

Extrakte aus Herba Fagopyri als Photoprotektiva: Untersuchungen zu Herstellung, Wirksamkeit, Galenik und Biopharmazie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Iris Hinneburg
geb. am 27.05.1975
in Limburg (Lahn)

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Neubert, Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. B. Dräger, Universität Halle-Wittenberg
3. Prof. P. C. Schmidt, Universität Tübingen

Halle (Saale), den 23.07.2004

urn:nbn:de:gbv:3-000007026

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007026>]

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	v
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Grundlagen	3
2.1 Buchweizen	3
2.1.1 Eigenschaften und wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe von Stammpflanze und Droge	3
2.1.2 Fagopyrin und phototoxische Eigenschaften von Herba Fagopyri	3
2.1.3 Medizinische Verwendung von Buchweizen	5
2.2 Interaktion von UV-Strahlung mit der Haut	6
2.2.1 Einfluß der Wellenlänge	6
2.2.2 Photooxidativer Streß	6
2.3 Antioxidantien als topische Photoprotektiva	11
3 Material und Methoden	15
3.1 HPLC- und CE-Methoden	15
3.2 Herstellung und Charakterisierung der Extrakte	18
3.3 Charakterisierung der UV-Absorptionsfähigkeit	20
3.4 Untersuchungen zur Wirksamkeit	20
3.5 Zellkultur	21
3.6 HET-CAM-Versuche	22
3.7 Photostabilität	22
3.8 Präformulierungsstudien	23
3.9 Stabilitätsuntersuchungen	24
3.10 Liberationsuntersuchungen am Mehrschichtmembranmodell	25
3.11 Penetrationsuntersuchungen an der Franz-Zelle	26
3.12 Statistische Auswertung	27
3.13 Verwendete Substanzen	27
4 Ergebnisse und Diskussion	29
4.1 Einfluß der Extraktionsparameter auf die phytochemischen Eigenschaften des Extraktes	29
4.1.1 Anlage der Versuchsreihe	29
4.1.2 Analytik der Flüssigextrakte	31
4.1.3 Analytik der gefriergetrockneten Extrakte	35

4.1.4	Vergleich verschiedener Fagopyrum-Drogen	39
4.1.5	Zusammenfassung: Auswahl eines geeigneten Extraktes	42
4.2	Untersuchungen zur Toxizität des Extraktes	44
4.2.1	Keratinocyten-Modell	44
4.2.2	HET-CAM-Modell	45
4.3	Wirksamkeit des Extraktes als Photoprotektivum	46
4.3.1	Untersuchung der UV-Absorptionsfähigkeit	46
4.3.2	Scavenger-Eigenschaften am DPPH-Modell	49
4.3.3	Hemmung der Ketoprofen-induzierten Linolsäureperoxidation	50
4.3.4	Wirksamkeit am Keratinocyten-Modell	53
4.3.5	Photoprotektive Eigenschaften am HET-CAM-Modell	55
4.3.6	Zusammenfassung: Eignung des Extraktes als Photoprotektivum	56
4.4	Photochemische Eigenschaften	57
4.4.1	Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht	57
4.4.2	Photostabilität des Extraktes als Festfilm	59
4.4.3	Photostabilität des Extraktes in Lösung	60
4.4.4	Zusammenfassung: Stabilität des Extraktes bei Bestrahlung	61
4.5	Galenik	62
4.5.1	Präformulierungsstudien	62
4.5.2	Stabilitätsuntersuchungen	66
4.5.3	Zusammenfassung: Galenischen Eigenschaften des Extraktes	70
4.6	Biopharmazeutische Untersuchungen	71
4.6.1	Untersuchungen zur Freisetzung aus topischen Formulierungen am Mehrschichtmembranmodell	71
4.6.2	Untersuchungen zur Penetration mit Hilfe der Franz-Zelle	74
4.6.3	Zusammenfassung: Biopharmazeutische Charakterisierung von topischen Formulierungen des Extraktes	78
5	Zusammenfassung	81
	Literaturverzeichnis	83
A	Anhang	97

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

3FWW	Dreifachwechselwirkung zwischen den Faktoren
AA	Antioxidative Aktivität
AS	Australischer Standard
BWE	Buchweizenextrakt
COLIPA	European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association
DAC	Deutscher Arzneimittel-Codex
DE	Dermis
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EGCG	Epigallocatechingallat
EP	Epidermis
HaCaT	Human adult low-calcium high-temperature keratinocytes
HET-CAM	Hen's egg test: chorioallantoic membrane
HMPWP	Herbal medicinal products working party
HPODE	Hydroperoxyoctadecadiensäure
INCI	International Nomenclature of Cosmetic Ingredients
IPP	Isopropylpalmitat
KP	Ketoprofen
λ_c	kritische Wellenlänge
LS	Linolsäure
LDF	Laser-Doppler-Flux
ME	Mikroemulsion
MED	mittlere Erythemdosis
MSMM	Mehrschichtmembranmodell nach FÜRST/NEUBERT
NRF	Neues Rezeptur-Formularium
PBS	phosphate buffered saline
PLD	Polymorphe Lichtdermatose
r. F.	relative Feuchte
ROS	reactive oxygen species
SC	Stratum corneum
SC ₅₀	Konzentration, die 50 % des DPPH reduziert
spA	spezifische Absorption
USP	United States Pharmacopoeia

Weitere Abkürzungen werden in den entsprechenden Kapiteln erläutert.

1 Einleitung und Zielsetzung

Maligne Hauterkrankungen haben in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Das ist nicht nur auf die Verminderung der Ozonschicht zurückzuführen, die einen Großteil der UV-Strahlung filtert, sondern vor allem auf das veränderte Freizeitverhalten, das zu einer erhöhten UV-Exposition führt [6]. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, daß durch UV-Bestrahlung in der Haut freie Radikale entstehen, die mit verschiedenen Molekülen in der Haut wechselwirken und so zur Carcinogenese führen können [45]. Vorstufen der malignen Hauterkrankungen sind Schäden auf molekularer Ebene, die sich u. a. in der vorzeitigen Hautalterung, dem sogenannten Photoaging, bemerkbar machen [52]. Ebenfalls konnte eine Beteiligung freier Radikale an der Entstehung der polymorphen Lichtdermatose (PLD) nachgewiesen werden [101].

In dem Maß, in dem das Bewußtsein der Bevölkerung für diese Problematik steigt, hat sich auch die Kosmetikindustrie dieser Frage gewidmet. In Kosmetika werden verschiedene Antioxidantien eingesetzt, welche die durch UV-Strahlung entstehenden Radikale abfangen und die Strukturen in der Haut schützen sollen. Eingesetzt werden z. B. Vitamin A, E und C (Synergie STOP, Laboratoires Garnier), Coenzym Q10 (Nivea Visage Anti-Falten Q10, Beiersdorf) in Kombination mit UV-Filtern (LightSource, Estee Lauder). Besonders Flavonoide sind in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, die in Pflanzen als UV-Filter dienen [68] und deren antioxidative Eigenschaften umfassend untersucht wurden [145]. Diese Eigenschaften werden z. B. in Eucerin Gel-Creme Phase 1 und Nivea Visage Complete Protection (beides Beiersdorf) genutzt, die u. a. den synthetischen Wirkstoff α -Glucosylrutin enthalten. Eucerin Gel-Creme 1 erwies sich in Untersuchungen von HADSHIEW wirksam bei der Prophylaxe der PLD [63].

Neben isolierten Wirkstoffen kommen auch pflanzliche Extrakte mit antioxidativer Wirkung zum Einsatz. Der Vorteil von Extrakten gegenüber isolierten Substanzen ist zum einen die häufig bessere Wasserlöslichkeit, zum anderen aber auch der synergistische Effekt verschiedener Komponenten [44]. Das prominenteste Beispiel ist der Grüntee-Extrakt mit u. a. Catechin und Epicatechin, die beide zur Gruppe der Flavonole gehören. Für einen solchen Extrakt konnte an Mäusen in vivo eine Verringerung UV-induzierter oxidativer Schäden gezeigt werden [81]. Kosmetisch eingesetzt werden auch ebenfalls flavanolhaltige Extrakte aus Traubensamen (z. B. in Plénitude Activ Futur, L'Oréal). Strukturell verschiedene Flavonoide unterscheiden sich auch in ihrem antioxidativen Wirkungsgrad. In verschiedenen Untersuchungen zeigten sich Flavonole den Flavanolen überlegen [145]. Deswegen soll versucht werden, einen Extrakt aus einer Flavonol-reichen Pflanze zu etablieren. Eine solche Pflanze ist Buchweizen (*Fagopyrum esculentum*), die besonders im Kraut einen hohen Anteil an Quercetin-glykosiden enthält [65]. Eine Recherche ergab, daß kommerziell erhältliche Extrakte aus Buchweizen nur einen geringen Flavonoid-Gehalt von ca. 10 % aufweisen.

In dieser Arbeit sollen folgende Aufgabenstellungen bearbeitet werden:

- Entwicklung und phytochemische Charakterisierung eines flavonoidreichen Extraktes aus *Herba Fagopyri*, dessen Herstellung einfach und kostengünstig ist und sich später ohne größere Probleme in den Industriemaßstab überführen läßt (Kapitel 4.1)
- Untersuchung des gewonnenen Extraktes auf eventuell toxische Eigenschaften (Kapitel 4.2)
- Nachweis der Wirksamkeit des Extraktes in-vitro (Kapitel 4.3)
- Beurteilung der Photostabilität (Kapitel 4.4)
- Arbeiten zur Galenik und Stabilität in topischen Formulierungen (Standardvehikel und Mikroemulsionen) (Kapitel 4.5)
- Biopharmazeutische Charakterisierung der Formulierungen in Bezug auf Freisetzung und Penetration in Humanhaut ex-vivo (Kapitel 4.6)

2 Grundlagen

2.1 Buchweizen

2.1.1 Eigenschaften und wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe von Stammpflanze und Droge

Der Echte Buchweizen (*Fagopyrum esculentum Moench*) aus der Familie der Polygonoaceae ist heimisch in Zentralasien, wird allerdings auch in Mitteleuropa als Mehlfrucht-, Bienenfutter- und Gründüngungspflanze kultiviert [66]. Die einjährige Pflanze ist 15 bis 60 cm hoch. In Europa tritt noch die Art *Fagopyrum tataricum* auf, die allerdings pharmazeutisch nicht eingesetzt wird. Als Droge wird das Kraut verwendet, in dem zahlreiche phenolische Inhaltsstoffe, darunter vor allem Flavonoide, vorkommen. Das Kraut wird schon ca. 50–60 Tage nach der Aussaat geerntet. Um einen maximalen Rutin-Gehalt zu erzielen, muß die Vollblüte erreicht sein, aber die Fruchtbildung darf noch nicht begonnen haben [66]. Der Rutin-Gehalt wird auch durch die Länge der Sonneneinstrahlung mitbeeinflusst [115]. Die Buchweizenfrucht hat keine arzneiliche Wirkung und dient ausschließlich als Nahrungsmittel. Die Droge, Fagopyri herba, ist offizinell im Homöopathischen Arzneibuch (HAB 1), in der British Herbal Pharmacopoeia (BHP 1983) sowie im DAC 2002. Eine Monographie für das Europäische Arzneibuch ist in Vorbereitung [133].

Rutin ist das wichtigste Flavonolglykosid in der Droge. In der Droge ist Rutin unterschiedlich verteilt. HAGELS konnte in den Blüten einen Gehalt von 12% nachweisen [65], während der Gehalt in den Blättern mit 2–8% angegeben wird [115]. Die am häufigsten vorkommenden Nebenflavonoide sind Hyperosid und Quercitrin, von weiteren phenolischen Verbindungen sind Chlorogensäure und ihre Isomere quantitativ am häufigsten vertreten. Daneben finden sich zahlreiche Hydroxybenzoesäuren. Außerdem kommt in der Droge Quercetin vor, das als Artefakt vor allem durch unsachgemäße Trocknung entsteht (s. Abb. 2.1) [64, 115].

