No.7: 933-956*
115. Richtler, H.J., Knaut, J.(1991). Surfactants in the Nineties, *SÖFW-Journal No.117: 545-553*
116. Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G.(1992). Instrumentelle Pharmazeutische Analytik. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2.Aufl.*
117. Saenger, W.(1980). Cyclodextrin-Einschlußverbindungen in Forschung und Industrie, *Angew. Chemie. Vol.92: 343-361*
118. Saito, Y., Tanemura, I., Sato, T., Ueda, H.(1999). Interaction of fragrance materials with 2-hydroxypropyl-beta cyclodextrin by static and dynamic head-space methods. *Int. J. Cosmet. Sci. Vol.21, No.3: 189-198*
119. Sakai, T., Kobashi, K., Tsunozuka, M., Hattani, M., Namba, T.(1985). Studies on dental caries prevention by traditional chinese medicines. *Shoyakugaku Zasshi No.39: 165-169*
120. Sato, M., Yagi, Y., Ishikura, T.(1986). Bath preparations containing perfume-methylated cyclodextrin inclusion compounds. *Japanische Patentanmeldung JP 62161720 A2*
121. Schmidt, P.C., Christin, I.(1999). Wirk- und Hilfsstoffefür Rezeptur, Defektor und Großherstellung. *Wiss. Verlagsges. Stuttgart*
122. Scholz, E., Bertram, B.(1995). *Camellia sinensis (L.)O. Kuntze. Der Tee-strauch. Zeitschrift für Phytotherapie Vol.17: 235-250*
123. Schreiner, V. noch nicht publiziert
124. Schwarz, K.(1998). Antioxidantien in Lebensmitteln und ihre Bedeutung als Mikronährstoffe. 1. Eigenschaften und Vorkommen von Antioxidantien in Lebensmitteln. *AID Verbrauchdienst No.43: 340-344*
125. Shibauchi, I., Nakamura, K.(1985). Bath preparation containing cyclodextrin inclusion compounds of milk or milk products. *Japanische Patentanmeldung JP 60181013 A2*

126. Shibauchi, I.(1985). Bath preparation containing cyclodextrin-milk component inclusion compound. *Japanische Patentanmeldung JP 61286318 A2*
127. Stagg, G.V., Millin, D.J.(1975). The nutritional and therapeutic value of tea-a review. *J. of Sci. Food. Agric. Vol.26: 1439-1459*
128. Szejtli, J.(1982). Cyclodextrins and their inclusion complexes, *Alkadémiai Kiadó, Budapest*
129. Szejtli, J.(1985). Cyclodextrins: a new group of industrial basic materials. *Nahrung Vol.29, No.9: 911-924*
130. Szejtli, J.(1988). Cyclodextrin Technology, *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*
131. Szejtli, J.(1994). Medicinal application of cyclodextrins. *Med. Res. Rev. Vol.14, No.3: 353-386*
132. Szejtli, J., Bolla-Pusztai, É., Kajatar, M.(1982). The beta-cyclodextrin inclusion complex of manadione (Vit.K<sub>3</sub>), *Pharmazie Vol.37: 725-728*
133. Szejtli, J., Bolla-Pusztai, É., Tardy-Lengyel, M., Szabó, P., Ferenczy, T.(1983). Preparation, properties and biological activity of beta-cyclodextrin inclusion complex of menadione, *Pharmazie Vol.38: 189-193*
134. Szente, L., Apostol, I., Szejtli, J.(1984). Suppositories containing beta-cyclodextrin complexes. Part 1. *Pharmazie Vol.34, No.10: 697-699*
135. Szente, L., Apostol, I., Gerloczy, A., Szejtli, J.(1984). Suppositories containing beta-cyclodextrin complexes. Part 2. *Pharmazie Vol.40, No.6: 406-407*
136. Szente, L., Szejtli, J.(1999). Highly soluble cyclodextrin in derivatives: chemistry, properties an Trends in development. *Adv. Drug Deliv. Rev. Vol.36, No.1: 17-28*
137. Teuscher, E., Lindequist, U.(1987). Biogene Gifte. *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York: 426-430*
138. Thomsen, R.(1998). Single application closed patch epicutaneous test under occlusion. *Institute Dr. Schrader Test Report No.460-CC-98-000-98-061*
139. Tijburg, L.B.M., Mattern, T., Folts, J.D., Weisgerber, U.M., Katan, M.B.(1997). Tea flavonoids and cardiovascular diseases—A review. *Crit. Rev. Food. Sci. Vol.37, No.8: 693-704*
140. Udaka, K., Takeuchi, Y. Movat, H.Z.(1970). Simple method for quantitation of enhanced vascular permeability. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. No.133: 1384-1387*