2.1.2 Fagopyrin und phototoxische Eigenschaften von Herba Fagopyri

Weiterhin findet sich in der Droge Fagopyrin. Bei Fagopyrin handelt es sich um ein Naphthodianthron-Derivat, das chemisch mit Hypericin (aus *Hypericum perforatum*) verwandt ist (s. Abb. 2.2). Fagopyrin wurde erstmals 1952 von BROCKMANN isoliert und beschrieben [23]. Im Buchweizen findet sich Fagopyrin hauptsächlich in den jungen Blüten zu 0,01–0,03%. Blüten, die kurz vor der Fruchtbildung stehen, weisen nur einen geringen Gehalt an Fagopyrin auf. In getrockneten Blättern lassen sich nur Spuren nachweisen bzw. fehlt Fagopyrin ganz [115].

In wässrigen Extrakten (Teeaufguß) von Buchweizenkraut ist kein Fagopyrin nachweisbar [91]. HAGELS konnte zeigen, daß die Freisetzung von Fagopyrin aus Buch-

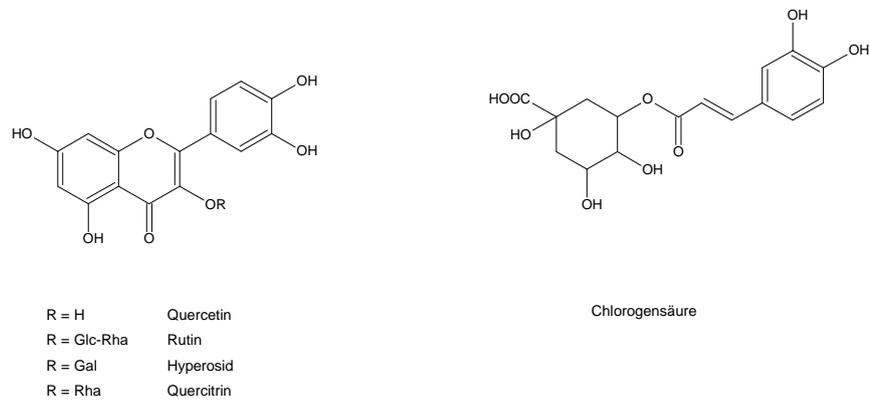


Abbildung 2.1: Strukturformeln der wichtigsten phenolischen Verbindungen in Buchweizenkraut

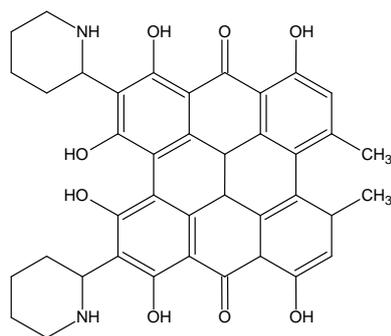


Abbildung 2.2: Strukturformel von Fagopyrin

weizenkraut mit Methanol 80 % oder 100 % sowie Ethanol 96 % vollständiger ist als z. B. mit Isopropanol oder Dichlormethan. Die geringste Freisetzung wurde mit Wasser erzielt [64]. Fagopyrin wird durch Hitze oder Alkalien leicht zersetzt. HABERMANN konnte nachweisen, daß in den Blüten des Buchweizens genuin nicht Fagopyrin vorliegt, sondern Protofagopyrin, ein Helianthronderivat, das unter Tageslichtexposition zu Fagopyrin zyklisiert [62].

Phototoxische Reaktionen auf Buchweizenkraut wurden zuerst bei Weidetieren beobachtet, denen große Mengen blühender Buchweizenpflanzen verfüttert wurden. Die auch als Fagopyrismus bezeichnete Krankheit äußerte sich an wenig und nicht behaarten Körperteilen mit Rötung, Schwellung und Entzündung, wenn die Tiere Tageslicht ausgesetzt waren [115]. CHICK und ELLINGER untersuchten 1941 in Fütterungsexperimenten verschiedene Pflanzenteile des Buchweizens und stellten fest, daß die Blüten am stärksten photosensibilisierend wirken. Die von ihnen ermittelte Schwellendosis lag im Rattenmodell bei 2,5–3 g Blüten/kg Körpergewicht (entsprechend ca. 2,5–3 µg Fagopyrin/kg)[29]. Heute weiß man, daß die phototoxische Reaktion durch Fagopyrin ausgelöst wird, das wie Hypericin eine photodynamische Aktivität hat [151, 153]. Nach Untersuchungen von THOMAS et al. ist Hypericin in der Lage, in Mitochondrien über eine Typ II-Photosensibilisierungsreaktion Singulett-Sauerstoff freizusetzen. Die effektivste Wellenlänge dafür lag bei 600 nm [163]. Die Anregungswellenlänge für die Photoaktivierung von Fagopyrin liegt bei 540-610 nm [42].

Untersuchungen an einer Fibroblasten-Zellkultur zeigten, daß wäßrige Buchweizenextrakte auch in höheren Dosierungen kaum phototoxisch wirkten, während ethanolsche Extrakte ein beträchtliches photoirritatives Potential aufwiesen. Zurückzuführen ist dies auf den Gehalt an Fagopyrin, der in den wäßrigen Extrakten unterhalb der Nachweisgrenze lag, bei den ethanolschen Extrakten jedoch bis zu 0,5 % betrug. Im Vergleich zur Positivkontrolle Hypericin schien das Fagopyrin weniger phototoxisch zu sein, allerdings konnte nicht zweifelsfrei entschieden werden, ob dieser Effekt auf die biologische Matrix oder das höhere Molekulargewicht des Fagopyrins zurückzuführen ist [162].

2.1.3 Medizinische Verwendung von Buchweizen

In der Roten Liste finden sich nur wenige Fertigarzneimittel auf der Basis von Buchweizenkraut. Dazu gehören Tabletten aus gepulvertem Buchweizenkraut (Fagorutin[®] Buchweizen-Tabletten), die für die Indikation Ödemprotektion eingesetzt werden. In mehreren Studien konnte die ödemprotektive und gefäßabdichtende Wirkung von *Herba Fagopyri* an Patienten mit chronischer Veneninsuffizienz gezeigt werden [78]. Auch die Gefäßfragilität bei Hypertonie sowie bei diabetischer Retinopathie konnte durch die Gabe von Präparaten aus Buchweizenkraut signifikant gesenkt werden [115].

Bei Kaninchen, denen eine fettreiche Diät verabreicht wurde, konnte Buchweizenkraut die Bildung atherosklerotischer Plaques in der Aorta vermindern [177]. Bei ähnlichen Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß die mit Buchweizenkraut supplementierten Versuchstiere eine niedrigere Konzentration an Malondialdehyd im Plasma sowie einen erhöhten Gehalt an Ascorbatradikalen in der Leber aufwiesen. Gleichzeitig waren die Blutspiegel von β -Lipoprotein sowie die Konzentration an Cholesterol und

Triglyceriden in der Leber erniedrigt. Dies deutet darauf hin, daß der Buchweizenextrakt die Lipidperoxidation verringern kann und antioxidative Eigenschaften besitzt. Es ließ sich auch nachweisen, daß der Buchweizenextrakt in diesem Modell bessere antioxidative Eigenschaften zeigte als reines Rutin [178].

2.2 Interaktion von UV-Strahlung mit der Haut

2.2.1 Einfluß der Wellenlänge

UVC-Strahlung (200–280 nm) erreicht aufgrund der Ozonschicht nicht die Erdoberfläche, allerdings kann aufgrund künstlicher UV-Quellen dennoch eine Exposition stattfinden. Das hauptsächliche Spektrum der Sonnenstrahlung umfaßt UVB (290–320 nm), UVA (320–400 nm), sichtbare Strahlung (400–800 nm) sowie Infrarot-Strahlung (Wellenlängen über 800 nm). Licht wird in der Haut sowohl absorbiert als auch gestreut. Bei UV-Strahlung mit einer Wellenlänge < 300 nm erfolgt die Absorption in der Epidermis durch Melanin, Urocansäure, DNA und Proteine. Für die Wellenlängen von 320–1200 nm dominiert die Absorption durch Melanin. In der Dermis erfolgt eine stark wellenlängenabhängige Streuung durch die Kollagenfasern [88].

Die verschiedenen Wellenlängen der Sonnenstrahlung rufen unterschiedliche biologische Effekte hervor: So ist z. B. das Reaktionsmuster und der zeitliche Verlauf der UV-vermittelten akuten Entzündungsreaktion (der sogenannte „Sonnenbrand“) stark wellenlängenabhängig. Außerdem zeigen auch die Effekte der Strahlung auf zellvermittelte Immunität, das Ausmaß und den Schweregrad von Photoaging und Photocarcinogenese eine Abhängigkeit von der Wellenlänge der beteiligten Strahlung. Dies läßt sich einerseits auf die unterschiedliche Eindringtiefe in die verschiedenen Hautschichten ($IR > VIS > UVA > UVB > UVC$) als auch auf spezifische Reaktionskaskaden zurückführen. UVC-Strahlung wird nahezu komplett durch das Stratum corneum absorbiert, während UVB hauptsächlich durch epidermale Strukturen wie Nukleinsäuren, Proteine und mehrfach ungesättigte Fettsäuren absorbiert wird und so zelluläre Schäden verursacht.

UVA hat eine Eindringtiefe bis in die Dermis, während sichtbares Licht und IR-Strahlung durch die Dermis hindurch in die Subcutis eindringen. UVA ist sehr effizient bezüglich der Induktion von oxidativem Streß. Die Effekte von UVA und sichtbarer Strahlung scheint über endogene Photosensitizer vermittelt. Die Phototoxizität von UVA sowie die UVA-vermittelte entzündliche Antwort der Haut sind Sauerstoffvermittelt und zeigen eine Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Dagegen ist für das UVB-induzierte Erythem sowie Pigmentierung keine Beteiligung von Sauerstoff nachweisbar [52].

2.2.2 Photooxidativer Streß

2.2.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies

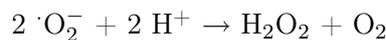
Die wichtigsten ROS (reactive oxygen species) sind in Tab. 2.1 aufgeführt. Sie zeichnen sich dadurch aus, daß sie aufgrund ihrer strukturellen Besonderheiten (die meisten ROS sind freie Radikale, d. h. Verbindungen mit einem oder mehreren ungepaarten

Tabelle 2.1: Wichtige ROS, geordnet nach abnehmender Reaktivität (nach PODHAISKY et al. [138])

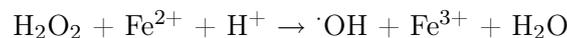
Hydroxylradikal	($\cdot\text{OH}$)
Singulett-Sauerstoff	($^1\text{O}_2$)
Hydroperoxylradikal	($\text{HO}_2\cdot$)
Superoxid-Anion	($\cdot\text{O}_2^-$)
Alkoxyradikal	($\text{RO}\cdot$)
Peroxyradikal	($\text{ROO}\cdot$)
Wasserstoffperoxid	(H_2O_2)

Elektronen) außerordentlich reaktionsfreudig sind und zu Kettenreaktionen neigen. Sie reagieren mit nahezu allen Biomolekülen und beeinträchtigen sie durch Oxidation in ihrer Funktionalität [45].

Das Superoxid-Anion reagiert, katalysiert durch die Superoxid-Dismutase (SOD), zu H_2O_2 :



Aus H_2O_2 kann in Anwesenheit von Übergangsmetallionen wie Fe^{2+} und Cu^{2+} das Hydroxylradikal entstehen (sog. Fenton-Reaktion). Diese Reaktion wird durch das Enzym Katalase katalysiert [52, 181]:



Begünstigt wird diese Reaktion durch die Freisetzung von Eisenionen aus der Transportform Ferritin, die durch Exposition mit UVA verstärkt wird [52]. ROS können bei UVC-Strahlung (200–290 nm) über Photolyse von Wasser, mittels UVB (290–320 nm) und UVA (320–400 nm) über eine photodynamische Reaktion und Photodissoziation verschiedener Moleküle entstehen [53].

Neben ROS spielen auch reaktive Stickstoffspezies eine Rolle bei UV-induziertem oxidativem Stress. Kontrovers diskutiert wird die Frage, ob die UV-induzierte NO-Freisetzung in der Haut ein Teil des strahlungsinduzierten oxidativen Stresses ist oder ein Teil des endogenen antioxidativen Schutzsystems. Stickstoffmonoxid (NO) entsteht durch die Spaltung der Aminosäure L-Arginin durch die NO-Synthase, die durch UV-Strahlung induziert werden kann [138].

2.2.2.2 Schäden auf molekularer Ebene

Ein wichtiger Vorgang auf molekularer Ebene ist die Oxidation von Nukleinsäuren. Obwohl der größte Teil der UVB-vermittelten DNA-Schäden durch direkte Anregung ohne Einfluß von Sauerstoff verursacht wird, wie z. B. die Bildung von Pyrimidin-Dimeren sowie Brüche des Doppelstrangs, gibt es auch Hinweise auf die Bildung von oxidativen DNA-Photoprodukten. Dabei löst UVB-Strahlung die Entstehung von 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosin aus [138].

Eine weitere Zielstruktur für UV-Strahlen sind die Lipide des Stratum corneum. Da ca. 25 % der Hautlipide ungesättigt sind, kommen Lipidperoxidationsprodukte auch

physiologisch vor. Deren Konzentration wird allerdings durch Umweltfaktoren, wie besonders auch UV-Strahlung, signifikant erhöht [52]. Dabei läßt sich besonders die Zunahme an Lipidperoxiden, Malondialdehyd sowie 4-Hydroxynonenal beobachten [116]. Es konnte gezeigt werden, daß das Hydroxylradikal als reaktive Sauerstoffspezies direkt an der Bildung von Lipidperoxiden beteiligt ist. Das Superoxid-Anion spielt dabei nur eine untergeordnete Rolle, da es lediglich über die Haber-Weiss-Reaktion Hydroxylradikale liefert [45].

Neben den Schäden an Nukleinsäuren und Lipiden spielt auch die Oxidation von Proteinen eine Rolle. In vitro konnte gezeigt werden, daß Keratin, das am häufigsten vorkommende Protein in der Epidermis, durch UV-Strahlung schnell oxidiert wird. Singulett-Sauerstoff ist vermutlich an der UVA-vermittelten Thioloxydation von Proteinen beteiligt [52].

2.2.2.3 Photosensibilisierung

Nach dem klinischen Erscheinungsbild lassen sich Lichtdermatosen nach LIM et al. in vier Gruppen klassifizieren [101]:

- **Idiopathische Photodermatosen:** dazu gehören u. a. die polymorphe Lichtdermatose (PLD)
- **Sekundäre Photodermatose aufgrund exogener Agentien:** Phototoxizität und Photoallergie
- **Sekundäre Photodermatose aufgrund endogener Agentien:** Porphyrinen
- **Photoexazerbierte Dermatosen** wie Herpes simplex labialis, d. h. Dermatosen, die durch Lichtexposition verschlimmert werden

Die polymorphe Lichtdermatose ist die verbreitetste idiopathische Photodermatose, von der 10-20% der Bevölkerung betroffen sind. Sie tritt bei Frauen häufiger auf als bei Männern und ist klinisch charakterisiert durch verschiedene Hautläsionen, zu denen erythematöse Papeln, Knötchen sowie verschiedenartige Erytheme gehören [101]. Die Läsionen erscheinen 1-24 h nach der Sonnenexposition und halten mehrere Tage an. Die polymorphe Lichtdermatose wird durch UVA-Licht im suberythemalen Dosisbereich hervorgerufen [117].

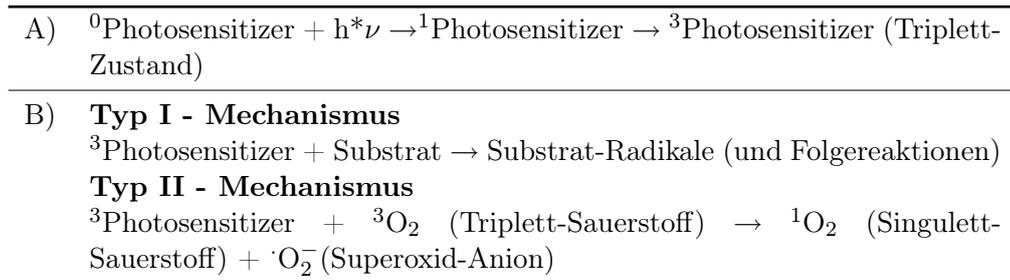
Mit dem Begriff Photoallergie bezeichnet man eine verzögerte hypersensible Antwort auf das Zusammentreffen eines Photoallergens und UV-Licht. Klinisch äußert sie sich in einem Ekzem, histologisch in einer epidermalen Spongiose sowie einer dermalen perivaskulären Infiltration von Lymphozyten und Histiozyten. Photoallergene sind häufig Lichtschutzsubstanzen und Duftstoffe, aber auch systemisch verabreichte Arzneistoffe [101].

Bei der Phototoxizität handelt es sich dagegen um eine direkte Toxizität, die innerhalb von Minuten bis Stunden nach der Lichtexposition auftritt. Sie ist wesentlich häufiger als photoallergische Reaktionen und zu ihrem Auftreten ist meist eine größere Menge sowohl des Photosensitizers als auch der Strahlung notwendig. Zu den häufigsten phototoxischen Agentien zählen Steinkohlenteer, Furocoumarine, Pflanzen sowie

auch systemisch verabreichte Arzneistoffe (z. B. Doxycyclin, Amiodaron, nichtsteroidale Antirheumatika und Phenothiazine). Topisch applizierte Photosensitizer lösen dabei einen höheren Schweregrad aus als systemisch verabreichte [61]. Klinisch erscheint die Phototoxizität wie ein verstärkt ausgeprägter Sonnenbrand mit Erythem, Ödem sowie Blasenbildung. Sowohl an der Photoallergie als auch der Phototoxizität scheint hauptsächlich UVA-Strahlung beteiligt zu sein [101].

Der Mechanismus der Photosensibilisierung wird wie folgt beschrieben: Die Energie des Photons befördert den Photosensitizer in einen angeregten Zustand, d. h. ein Elektron wird auf ein höheres Energieniveau angehoben, und es bildet sich ein Singulettzustand. Von diesem Zustand kann der Photosensitizer wieder in den Grundzustand gelangen, indem die Energie in Form von Fluoreszenz oder Wärme abgegeben wird. Alternativ kann der Photosensitizer auch in einen Triplettzustand übergehen (s. Abb. 2.3, A). Der Triplettzustand ist charakterisiert durch zwei Elektronen mit parallelem Spin und eine relative Stabilität. Dieser Zustand kann zu Sekundärreaktionen führen, die zwei verschiedene Mechanismen umfassen (vgl. Abb. 2.3, B) [138].

Abbildung 2.3: Bildung von ROS in der Haut (nach PODHAISKY [138])



- **Typ I:** Der aktivierte Photosensitizer reagiert direkt mit einem Target-Molekül, und es erfolgt über den Transfer von Elektronen oder Wasserstoffatomen die Bildung von Substratradikalen.
- **Typ II** (sog. photodynamische Reaktion): der aktivierte Photosensitizer reagiert mit Sauerstoff, was zur Bildung von ROS führt.

Endogene Photosensitizer sind z. B. Melanine (die im längerwelligen UV- und im sichtbaren Bereich photoprotektiv, im kürzerwelligen UV-Bereich dagegen photosensibilisierend wirken), Porphyrine und Flavine. Zahlreiche exogene Photosensitizer sind bekannt, darunter auch Arzneistoffe wie Tetracycline und Sulfonamide. Diese Eigenschaft wird allerdings auch bei der sogenannten PUVA-Therapie ausgenutzt, bei der durch Einsatz von Photosensitizern wie 8-Methoxypsoralen und gezielter UVA-Bestrahlung Dermatosen wie Psoriasis behandelt werden können. Auch Substanzen pflanzlichen Ursprungs, wie Hypericin (aus *Hypericum perforatum*), Fagopyrin (aus *Fagopyrum esculentum*) und Chlorophyll können photosensibilisierend wirken [42, 53].

2.2.2.4 Photoaging

Photoaging oder extrinsische Hautalterung ist ein komplexer biologischer Prozeß, bei dem verschiedene Hautschichten betroffen sind, wobei die Hauptschäden in der Dermis zu verzeichnen sind. Hauptsächliche Ursache ist UV-Strahlung, die zu einem vorzeitig gealterten Aussehen auch bei jungen Menschen führt [88].

Klinisch ist Photoaging charakterisiert durch Falten, lederiges Aussehen der Haut, einer verminderten Hautelastizität sowie verschlechterte Wundheilung. Histologisch ist ein Verlust an Hautkollagen zu verzeichnen. Singulett-Sauerstoff ist an der UVA-vermittelten Stimulation der Matrixproteinasen beteiligt, denen eine Bedeutung bei der vorzeitigen Hautalterung zugeschrieben wird. Über den Mechanismus der Matrixproteinasen-Aktivierung könnte auch UVB-Strahlung am Phänomen Photoaging beteiligt sein [52, 152, 165, 175]. Die UV-induzierte Bildung von Singulett-Sauerstoff und des Superoxid-Anions führt zu strukturellen und damit auch funktionellen Veränderungen von Proteinen der Haut (z. B. Kollagen und Elastin) [31]. Nach Untersuchungen von RHIE et al. finden sich in vorzeitig gealterter Haut im epidermalen Bereich eine höhere Aktivität von Katalase, während in der Dermis die Aktivität niedriger ist als in junger Haut. Die Konzentration an α -Tocopherol und Ascorbinsäure waren bei vorzeitig gealterter Haut in der Epidermis höher als bei junger Haut, in der Dermis trifft das nur auf Ascorbinsäure zu [143].

2.2.2.5 Photocarcinogenese

Die wichtigsten Unterarten von Hautkrebs sind das Basalzellkarzinom (BCC), das Plattenepithelkarzinom (SCC) sowie das maligne Melanom. Im Tiermodell kann UV-Strahlung sowohl SCC als auch Melanome verursachen. Solche Befunde gibt es nur indirekt für das BCC, allerdings legen Schlüssel-Mutationen im TP53-Gen sowie epidemiologische Befunde einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines Basalzellkarzinoms und vermehrter UV-Exposition nah. Das SCC scheint hauptsächlich durch UVB verursacht zu sein. Anhand epidemiologischer Daten gibt es Anzeichen für eine höhere Beteiligung von UVA an malignen Melanomen, was allerdings noch nicht experimentell belegt werden konnte. Für das Basalzellkarzinom liegen keine solchen Daten vor [6].

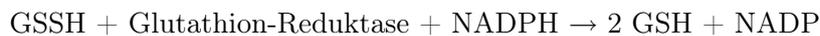
Die effektivsten Wellenlängen für UV-induzierte Carcinogenese findet sich im UVB-Bereich [52]. Die Carcinogenese wird als Prozeß direkten photochemischen Schadens an der DNA verstanden, von dem Mutationen ausgehen. Allerdings kann auch die Exposition von großen Dosen UVA-Strahlung das Risiko für Hautkrebs deutlich erhöhen [53]. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, daß UVA einen 20fach höheren Anteil an der Strahlungsenergie hat als UVB und damit deutlich zur Carcinogenität des Sonnenlichtes beiträgt. Im Gegensatz zu UVB wird UVA kaum von der DNA absorbiert. So wird die Absorption durch andere Moleküle, wie endogene Photosensitizer, wichtig, wodurch reaktive Sauerstoff-Spezies entstehen können, die wiederum DNA, Biomembranen und andere Zellbestandteile schädigen [35].