141. Uekama, K.(1981). Pharmaceutical applications of cyclodextrin complexations. *Yakugaku Zasshi Vol.101, No.10: 857-8734*
142. Uekama. K., Horiuchi, Y., Kikuchi, M., Hirayama, F., Ijitsu, T., Ueno, M.(1988). Enhanced dissolution and oral bioavailability of alfa tocopheryl esters by dimethyl-beta-cyclodextrin complexation, *J. Inc. Phenom. Vol.6: 167-174*
143. Uekama. K., Otagiri, M.(1987). Cyclodextrins in drug carrier systems, *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys. Vol.3, No.1: 1-40*
144. Vollmer, U.(1992). Einfluss der Cyclodextrine auf die Transdermale Absorption, *Dissertation Universität Kiel*
145. Weinberg, C.R., Wilcox, A.J.(1990). Caffeine and infertility. *Lancet, Vol.335, No.31: 792*
146. Wang, Z.Y., Khan, W.A., Bickers, D.R., Mukthar, H.(1989). Protection against polycyclic aromatic hydrocarbon-induced skin tumor initiation in mice by green tea polyphenols. *Carcinogenesis Vol.10, No.2: 411-415*
147. Whalley, G.R.(2000). Multiple Emulsions: A new tool for Cosmetic chemists. *HAPPI Vol.37, No.6: 135-137*
148. Winter, C.A., Riskey, E.A., Nuss, G.W.(1962). Carragenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. No.111: 544-547*
149. Wiseman, S.A., Balentine, D.A., Frei, B.(1997). Antioxidants in Tea. *Crit. Rev. Food. Sci. Vol.37, No.8: 705-718*
150. Yamamoto, T., Juneja, L.R., Chu, D.C., Kim, M.(1997). Green Tea. *CRC Press, Boca Raton; New York*
151. Zhao, J., Zhang, Y.J., Jin, X.H., Athar, M., Santella, R.M.(1999). Green tea against psoralen plus ultraviolet A- induced photochemical damage to skin. *Soc. Inv. Dermatol. Vol.113, No.6: 1070-1075*





## Lebenslauf

### Zur Person

Timo Rode, geboren am 17.09.1972 in Homberg/Efze

### Schulbildung

08/79 – 07/83	Mittelpunktschule Heiligenberg Gensungen
08/83 – 07/89	Gesamtschule Felsberg
08/89 – 07/92	Geschwister-Scholl-Schule Melsungen

### Studium

10/93 – 09/97	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität Kiel
---------------	---

### Famulaturen

03/94	4-wöchige Famulatur in der „Apotheke am Tor“ in Borken/Hessen
08/94	4-wöchige Famulatur bei der B. Braun AG in Melsungen

### Praktisches Jahr

01/98 – 06/98	„Kastanien Apotheke“ in Kiel
07/98 – 12/98	Beiersdorf-Lilly GmbH in Hamburg, Abteilung Feste Arzneiformen

### Promotion

04/99 – 11/01	Prof. Dr. Dr. h.c. B.W. Müller, Abteilung Pharmazeutische Biopharmazie, Christian-Albrechts-Universität-Kiel Durchführung der labortechnischen Arbeiten: Beiersdorf-AG in Hamburg, Abteilung Forschung Wirkstoffe
---------------	---

## Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Dr. h.c. B.W. Müller für die Betreuung des Themas und die wissenschaftlichen Freiräume, die er mir gelassen hat. Dr. U. Schönrock danke ich für die hervorragenden Rahmenbedingungen sowie für die ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung. Weiterhin möchte ich mich bei Dr. H. Wenck und Dr. K.P. Wittern bedanken, dass die vorliegende Arbeit im Bereich der „Forschung Cosmed“ der Beiersdorf AG, Hamburg, durchgeführt werden konnte.

Mein weiterer Dank gilt insbesondere den Mitarbeitern des Labors „Forschung Wirkstoffe“ für die tolle Atmosphäre und die reibungslose Zusammenarbeit. Zu nennen sind hier Frau I. Kruse, Frau S. Franke, Frau H. Biergiesser, Frau Dr. C. Hinze, sowie Frau Dr. C. Mundt.

Herrn Dr. C. Rapp und Herrn M. Frauen danke ich für die stets sehr kooperative und unkomplizierte Zusammenarbeit im Bereich der LC/MS Analytik. Für die Einweisungen, Beratungen und Unterstützungen bei den zahlreich angewandten analytischen Messmethoden möchte ich mich weiterhin bei Herrn H.J. Düsing und Herrn M. Akhiani (Penetration und Verteilung), Herrn Dr. T. Sokolowski (NMR), Herrn G. Heinsohn (IR-Raman), Herrn F. Hetzel und Herrn V.S. Schlesiger (DSC und TGA), Herrn N. Rasenack (XRD) sowie Frau J. Pruns (MALDI-TOF) herzlich bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank den gesamten Mitarbeitern der „Funktion Forschung Cosmed“, besonders Herrn Dr. L. Kolbe, Herrn Dr. R. Wolber sowie Herrn Dr. V. Schreiner für die kooperative Zusammenarbeit bei der Planung und Durchführung der Wirksamkeitsstudien.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meiner ganzen Familie und ganz besonders bei meinen Eltern bedanken. Sie haben mir das Studium und das Schreiben dieser Arbeit erst ermöglicht.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere Quellen als die angegebenen nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die vorliegende Dissertation habe ich noch keiner anderen Universität vorgelegt, um ein Promotionsverfahren zu eröffnen. Ebenfalls sind bis heute keine Teile dieser Arbeit veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht worden.

Timo Rode

24.September 2001