2.2.2.6 Das antioxidative System der Haut

Das antioxidative System der Haut läßt sich unterteilen in enzymatische und nicht-enzymatische Systeme. Es sind sieben enzymatische Systeme bekannt, zu denen neben der Superoxid-Dismutase und der Katalase das Thioredoxin-Reduktase-System, das Lipoamid-System, das NADPH-Ubichinon-Reduktase-System, diverse Peroxidasen und das Glutathion-System gehören. Letzteres besteht aus drei Enzymen, der Glutathion-Peroxidase, der Glutathion-Reduktase und der Glutathion-Transferase. Die anderen essentiellen Komponenten sind das Tripeptid Glutathion (GSH), Selen und der Co-Faktor NADPH. Lipidperoxide (ROOH) z. B. werden reduziert, wobei die oxidierte Form des Glutathions (GSSH) entsteht:



GSSH kann wiederum zu GSH mittels der Glutathion-Reduktase und NADPH reduziert werden:



Die nicht-enzymatischen Systeme lassen sich unterteilen in wasserlösliche Substanzen, wie Ascorbinsäure, Glutathion, Urate und Harnsäure, und lipophile Substanzen, wie Tocopherole, Vitamin A, Carotine und Ubichinone [52, 140, 171]. Durch UV-Strahlung können in Abhängigkeit von der Dosis und der Expositionshäufigkeit verschiedene Effekte ausgelöst werden. Durch akut hohe Dosen können antioxidativ wirkende Enzyme inhibiert sowie nicht-enzymatische Antioxidantien verbraucht werden. Dagegen führt eine chronische UV-Exposition mit niedrigen Dosen zu einer Enzyminduktion [52].

2.3 Antioxidantien als topische Photoprotektiva

Um Schäden an der Haut durch UV-Strahlung vorzubeugen, werden in den letzten Jahren vermehrt Photoprotektiva pflanzlichen Ursprungs eingesetzt [2, 48]. Sowohl in der Keratinozyten-Zellkultur als auch im Tiermodell zeigte sich, daß die topische Applikation von Ascorbinsäure, Vitamin E und β -Carotin UV-induzierte Schäden verringern kann. Davon waren sowohl Schäden an der DNA und Lipiden sowie Phänomene wie Erythembildung, Photoimmunosuppression, Photoaging sowie Photocarcinogenese betroffen [52].

Tocopherol ist ein effizienter Inhibitor der Lipidperoxidation. Topisch appliziertes Vitamin E wird über die Haarfollikel und die Lipidschicht des Stratum corneum bis in die Dermis resorbiert. Auch bei Langzeitanwendung in hohen Dosierungen sind weder Hautirritationen noch allergische Reaktionen bekannt. Vitamin E wird in der Dermis angereichert, so daß diese Hautschicht als Reservoir fungiert [89]. β -Carotin, das ein potenter Quencher von Singulett-Sauerstoff ist, ist bei systemischer Verabreichung nicht so gut photoprotektiv wirksam wie bei topischer Applikation. Es zeigt eine gute Wirksamkeit gegen UVB-induzierte Erythembildung [48]. Topisch applizierte Ascorbinsäure ist ebenfalls in der Lage, UVB-induzierte Entzündungsreaktionen zur

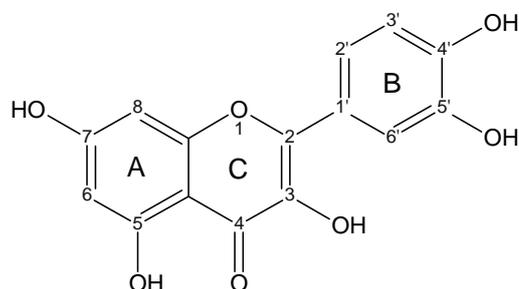


Abbildung 2.4: Struktureller Aufbau von Flavonolen am Beispiel Quercetin

verringern [52]. Bei Kombination mit Tocopherol wird die Wirksamkeit noch gesteigert, so daß die Bildung von Thymin-Dimeren in der DNA verhindert werden kann [102]. Aus Stabilitätsgründen werden häufig Ascorbinsäureester eingesetzt [135].

Eine weitere Substanzklasse, die in den Mittelpunkt der Aufmerksamkeit gerückt ist, ist die der Flavonoide. Flavonoide zeigten in verschiedenen Untersuchungen neben der Absorption von ultravioletter Strahlung sowohl antioxidative als auch prooxidative Eigenschaften. Die antioxidativen Eigenschaften werden zum einen der Enzyminhibition zugeschrieben, zu der Flavonoide fähig sind (z. B. Xanthinoxidase, Proteinkinase C, Cyclooxygenase, Lipoxygenase und einige andere, die in vivo an der Entstehung von freien Sauerstoffradikalen beteiligt sind [134]), vor allem aber der Fähigkeit, freie Radikale fangen zu können als auch der Möglichkeit, mit Eisen- und anderen Übergangsmetallionen Chelatkomplexe zu bilden [98]. Flavonoide sind in der Lage, UVB-induzierte Schäden an der DNA zu verhindern [93] sowie der Lipidperoxidation vorzubeugen [145]. Einen weiteren Wirkungsmechanismus postulieren ARORA et al.: Flavonoide verteilen sich in die hydrophoben Bereiche von Biomembranen und sorgen für einen dramatischen Abfall der Lipidfluidität in diesem Bereich der Membran. Die Diffusion von freien Radikalen wird dadurch sterisch gehindert und so die Geschwindigkeit von Radikalreaktionen verringert [8]. Eine Kombination aus α -Glykosylrutin, Ferulasäure und Tocopherolacetat in einer kosmetischen Formulierung konnte in einer klinischen Studie die Ausbildung und den Schweregrad einer UVA-induzierten polymorphen Lichtdermatose beeinflussen [63].

Drei strukturelle Eigenschaften der Flavonoide zeigten sich in mehreren experimentellen Untersuchungen als wichtig bezüglich der antioxidativen Eigenschaften (vgl. Abb. 2.4):

1. eine Catechol (*o*-Dihydroxy)-Funktion im B-Ring
2. eine 2,3-Doppelbindung in Konjugation mit einer 4-oxo-Funktion, die für die Elektronendelokalisation des B-Rings verantwortlich sind

3. das zusätzliche Vorhandensein sowohl einer 3-OH als auch einer 5-OH-Funktion [20, 69]

In dem Flavonol Quercetin sind alle drei Anforderungen erfüllt [145]. Die Glykosylierung an Position 3 (z. B. bei Rutin) führt zu einer etwas niedrigeren Radikalfängeraktivität, ist aber immer noch höher als bei Verbindungen, die keine 3-OH-Funktion besitzen [9].

Übergangsmetallionen, besonders Eisenionen, sind als Katalysatoren vieler Prozesse (z. B. der Fentonreaktion) bekannt, die zur Entstehung von ROS führen. Flavonole können aufgrund ihrer o-Dihydroxy-Funktion Eisenionen komplexieren und damit die Lipidperoxidation verhindern [1, 114]. Nach Untersuchungen von VAN ACKER et al. sind Rutin und Quercetin nur moderate Eisenchelatoren, die nicht in der Lage sind, Eisenionen aus einem entsprechenden Komplex mit EDTA herauszulösen. Für die Chelatisierung von Eisenionen spielen die 3-OH-Gruppe sowie die Catecholfunktion (im B-Ring) eine wichtigere Rolle als die 5-OH-Gruppe [169]. Für die meisten antioxidativ potenten Flavonoide spielen die Chelatbildungseigenschaften für die antioxidative Wirkung bei der Lipidperoxidation nur eine untergeordnete Rolle, während das Halbstufenpotential sich gut mit der antioxidativen Wirkung korrelieren läßt [168]. Die Chelatkomplexe von Flavonoiden mit Übergangsmetallionen sind nach Untersuchungen von KOSTJUK et al. sogar potentere Antioxidantien als die nativen Flavonoide [94]. Im Gegensatz zu Rutin ist die Chelatbindung von Quercetin an Cu^{2+} auch mit einer Oxidation des Flavonoids verbunden. BROWN et al. schlagen für die oxidierte Form des Quercetins eine chinoid Struktur vor [24].

Aufgrund ihrer niedrigen Redoxpotentiale sind Flavonoide thermodynamisch in der Lage, oxidierende freie Radikale wie Peroxyl-, Alkoxy- und Hydroxylradikale sowie das Superoxidanion durch Abgabe eines Wasserstoffatoms zu reduzieren. TOURNAIRE et al. konnten zeigen, daß Flavonoide ebenfalls als Quencher von Singulett-Sauerstoff reagieren können [164]. Das aus dem Flavonoid entstehende Aroxyradikal kann mit einem zweiten Aroxyradikal unter Ausbildung chinoider Strukturen reagieren. Allerdings kann das Aroxyradikal auch mit Sauerstoff reagieren, wobei das Superoxidanion entsteht (und daraus weitere reaktive Sauerstoffspezies) [134]. Diese Reaktion läuft besonders häufig in Gegenwart hoher Konzentrationen an Übergangsmetallionen ab [27].

Je niedriger das Halbstufenpotential $E_{p/2}$ ist, desto besser reagieren die Flavonoide mit freien Radikalen. PIETTA gibt einen Wert von < 200 mV an, ab dem die Flavonoide zu dieser Reaktion befähigt sind [134]. Gleichzeitig können sie damit aber auch als Prooxidantien wirken [37]. Nach VAN ACKER et al. liegt das kritische $E_{p/2}$ für physiologische Bedingungen bei < 60 mV. Dieser Wert ist abhängig vom pH-Wert [169]. Für die $E_{p/2}$ -Werte für Quercetin und Rutin finden sich in der Literatur nahezu übereinstimmende Werte (jeweils gemessen gegen eine gesättigte Kalomelektrode): für Quercetin 30 bzw. 60 mV, für Rutin 180 mV [134, 169]. In Untersuchungen von DICKANCAITE et al. zeigte Quercetin in einer humanen Leukämie-Zelllinie zytotoxische Eigenschaften, die durch den Zusatz anderer Flavonoide teilweise unterdrückt werden konnten [37]. BORS et al. konnten für Quercetin und Rutin nachweisen, daß Ascorbinsäure das jeweilige Flavonoid aus dem mittels Pulselektrolyse erzeugten Aroxyradikal recyceln kann. Man kann also davon ausgehen, daß zwischen den entsprechenden Fla-

vonoiden und Ascorbinsäure ein synergistischer Effekt besteht [21].

Das niedrige Halbstufenpotential ist vermutlich auch dafür verantwortlich, daß Flavonoide in wäßriger Lösung unter Sauerstoffeinfluß der Autoxidation unterliegen. NGUYEN stellte dazu fest, daß im alkalischen Milieu Quercetin leichter oxidierbar ist als Rutin und daß mit zunehmendem pH-Wert die Oxidationsgeschwindigkeit steigt. Mit zunehmender Autoxidation steigt auch die Braunfärbung der Lösung, die auf die Bildung von Polymeren zurückzuführen ist [123]. Die geringere Anfälligkeit des Rutins begründen KESSLER et al. mit der Blockierung der 3-OH-Funktion durch den Rutinose-Rest [85]. Während der Autoxidation entstehen durch 1-Elektronen-Übergang reaktive Aroxyl-Radikale sowie durch 2-Elektronen-Übergang Chinone [32]. Nach Untersuchungen von HODNICK et al. autoxidiert Quercetin schon bei pH 7,5 und erzeugt dabei das Superoxid-Anion, das durch Dismutation zu H_2O_2 umgesetzt wird [75]. Die Autoxidation wird durch Übergangsmetallionen katalysiert [28, 56]. Untersuchungen von MIURA et al. ergaben, daß besonders Flavonoide mit einer *o*-Dihydroxyfunktion im B-Ring, wie z. B. Quercetin, prooxidativ wirken können [112]. Diese Befunde wurden von CANADA et al. für Quercetin bestätigt, allerdings ließ sich dieses Prinzip nicht auf Rutin übertragen. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß auch die 3-OH-Funktion eine wichtige Rolle bei Autoxidationsprozessen spielt. Für Quercetin zeigte sich in diesen Experimenten in Abwesenheit von Eisenionen keine Anfälligkeit zu Autoxidation bei physiologischem pH-Wert. Unter Einfluß von Eisenionen und Superoxiddismutase entstand allerdings bei der Autoxidation von Quercetin Wasserstoffperoxid und das Hydroxylradikal [26].

Bei den meisten polyphenolhaltigen Extrakten überwiegt jedoch der antioxidative Effekt. Extrakte werden isolierten Substanzen vorgezogen, da so ein breiteres Spektrum an Inhaltsstoffen eingesetzt werden kann, das bereits in der produzierenden Pflanze effektiv vor UV-Strahlung schützt [34]. Ein Überblick über verwendete Extrakte findet sich in [48]. Als besonders wirksam hat sich ein catechinhaltiger Extrakt aus grünem Tee herausgestellt. In Untersuchungen von KATIYAR et al. ließ sich eine protektive Wirkung gegenüber molekularen Schäden an der Haut sowie Photocarcinogenese nachweisen [81, 82]. Mit einem Extrakt aus grünem Tee, der in einer kosmetischen Formulierung eingearbeitet wurde, ließ sich in einer Humanstudie die Menge an Lipidperoxiden in der Haut signifikant verringern [131]. Am Mäusemodell zeigte auch Silymarin eine protektive Wirkung gegen UV-induzierten Hautkrebs [83]. Eine signifikante Reduktion der strahlungsbedingten Lipidperoxidation konnte mit einem Extrakt aus *Ginkgo biloba* erreicht werden. Auch die Bildung von Sonnenbrand-Zellen in Humanhaut ließ sich damit verhindern [129]. Weitere Pflanzen, deren Extrakte antioxidativ und photoprotektiv wirksam sind, sind z. B. *Cichorium endivia* [46], *Polygonum leucotomos* [4], *Sedum telephium* [19] sowie *Panax ginseng* [160].

3 Material und Methoden

3.1 HPLC- und CE-Methoden

HPLC-Methode 1

Zweck	Trennung und Quantifizierung von Flavonoiden und Chlorogensäure	
Gerät	HPLC-Anlage Merck-Hitachi mit Autosampler AS 4000, Interface D-6000A, Pumpe L6200A, UV-VIS Detektor L4250 und Säulenthmostat Jetstream 2 plus	
Stationäre Phase	Eurospheer-100 RP8, 250x4 mm, 5 µm mit Eurospheer-100 Vorsäule 5x4 mm (Knauer, Berlin)	
Temperatur	25 °C	
Detektion	UV bei 324 nm und 350 nm	
Flow	1,1 ml/min	
Injektionsvolumen	20 µl	
Mobile Phase	A: H ₂ O/MeOH (90 + 10, V/V) + 0,5% Essigsäure B: MeOH + 0,5% Essigsäure	
Gradient	linear (angegeben ist jeweils % A): 0 min 90 %, 6 min 60 %, 9 min 60 %, 10 min 65 %, 18 min 65 %, 19 min 0 %, 32 min 0 %, 33 min 90 %, 40 min 90 %	
Validierungsparameter		
Rutin	Nachweisgrenze (in µg/ml)	0,5
	Präzision (in %)	2,59
	Linearität	0,5–600 µg/ml, r ² = 0,999
Quercitrin	Nachweisgrenze (in µg/ml)	1,2
	Präzision (in %)	4,16
	Linearität	1–50 µg/ml, r ² = 0,999
Chlorogensäure	Nachweisgrenze (in µg/ml)	1,4
	Präzision (in %)	1,32
	Linearität	1–100 µg/ml, r ² = 0,998
Hyperosid	Nachweisgrenze (in µg/ml)	1,6
	Präzision (in %)	5,96
	Linearität	1–40 µg/ml, r ² = 0,999

In der beschriebenen HPLC-Methode eluieren Quercetin und Quercitrin gemeinsam. Der entsprechende Peak im Chromatogramm wurde als Quercitrin bestimmt. Alle Proben wurden jeweils dreifach injiziert.

HPLC-Methode 2

Zweck	schnelle Quantifizierung von Rutin
Gerät	HPLC-Anlage Waters (Eschborn) mit Pumpe Delta 600, Autosampler 717plus und Photodiode Array Detector 2996
Stationäre Phase	Eurospher-100, 250x4mm, 5 µm, RP 18 (Knauer, Berlin)
Mobile Phase	isokratisch Acetonitril/Essigsäure 2 % (80+20, V/V)
Detektion	UV 355 nm
Temperatur	30 °C
Flow	1,0 ml/min
Injektionsvolumen	20 µl
Validierungsparameter	
Linearität	0,5–50 µg/ml, $r^2 = 0,997$
Präzision (in %)	4,77
Nachweisgrenze (in µg/ml)	1,5

Alle Proben wurden jeweils doppelt injiziert.

HPLC-MS-Methode 1

Zweck	Quantifizierung von Rutin in geringen Konzentrationen
Gerät	Waters 600 E HPLC
Autosampler	Waters Wisp 712
Detektor	SSQ 710 Massenspektrometer (Thermo Finnigan, San José, USA)
Säule	Nucleosil 120-3 C8, 125x2 mm (Macherey & Nagel, Düren)
Kapillartemperatur	250 °C
Injektionsvolumen	10 µl
Elutionsmittel	70 ml Methanol + 30 ml Aqua bidest. + 0,04% Eisessig
Flußrate	0,2 ml/min
Elektronenspray-Ionisierung	4,5 kV
Scan-Mode	SIM negativ, m/z 609,2
Collision induced dissociation	10 V
Validierungsparameter	
Linearität	0,02–2 µg/ml, $r^2 = 0,999$
Präzision (in %)	2,42
Nachweisgrenze (in µg/ml)	0,02

Alle Proben wurden jeweils doppelt injiziert.

CE-Methode 1

Zweck	Trennung und Quantifizierung von Flavonoiden und Chlorogensäure	
Gerät	HP G1600 A ^{3D} CE (Agilent Technologies, Waldbronn)	
Kapillare	unbeschichtete Quarzglas Kapillare Länge insgesamt 64,5 cm, Länge zum Detektor 56 cm Innendurchmesser 50 µm, erweiterter optischer Weg (150 µm)	
Puffer	60 mM Boratpuffer nach SÖRENSEN, pH 10,0	
Injektion	hydrodynamisch: 500 mbar · s	
Temperatur	25 °C	
Spannung	30 kV	
Detektion	auf der Kathodenseite: UV, 206 nm	
Validierungsparameter		
Rutin	Nachweisgrenze (in µg/ml)	0,5
	Präzision (in %)	2,71
	Linearität	0,5–500 µg/ml, $r^2 = 0,999$
Chlorogensäure	Nachweisgrenze (in µg/ml)	2,5
	Präzision (in %)	5,38
	Linearität	2–100 µg/ml, $r^2 = 0,999$
Hyperosid	Nachweisgrenze (in µg/ml)	1,9
	Präzision (in %)	5,75
	Linearität	1–100 µg/ml, $r^2 = 0,999$

In der beschriebenen CE-Methode migrieren Hyperosid und Quercitrin gemeinsam. Der entsprechende Peak im Elektropherogramm wurde als Hyperosid bestimmt. Alle Proben wurden jeweils dreifach injiziert.

CE-Methode 2

Zweck: Trennung und Quantifizierung von Ketoprofen, Ketoprofen-Photoproducten und Linolsäureperoxiden

Die simultane Bestimmung des Ketoprofen-Gehaltes und der photochemisch gebildeten Linolsäureperoxide (bestimmt als 13-HPODE) wurde mit Hilfe eines „Capillary Electrophoresis Systems“ der Firma Dionex (Sunnyvale, CA, USA) bei einer Wellenlänge von 234 nm durchgeführt. Als Trennkapillare diente eine 50/45 cm lange Fused-silica-Kapillare (I.D. 75 µm) von Supelco (Deisenhofen, Deutschland). Für alle kapillarelektrophoretischen Untersuchungen wurde als Grundelektrolyt eine wässrige 10 mM Boraxlösung eingesetzt. Die Signalaufzeichnung und Integration der Peakflächen erfolgte mit der Gerätesoftware BORWIN 2.1. (Jasco, Groß-Umstadt). Die Methode wurde von RADSCHUWEIT entwickelt und ist ausführlich in [142] beschrieben. Alle Proben wurden jeweils doppelt injiziert.

CE-Methode 3

Zweck: Quantifizierung des Sauerstoffverbrauchs und der Entstehung von H₂O₂

Der Sauerstoffverbrauch und die Entstehung von H₂O₂ wurde mit Hilfe einer CE-Methode mit elektrochemischer Detektion bei einer Kathodenspannung von -600 mV quantifiziert. Die Injektion erfolgte elektrokinetisch (17,5 kV für 1 s), die Trennung mit einer Spannung von 17,5 kV in einer unbeschichteten Quarzglas Kapillare (Supelco,

Deisenhofen) mit einer Länge von 50 cm und einem Innendurchmesser von 25 μm . Der verwendete Puffer war 10 mM Natriumtetraborat. Die Methode wurde von RADSCHUWEIT entwickelt und ist ausführlich in [141] beschrieben. Alle Proben wurden jeweils doppelt injiziert.

Validierung der Methoden

Die Validierung der Methoden erfolgte anhand der ICH-Guideline „Note for Guidance on Validation of analytical procedures: Methodology“ [76].

Linearität: Regressionsanalyse der Werte aus Dreifach-Injektionen mit mindestens fünf Konzentrationen im erwarteten Konzentrationsbereich der Proben

Präzision: Die Wiederholpräzision wurde als Mittelwert der relativen Standardabweichung von Dreifachinjektionen von drei Konzentrationen bestimmt.

Nachweisgrenze: Die Nachweisgrenze wurde auf der Basis der Standardabweichung von Achsenabschnitt und Steigung der Regressionsgeraden berechnet (Nachweisgrenze = $3,3 \cdot \sigma/S$, wobei σ = Standardabweichung des Achsenabschnittes und S = Geradensteigung) und durch Injektion einer entsprechenden Konzentration des Analyten verifiziert.

3.2 Herstellung und Charakterisierung der Extrakte

Herstellung der Flüssigextrakte

5 g Buchweizenkraut wurden mit 100 ml des jeweiligen Lösungsmittels versetzt und über den angegebenen Zeitraum von 24 Stunden bzw. 2 Stunden bei 25 °C bzw. 60 °C in einem Wasserbad bewegt. Nach Beendigung der Extraktion wurde das Menstruum durch Filtration von der Droge getrennt.

Gefriertrocknung

Von einer genau gewogenen Menge Flüssigextrakt wurde unter Vakuum der Ethanol-Anteil entfernt und der verbliebene wäßrige Anteil mit Hilfe von Trockeneis im Shell-Freeze-Verfahren in einem Rundkolben eingefroren. Darauf schloß sich die Gefriertrocknung (Anlage Alpha 2-4 mit Anlagensteuerung LDC-1M, Fa. Christ, Osterode, Deutschland) an. Dazu wurde vorher der Eiskondensator auf -85 °C gekühlt und ein Vakuum von < 1 mbar angelegt. Die Trocknung wurde als abgeschlossen angesehen, sobald der Rundkolben wieder Raumtemperatur angenommen hatte. Der Trockenextrakt wurde ausgewogen und in einem Braunglasgefäß bei 2–8 °C aufbewahrt.

Bestimmung Trockenrückstand

In Anlehnung an die Monographie Extrakte der Ph. Eur. 1997 wurden in einem Wägegöläschen mit flachem Boden ca. 2 g Flüssigextrakt, genau gewogen, eingefüllt und 3 Stunden im Trockenschrank bei 100–105 °C belassen. Bis zum Abkühlen der Wägegöläschen auf Raumtemperatur verblieben diese im Exsikkator über Calciumchlorid. Im Anschluß daran wurde wiederum gewogen. Das Ergebnis wird in % (m/m) angegeben.

Quantifizierung von Fagopyrin

Die Quantifizierung von Fagopyrin erfolgte UV-photometrisch in Anlehnung an die Hypericin-Bestimmung in Johanniskraut nach dem Europäischen Arzneibuch, 4. Ausgabe. 20 mg des gefriergetrockneten Extraktes wurden in 10 ml Methanol gelöst und nach Filtration bei 590 nm am UV/VIS-Photometer Shimadzu 1202 (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Deutschland) vermessen. Als Referenz diente Hypericin.

Gehalt phenolische Substanzen

Der Gesamtgehalt an phenolischen Substanzen wurde mittels der Preußisch-Blau-Methode bestimmt (nach PRICE et al. [139]). Dazu wurden 2 ml eines entsprechend verdünnten Flüssigextraktes mit 2 ml einer 0,008 M $K_3Fe(III)(CN)_6$ -Lösung und 2 ml einer 0,1 M $FeCl_3$ -Lösung in 0,1 M HCl versetzt. Nach 10 Minuten wurde die Absorption bei 720 nm gegen einen entsprechenden Blindwert am UV/VIS-Photometer Shimadzu 1202 (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Deutschland) gemessen. Als Standard diente Rutin. Der Gehalt an phenolischen Substanzen wird in $\mu\text{g/ml}$ phenolische Substanzen, berechnet als Rutin, angegeben.

Antioxidative Eigenschaften DPPH

Für die Messung wurden die gefriergetrockneten Extrakte in Methanol 100 % zu einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. DPPH lag in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ vor. In Anlehnung an FUKUMOTO et al. wurden die Messungen in Mikrotiterplatten (96 Wells, BMG Labtechnologies, Offenburg, Deutschland) vorgenommen [54]. Dazu wurden 100 μl gelöster Extrakt mit 100 μl DPPH versetzt, und nach 2, 5 und 10 Minuten wurde die Absorption bei 540 nm gemessen (Mikrotiterplatten-Reader Polar Star Galaxy, BMG Labtechnologies, Offenburg, Deutschland). Zwischen den einzelnen Messungen wurde die Mikrotiterplatte zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten abgedeckt. Jede Messung wurde dreimal durchgeführt. Als Blindwert diente eine Mischung aus 100 μl Extrakt und 100 μl Methanol, als 100 %-Kontrolle eine Mischung aus 100 μl DPPH und 100 μl Methanol. Die Berechnung der antioxidativen Aktivität wurde wie folgt durchgeführt:

$$AA(\%) = 100 - (100 \cdot (A_c - A_b)/A_c)$$

wobei A_s = Absorption der Probe, A_b = Absorption des Blindwertes und A_c die Absorption der 100 %-Kontrolle.

Bestimmung der Grünfärbung

An den nativen Flüssigextrakten, ggf. nach entsprechender Verdünnung, wurde am UV/VIS-Photometer Shimadzu 1202 (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg) die Absorption bei 650 nm bestimmt.

Gehaltsbestimmung der Drogen

50 mg der pulverisierten Droge wurden mit 10 ml Methanol 80 % 30 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Nach der Filtrierung erfolgte die Quantifizierung des Rutins mit Hilfe der CE-Methode 1.

3.3 Charakterisierung der UV-Absorptionsfähigkeit

Alle Parameter wurden, soweit nicht anders angegeben, aus Spektren berechnet, die von Lösungen der betreffenden Substanzen in Methanol 80 % aufgenommen wurden (HP 8452A Spektrophotometer, Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland). Die eingesetzten Konzentrationen waren: Rutin und Uvinul MS 40 0,02 g/l, Extrakt 0,1 g/l. Die Berechnung der Parameter erfolgte nach den folgenden Formeln:

- kritische Wellenlänge λ_c [57]

$$\int_{290 \text{ nm}}^{\lambda_c} A(\lambda) \cdot \delta\lambda = 0,9 \cdot \int_{290 \text{ nm}}^{400 \text{ nm}} A(\lambda) \cdot \delta\lambda \quad (3.1)$$

- UVA/UVB-Quotient R [57]

$$R = \frac{\int_{320 \text{ nm}}^{400 \text{ nm}} A(\lambda) \cdot \delta\lambda / \int_{320 \text{ nm}}^{400 \text{ nm}} \delta\lambda}{\int_{290 \text{ nm}}^{320 \text{ nm}} A(\lambda) \cdot \delta\lambda / \int_{290 \text{ nm}}^{320 \text{ nm}} \delta\lambda} \quad (3.2)$$

- Einsatzkonzentration c_{\min} (%) [73]

$$c_{\min}[\%] = \frac{-\lg(0,02) \cdot 1000}{\text{spA}_{\max} \cdot d} \quad (3.3)$$

- Einsatzkonzentration nach Australischem Standard c_{\min} AS (%) [71]

$$c_{\min} \text{ AS}[\%] = \frac{-\lg 0,1}{\text{spA}_{\min(320-360\text{nm})} \cdot 0,0008 \text{ cm}} \quad (3.4)$$

Die spezifische Absorption spA wurde jeweils aus den Spektren nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz für eine Schichtdicke von 1 cm und eine Konzentration von 1 % berechnet. spA_{\max} wurde jeweils am Absorptionsmaximum des entsprechenden Wellenlängenbereiches berechnet, $\text{spA}_{\min(320-360\text{nm})}$ am Absorptionsminimum im Wellenlängenbereich 320–360 nm.

3.4 Untersuchungen zur Wirksamkeit

Verhinderung der Ketoprofen-induzierten Linolsäure-Peroxidation

Zu 5 ml einer 2 mM Linolsäure-Lösung in 0,01 M Natriumtetraborat-Lösung wurden 2,5 ml einer 1 mM Ketoprofen-Lösung in Phosphatpuffer pH 7 (10 mM) sowie je nach Versuchsanordnung 0,6 ml, 1,2 ml bzw. 2,5 ml einer 5 mg/ml Buchweizenextrakt-Lösung in 0,01 M Natriumtetraborat-Lösung gegeben und mit Phosphatpuffer pH 7 auf 10 ml ergänzt, so daß sich die folgenden Konzentrationen ergaben: 1 mM Linolsäure, 0,25 mM Ketoprofen sowie 0,3 mg/ml, 0,6 mg/ml bzw. 1,25 mg/ml Buchweizenextrakt. Zur Berechnung der äquivalenten Mengen an Uvinul MS 40 wurden UV-Spektren von Extrakt und Uvinul MS 40 in den entsprechenden Lösungsmitteln aufgenommen. Durch Integration der Absorptionsflächen im UVA-Bereich wurden die Konzentrationen an Uvinul MS 40 berechnet zu 0,21 mg/ml, 0,42 mg/ml und 0,89 mg/ml.

Alle Proben wurden für die Bestrahlung in Planschliffgläser mit einem Innendurchmesser von 5,1 cm überführt und unter ständigem Rühren (Variomag Electronicrührer Poly 15) verschiedenen UVA-Dosen ($1\text{--}5\text{ J/cm}^2$) ausgesetzt. Die Bestrahlung erfolgte mit CLEO Performance R UVA-Leuchtstoffröhren mit einem Emissionsspektrum von 305 nm bis 420 nm (Veith Import-Export, Westerau). Für die Bestimmung der UV-Dosen wurde ein UVA-Sensor (Kühnast Strahlungstechnik, Wächtersbach) eingesetzt. Um eine Verdunstung des Lösungsmittels während der Bestrahlung zu vermeiden, wurden alle Probengefäße während der Bestrahlung mit Quarzplatten abgedeckt. Der Abstand zwischen den UV-Lampen und der bestrahlten Probenlösung betrug bei allen Untersuchungen 18 cm. Die Quantifizierung von Ketoprofen, Ketoprofen-Photoprodukten sowie Linolsäure-Peroxidationsprodukten erfolgte mittels CE-Methode 2.

3.5 Zellkultur

Kultivierung und Versuchsdurchführung

Die Zellkulturuntersuchungen erfolgten unter Verwendung von HaCaT-Keratinocyten (Prof. Fusenig, DKFZ Heidelberg). Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte als Monolayer mit einer Aussaatdichte von ca. 10^5 Zellen/ml. Als Kulturmedium diente DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 10 % fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin und 0,05 mg/ml Gentamycin. Mit Erreichen der Konfluenz wurden diese passagiert und in 96-well-Platten ausgesät. Bis zum Versuchsbeginn wurden die Zellen bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 für 24 Stunden inkubiert.

Nach Entfernen des bisherigen Mediums wurden die Keratinozyten 24 Stunden mit einer Lösung des Extraktes im Medium (1 mg/ml) inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt und durch Extrakt-haltiges PBS (ebenfalls 1 mg/ml) ersetzt. Jeweils eine Mikrotiterplatte wurde mit 8 J/cm^2 UVA bzw. 100 mJ/cm^2 UVB bestrahlt. Die unbestrahlte Kontrolle wurde in der Zwischenzeit mit Alufolie abgedeckt. Nach dem Ende der Bestrahlung wurde das PBS durch reines Medium ersetzt, und die Zellen wurden für weitere 2 Stunden inkubiert. Danach wurde die Bestimmung der Lebendzellzahl mit Hilfe des Kristallviolett-Testes durchgeführt.

Kristallviolett-Assay

In jedem Well wurde das Medium entfernt, und die Zellen wurden durch Zugabe von 100 μl Methanol für 10 min fixiert. Das Methanol wurde entfernt, und 100 μl Kristallviolettlösung (0,1 % in Ethanol 5 % (V/V)) wurden für 10 min dazugegeben. Nach Entfernung der Kristallviolettlösung wurde zum Lösen des gebundenen Farbstoffes in jedes Well 100 μl Natriumcitratlösung (1,45 % in Ethanol 50 % (V/V)) gegeben und 10 Minuten geschüttelt. Danach wurde die Absorption in einem Mikrotiterplattenreader bei 620 nm bestimmt. Der Assay beruht darauf, daß sich lediglich vitale Zellen anfärben lassen [51].

3.6 HET-CAM-Versuche

Die natürlich befruchteten Hühnereier von der Hühnerrasse „New Hampshire“ wurden am Legetag durch das Nutztierwissenschaftliche Zentrum Merbitz der MLU Halle bereitgestellt. Die Eier wurden über 8 Tage bei 37 °C und 55 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank bebrütet und dabei (außer in den letzten 24 Stunden) alle 12 Stunden gewendet.

Nach Ablauf der Brutzeit wurden die Eier am schwächer konvexen Pol mit mikrochirurgischen Instrumenten eröffnet, die äußere Eihaut entfernt und die CAM freigelegt. Es wurden nur Eier mit einem gut ausgebildeten Gefäßsystem sowie einem deutlich vitalen Embryo verwendet. Als Testlösungen wurden jeweils 100 µl PBS bzw. das gleiche Volumen an Extraktlösung in PBS (1 mg/ml) verwendet. Für die Bestrahlungsversuche wurden die Eier mit 5 J/cm² UVA (PUVA 200, Waldmann Medizintechnik) bzw. 120 mJ/cm² UVB (UV 801 BL, Waldmann Medizintechnik) bestrahlt. Nach 25 Minuten wurde mit Hilfe der Laser-Doppler-Fluxmetrie die Gefäßperfusion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt [176].

3.7 Photostabilität

Sauerstoffverbrauch

Der Sauerstoffverbrauch bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht wurde analog zu [141] mittels einer CE-Methode mit elektrochemischer Detektion (CE-Methode 3) bestimmt. Der Extrakt wurde dazu in 10 mM Borax gelöst und aus einer Entfernung von 25 cm mit einem 50 W Halogenstrahler (Osram Decostar 51S) für insgesamt 15 min bestrahlt.

Photostabilität Festfilm

Auf 5 cm² große Glasplatten wurden 200 µl einer 1 mg/ml Rutin-Lösung (entsprechend 200 µg Rutin), 200 µl einer 1 mg/ml Uvinul MS 40-Lösung (entsprechend 200 µg Uvinul MS 40) bzw. 500 µl einer 2 mg/ml Extrakt-Lösung in Methanol 80 % (V/V) (entsprechend 1000 µg Extrakt bzw. 200 µg Rutin) aufgetragen. Nachdem die Lösung zu einem Film eingetrocknet war, wurden die Glasplatten mit 5 J/cm² UVA, 120 mJ/cm² UVB (CLEO Performance R UVA- bzw. UVB-Leuchtstoffröhren, Veith Import-Export, Westerau) bzw. 1 Stunde mit sichtbarem Licht (Osram Decostar 51S, 50 W Halogenstrahler aus 40 cm Entfernung) bestrahlt. Die eingesetzten Strahlungsdosen entsprechen (gemessen im Juni im Mittelmeerraum) einer Bestrahlungszeit von 20 min (für die UVA-Dosis) bzw. 12 min (für die UVB-Dosis) [154]. Für die Bestimmung der UV-Dosen wurden ein UVA- und UVB-Sensoren (Kühnast Strahlungstechnik, Wächtersbach) eingesetzt. Danach wurden die Filme in Meßkolben mit Methanol 80 % (V/V) gespült und auf 10 ml aufgefüllt. Von den Lösungen wurden Spektren im Bereich 200–800 nm aufgenommen und ausgewertet. Zusätzlich wurde der Gehalt an Rutin bzw. Uvinul MS 40 mittels CE-Methode 1 bestimmt.

Photostabilität Lösung

Rutin und Extrakt wurden in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,0 bzw. 10 mM Borax (pH 8,5) gelöst und in mit Quarzglasplatten abgedeckten Kristallisierschalen analog

zur Prüfung der Festfilm-Photostabilität bestrahlt. Die Bestrahlung mit sichtbarem Licht wurde allerdings auf 30 min aus 20 cm Entfernung geändert. Nach der Bestrahlung wurden jeweils UV-Spektren aufgenommen sowie der Rutingehalt mittels CE-Methode 1 bestimmt.

3.8 Präformulierungsstudien

Untersuchung zur Hygroskopizität

Der Extrakt wurde, genau gewogen, in offenen Petrischalen in Kammern eingebracht, in denen mit gesättigten Salzlösungen definierte relative Luftfeuchten eingestellt worden waren ($T = 22\text{ °C}$). Zum Einsatz kamen Lithiumchlorid (11 % r. F.), Kaliumacetat (22 % r. F.), Magnesiumchlorid (32 % r. F.), Kaliumcarbonat (43 % r. F.), Magnesiumnitrat (52 % r. F.), Kaliumiodid (68 % r. F.), Natriumchlorid (75 % r. F.), Kaliumbromid (80 % r. F.) und Bariumchlorid (90 % r. F.). Nach einer Woche wurden die Proben ($n=2$) erneut gewogen und die mittlere Gleichgewichtsfeuchte (EMC) nach CALLAHAN [25] mit Hilfe der folgenden Gleichungen bestimmt:

$$P = \frac{[(W \cdot A/100) + B] * 100}{W - (W \cdot A/100)} \quad (3.5)$$

$$EMC = \frac{P}{P + 100} \quad (3.6)$$

wobei $P =$ % Feuchte bezogen auf die Trockenmasse, $B =$ Gewichtsveränderung im Gleichgewicht, $A =$ % Feuchte zu Beginn und $W =$ Probengewicht zu Beginn in g. A wurde als Trocknungsverlust bestimmt (3 Stunden bei 60 °C im Trockenschrank, danach 1 Stunde über Blaugel im Exsikkator) und betrug $2,89 \pm 0,44\%$ ($n=3$).

Untersuchung zur Löslichkeit

Buchweizenextrakt bzw. Rutin wurden im Überschuß zu den jeweiligen Lösungsmitteln gegeben und 3 Stunden bei 32 °C unter gelegentlichem Umschütteln temperiert. Der jeweilige Überstand wurde zentrifugiert, bis sich eine klare Lösung ergab und zusätzlich durch einen Spritzenfilter filtriert. Die Quantifizierung des Rutins erfolgte mittels HPLC-Methode 2.

Verteilungskoeffizient

Rutin und Extrakt wurden jeweils in 67 mM Phosphatpuffer nach SÖRENSEN pH 5,5 bzw. 7,4 (gesättigt mit Oktanol) gelöst (= Stammlösung) und mit gleichen Volumina Oktanol (gesättigt mit dem jeweiligen Phosphatpuffer) versetzt. Die verschlossenen Ampullen wurden 3 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt, um eine Gleichgewichtseinstellung zu ermöglichen. Danach wurden die Phasen getrennt und der Rutingehalt der Wasserphase mittels CE-Methode 1 bestimmt. Der Verteilungskoeffizient $\log P$ wurde mit Hilfe der folgenden Gleichung berechnet:

$$\log P = \lg [(c_o - c_w)/c_w] \quad (3.7)$$

wobei $c_o =$ Konzentration der Stammlösung und $c_w =$ Konzentration in der Wasserphase.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der verwendeten Mikroemulsionen

IPP-ME		Planta-ME	
Tagat O2	8,0	Plantacare 2000 UP	8,0
Synperonic PE/L 101	12,0	Synperonic PE/L 101	12,0
Isopropylpalmitat	5,0	Pelemol BIP	5,0
Propylenglykol	50,0	Propylenglykol	50,0
Wasser	25,0	Wasser	25,0

Untersuchungen an Mikroemulsionen

Die verwendeten Mikroemulsionen wurden zuvor am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entwickelt [72, 79]. Die Zusammensetzung der Mikroemulsionen ist in Tab. 3.1 dargestellt.

Die Mikroemulsionen bilden sich spontan aus den Einzelbestandteilen. Tagat O2 (Polyoxyethylenglycerolmonooleat) ist ein nichtionogener O/W-Emulgator (HLB-Wert 15,0). Von Humanhaut wird das Tensid in 100%iger Konzentration reaktionslos getragen. Synperonic PE/L 101 (Poloxamer 331) ist ein nichtionogene W/O-Emulgator aus der Gruppe der Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockpolymere (Poloxamere) mit einem HLB-Wert von 1,0. Isopropylpalmitat ist ein synthetisches Wachs. Die nicht hautreizende Substanz zeichnet sich durch gutes Spreitungs- und Permeationsvermögen aus und wird als lipophiler Bestandteil in Dermatika verwendet [49]. Bei Pelemol BIP handelt es sich um eutektisches Gemisch aus N-Butylphthalimid und N-Isopropylphthalimid, das über gute Lösungseigenschaften verfügt. Es wird häufig als Lösungsmittel für UV-Filter eingesetzt. In einer Humanstudie wurde Pelemol BIP als gut hautverträglich und nicht-irritierend eingestuft [130]. Plantacare 2000 UP gehört zu den sogenannten Zuckertensiden und besteht aus einer wässrigen Lösung eines mit Fettalkoholen der Kettenlänge C8-C16 veretherten Polyglykosids. Es handelt sich um ein nichtionisches Tensid mit guter dermatologischer Verträglichkeit [136].

3.9 Stabilitätsuntersuchungen

Stabilität des Extraktes in Abhängigkeit von der relativen Feuchte

Um den Einfluß der Umgebungsbedingungen auf die Stabilität des Extraktes zu untersuchen, wurde der Extrakt in Kammern mit definierten relativen Luftfeuchten (11 % r. F., eingestellt mit Lithiumchlorid und 57 % r. F., eingestellt mit Natriumbromid) aufbewahrt und nach Lösen des Extraktes in Methanol 50 % der Gehalt an Rutin und Chlorogensäure nach definierten Zeitabständen mittels CE-Methode 1 untersucht. Die Einwaagen wurden jeweils um den Wasserverlust bzw. die Wasserzunahme, bezogen auf den frisch hergestellten Extrakt, korrigiert.

Stabilität des Extraktes in topischen Formulierungen

Um die Stabilität des Extraktes in verschiedenen Formulierungen zu untersuchen, wurden jeweils 2 % Trockenextrakt in Basiscreme DAC (BC) und Lipophile Cremegrundlage NRF 11.104 (LC) eingearbeitet. Basiscreme DAC wurde als Fertigware verwendet,

Tabelle 3.2: Zusammensetzung von Basiscreme DAC und der Lipophilen Cremegrundlage NRF 11.104

Basiscreme DAC		Lipophile Cremegrundlage	
Glycerolmonostearat 60	4,00	Lipidgrundlage Pionier KWH Pharma	30,00
Cetylalkohol	6,00	Kaliumsorbit	0,14
Mittelkettige Triglyceride	7,50	Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,50
Weißes Vaseline	25,50	Glycerol 85%	5,00
Macrogol-1000-glycerolmonostearat	7,00	Wasserfreie Citronensäure	0,06
Propylenglycol	10,00	Wasser	ad 100,00
Wasser	ad 100,00		

die Lipophile Cremegrundlage wurde nach Tab. 3.2 hergestellt. Die Lipidgrundlage Pionier KWH Pharma besteht aus Hydrophobem Basisgel DAC, Isopropylpalmitat sowie dem nichtionischen Emulgator Triglyceridiisostearat (HLB-Wert 6,5) im Massenverhältnis 82+8+10.

Die Ansätze der halbfesten Formulierungen wurden geteilt und jeweils die eine Hälfte unter normalen Umgebungsbedingungen, die andere Hälfte im Kühlschrank aufbewahrt. Nach 1, 4, 8 und 12 Wochen wurden aus jedem Gefäß zwei Proben entnommen, mit 2 ml Methanol 80 % versetzt und 20 Minuten bei 30 °C im Ultraschallbad extrahiert. Nach Filtration wurde bei den Proben mittels CE-Methode 1 der Rutingehalt bestimmt. Die extrakthaltigen Mikroemulsionen wurden lediglich bei Raumtemperatur aufbewahrt und zur Gehaltsbestimmung entsprechend den halbfesten Formulierungen aufgearbeitet.

Stabilisierung mit Ascorbinsäure

Der Extrakt wurde in 10 mM Phosphatpuffer pH 7 gelöst (Endkonzentration 300 µg/ml). Die Hälfte der Proben wurde mit Ascorbinsäure (Endkonzentration 600 µg/ml) versetzt. Die Lagerung erfolgte in dicht verschlossenen Reagenzgläsern bei 40 °C über 24 Stunden im Trockenschrank. Nach der Inkubation wurden die Proben mittels CE-Methode 1 auf ihren Rutingehalt untersucht.

3.10 Liberationsuntersuchungen am Mehrschichtmembranmodell

Die Liberationsuntersuchungen aus den verschiedenen topischen Formulierungen wurden am Mehrschichtmembranmodell nach Fürst-Neubert durchgeführt. Das Modell besteht aus einer Grund- und einer Deckplatte aus Polyacryl, zwischen denen Einzelzellen für Parallelbestimmungen positioniert werden können. Eine derartige Zelle setzt sich aus einer Grundscheibe, einer Schablone mit einer Aussparung von 4 cm² zum Auftragen der Formulierung und einer Deckscheibe, die den oberen Abschluß der Zelle bildet, zusammen. Zwischen Grundscheibe und Schablone wird die für den jeweiligen Versuch benötigte Anzahl von Membranen plaziert [119]. Zum Einsatz kamen hier

pro Zelle drei 2%ige Glycerol-Collodium-Membranen, bei denen Collodium als membranstabilisierende Matrix und Glycerol als hydrophiler Akzeptor dient. Die Lösung zur Herstellung der Membranen bestand aus 4 g wasserfreiem Glycerol, 100 g einer Ether/Ethanol-Mischung (85+15, V/V) sowie 96 g einer 4%igen Collodiumlösung. Ca. 110 ml dieser Mischung wurden mit Hilfe eines Filmziehgerätes (Eigenbau Mechanische Werkstatt, FB Pharmazie, MLU Halle) bei definierter Spaltbreite gleichmäßig auf einer Glasplatte verteilt. Nach vollständigem Verdampfen der Lösungsmittel (ca. 4–6 Stunden) konnte die Membran von der Glasplatte abgezogen werden. Anschließend erfolgte das Ausstechen kreisförmiger Stücke, die am gleichen Tag im Mehrschichtmembranmodell verwendet wurden. Auf die oberste Membran jeder Zelle wurden ca. 20 mg Formulierung gleichmäßig aufgetragen. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 30 und 300 min bei 32 °C inkubiert. Nach der Trennung der Membranen erfolgte die Extraktion für 20 Minuten mit 2 ml Methanol 80 % (V/V) bei 30 °C im Ultraschallbad. Die Quantifizierung des liberierten Rutins erfolgte mit Hilfe der HPLC-Methode 2.

3.11 Penetrationsuntersuchungen an der Franz-Zelle

Untersucht wurde die Penetration von Rutin aus extrakthaltigen (2%) Formulierungen (Basiscreme und Mikroemulsion Planta). 25 mg der jeweiligen Formulierung wurden mit einem Füllspatel gleichmäßig auf das Hautstück (aus Mammareduktionsplastiken) aufgebracht und homogen verteilt. Als Akzeptor dienten 20 ml PBS (temperiert auf 37 °C). Nach dem festgelegten Untersuchungszeitraum von 30 bzw. 300 Minuten wurde das Hautstück von der Gaze genommen und der auf der Hautoberfläche zurückgebliebene überschüssige Vehikelrückstand mit Hilfe eines Watteträgers vorsichtig und ohne Druckanwendung entfernt. Zur weiteren Aufarbeitung des Hautmaterials erfolgte die vollständige Entfernung des Stratum corneums durch 20 Tesafilmabrisse unter leichter, gleichmäßiger Druckanwendung (definierte Kreisfläche: $d=1,6$ cm, entsprechend $2,01$ cm²). Die Abrisse wurden fraktioniert, wobei die ersten 8 Abrisse gepaart und bei den folgenden jeweils 3 Abrisse gepoolt gesammelt wurden. Bei dieser sogenannten „Tape-stripping“-Methode handelt es sich um ein etabliertes Verfahren, bei dem mit 20 Tesafilmabrissen das Stratum corneum quantitativ entfernt werden kann [86]. Zur Erfassung der penetrierten Wirkstoffmenge in der lebenden Epidermis und Dermis wurden pro Hautstück drei Stanzbiopsien ($d=0,6$ cm, entsprechend $0,28$ cm²) entnommen. An einem Gefriermikrotom erfolgte die horizontale Zerlegung in separate Schichten festgelegter Schichtdicke. Von jeder Stanzbiopsie der Epidermis wurden 20 µm Schnitte (gepoolt in zwei Fraktionen à 4 Schnitte) und von der Dermis 40 µm Schnitte (gepoolt in drei Fraktionen à 10 Schnitte) angefertigt.

Die Extraktion von Rutin aus den einzelnen SC-Abrissen erfolgte mit jeweils 1 ml Methanol und aus den Epidermis- und Dermisproben mit je 0,2 bzw. 0,5 ml Methanol für 60 min, bevor sich eine Zentrifugation bei 10000 U/min für 15 Minuten anschloß (Zentrifuge Janetzki TH 12). Außerdem wurde der Rutingehalt in der Formulierung, im Watteträger, in den unaufgeschnittenen Stanzenresten und in der Akzeptorflüssigkeit bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der HPLC-MS-Methode 1.

3.12 Statistische Auswertung

Die Auswertung des Versuchsplanes erfolgte nach [90] mit Hilfe des Programmes Microsoft Excel 2000. Zur Berechnung der Effekte der Faktoren und der Wechselwirkungen wurden jeweils die Differenzen der Mittelwerte auf dem unteren bzw. oberen Niveau der Faktorstufen unter Berücksichtigung der jeweiligen Vorzeichen gebildet. Die Signifikanz der Effekte wurde durch Vergleich mit der Breite der Konfidenzintervalle auf der Grundlage der mittleren Effektstandardabweichung festgestellt. Die statistische Auswertung der weiteren Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 2.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Die Daten wurden nach logarithmischer Transformation einer einfaktoriellen Varianzanalyse und dem Newman-Keuls-Test als post-hoc-Test unterworfen. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant gewertet. Die Regressionsanalysen wurden mit Microsoft Excel 2000 durchgeführt.

3.13 Verwendete Substanzen

Acetonitril und Methanol (HPLC grade)	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Chlorogensäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Collodium 4% DAC	Caesar & Loretz (Caelo), Hilden
DPPH	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Hypericin	W. Schwabe, Karlsruhe
Hyperosid	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Lipidgrundlage Pionier KWH Pharma	Hansen & Rosenthal, Hamburg
Pelemol BIP	Phoenix Chemical, Inc., Somerville, USA
Plantacare 2000 UP	Cognis, Düsseldorf
Quercetin	Roth, Karlsruhe
Rutin	Acros Organics, Geel, Belgien
Synperonic PE/L 101	C. H. Erbslöh, Krefeld
Tagat O2	Synopharm GmbH, Barsbüttel
Uvinul MS 40	BASF, Ludwigshafen

Alle anderen Chemikalien stammen, soweit nicht anders vermerkt, von Merck, Darmstadt. Nicht gesondert aufgeführte Rezepturbestandteile wurden bei Caelo, Hilden, erworben. Für die Herstellung der Proben, Laufmittel und Puffer wurde entionisiertes Wasser (Reinstwasseranlage Maxima, Fa. Elga) verwendet.

Als Ausgangsmaterial für die Extrakterstellung dienten zwei verschiedene Herkünfte von Buchweizenkraut (Agrargenossenschaft Calbe und Fa. Caelo). In den untenstehenden Tabellen finden sich die Anbauparameter für die Calbe-Droge sowie das Analysenzertifikat der Caelo-Droge.

Anbauparameter der Calbe-Droge	
Aussaat	18.05.1998
Aussaatmenge	60 kg/ha
Düngung	keine
Pflanzenschutzmaßnahmen	keine
Ernte	17.07.1998
Trocknung	3 Tage bei 45 °C
Gehalt Rutin	keine Angabe

Analysenzertifikat der Caelo-Droge	
Datum der Prüfung	18.10.2000
Eigenschaften	entspricht
Identität (DC)	entspricht
Reinheit	entspricht
Asche	9,4 %
Trocknungsverlust	7,6 %
Fremde Bestandteile	< 2 %
Gehalt (bestimmt als Hyperosid)	2,5 %
Gehalt (berechnet als Rutin ^a)	5,7 %

^aDie Umrechnung erfolgte über die in der DAC-Monographie angegebene Formel zur Gehaltsbestimmung.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Einfluß der Extraktionsparameter auf die phytochemischen Eigenschaften des Extraktes

Um einen Trockenextrakt zu erhalten, der den Anforderungen an moderne Phytopharmaka genügt, wurde der Einfluß der Extraktionsparameter auf die phytochemischen Eigenschaften untersucht. So wird der Besonderheit von Phytopharmaka Rechnung getragen, daß in Arzneipflanzen sowohl erwünschte als auch unerwünschte Stoffe vorkommen und durch das Extraktionsverfahren in unterschiedlichen Anteilen in den Extrakt gelangen können [44]. Die Herausforderung liegt in der Entwicklung eines Extraktes, der einen möglichst hohen Flavonoidanteil enthält und gleichzeitig durch ein einfaches Verfahren hergestellt werden kann. Um einen Aufreinigungsschritt zu vermeiden, sollen die Anforderungen über die Einstellungen der Versuchsparameter erreicht werden. Zusätzlich sollte die Reproduzierbarkeit der Herstellungsbedingungen den Gewinn standardisierter Extrakte garantieren.

4.1.1 Anlage der Versuchsreihe

Als Grundverfahren für die Extraktion wurde die Mazeration gewählt. Bei der Mazeration handelt es sich um kein Verfahren, bei der die Droge erschöpfend extrahiert wird, sondern es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Droge und Miscella ein. Dieser scheinbare Nachteil wird aber durch die Preisgünstigkeit der Droge relativiert. Außerdem soll ein Trockenextrakt hergestellt werden, so daß es günstig ist, wenn weniger Lösungsmittel als z. B. bei der Perkolation entfernt werden muß. Zusätzlich begünstigt

Tabelle 4.1: Einfluß von Herstellungsparametern der Bewegungsmazeration auf die Extraktqualität (modifiziert nach [55]). (): kein Einfluß bei erschöpfender Extraktion

Faktor	Ausbeute	Extraktionsgeschwindigkeit	Spektrum der Inhaltsstoffe
Extraktionsmittel (Art und Konzentration)	x	x	x
Extraktionsdauer	(x)		x
Temperatur	x	x	x
Verhältnis Droge-Extraktionsmittel	(x)		
Zerkleinerungsgrad der Droge	(x)	x	

die Gleichgewichtseinstellung die problemlose Herstellung standardisierter Extrakte, ohne daß eine zusätzliche aufwendige Einstellung erforderlich wird. Um die Gleichgewichtseinstellung zu beschleunigen, wurde nicht die herkömmliche Mazeration, sondern die Bewegungsmazeration gewählt. Mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung läßt sich systematisch der Einfluß verschiedener Faktoren auf die betrachteten Zielgrößen untersuchen. In Tabelle 4.1 sind die Faktoren aufgelistet, die die Extraktqualität bei der Bewegungsmazeration beeinflussen. Als zu untersuchende Faktoren wurden die Konzentration des Extraktionsmittels, die Temperatur sowie die Extraktionsdauer gewählt. Durch den resultierenden 2^3 -Versuchsplan lassen sich zwar keine optimalen Bedingungen finden, aber der Einfluß der Faktoren kann mit hinreichender Genauigkeit abgeschätzt werden. Die zweistufigen Versuchspläne zeichnen sich gegenüber den für Optimierungsverfahren häufig verwendeten dreistufigen vollständig faktoriellen Versuchsplänen oder den zentral zusammengesetzten Versuchsplänen durch eine geringere Anzahl an Faktorstufenkombinationen und damit durch einen wesentlich geringeren Versuchsaufwand aus [90].

Als Extraktionsmittel eignen sich Ethanol-Wasser-Mischungen, da die wesentlichen Inhaltsstoffe in diesem Medium eine gute Löslichkeit aufweisen [125]. Die ICH stuft Ethanol als Klasse 3-Lösungsmittel mit geringer Toxizität ein, während das von den Löslichkeitseigenschaften her ähnlich geeignete Methanol wegen seiner höheren Toxizität in die Klasse 2 fällt [77]. Aus diesem Grund wurde Ethanol als Extraktionsmittel der Vorzug gegeben. Die Ethanolkonzentration kann die Ausbeute durch Löslichkeitsverbesserung erhöhen. Das Inhaltsstoffspektrum ist ebenfalls stark abhängig von der Lipophilie des Extraktionsmittels. Die Faktorstufen wurden bezüglich der Konzentration auf dem Hintergrund der Überlegung gewählt, daß zum einen Flavonoide, die aus der Droge u. a. extrahiert werden sollen, relativ schlecht in Wasser, aber relativ gut in Ethanol löslich sind. Andererseits ist ein gewisser Wasseranteil aber nötig, damit die Zellwände der Droge quellen können und somit besser extrahierbar sind. Als Konzentrationsstufen für Ethanol wurden 70 % und 30 % gewählt.

Die Temperatur kann die Ausbeute durch eine verbesserte Löslichkeit der Inhaltsstoffe erhöhen und den Übergang der Extraktivstoffe in die Lösung beschleunigen. Allerdings besteht auch das Risiko, daß sich durch Zersetzungsprozesse das Inhaltsstoffspektrum verändern kann. Gewählt als Einstellungen für die Temperatur wurden 60 °C sowie 25 °C.

Die Extraktionsdauer kann ebenfalls durch einen eventuellen Abbau das Spektrum der Inhaltsstoffe beeinflussen. Außerdem kann, solange weder eine Erschöpfung der Droge noch der Gleichgewichtszustand erreicht ist, mit längerer Extraktionsdauer die Ausbeute erhöht werden.

Die beiden weiteren Faktoren werden nicht variiert, sondern konstant gehalten. Die verwendete Droge wird in der gelieferten Schnittgröße verwendet (die Schnittgröße wurde nicht gesondert bestimmt, aber in der Praxis kann man davon ausgehen, daß die Schnittgrößen für den Normalschnitt von Herba-Drogen zwischen 4 und 6 mm liegen [11]). In Untersuchungen von NIESEL konnte eine vollständige Freisetzung von Rutin aus Buchweizenkraut mit einem Ansatzverhältnis von 1:200 gewährleistet werden [125]. In den folgenden Untersuchungen wird ein für die üblichen Mazerationen relativ großzügiges Ansatzverhältnis von 1:20 gewählt, um einen Kompromiß zwischen

Tabelle 4.2: Faktorstufenkombinationen zur Extrakterstellung

Ansatz	Konzentration (% Ethanol)	Dauer (Stunden)	Temperatur (°C)
1	70	24	60
2	30	24	60
3	70	2	60
4	30	2	60
5	70	24	25
6	30	24	25
7	70	2	25
8	30	2	25

Gleichgewichtseinstellung und erschöpfender Drogenextraktion zu finden. In Tabelle 4.2 sind die Einstellungen für die Faktoren zusammengefaßt.

Zusätzlich wird außerhalb des Versuchsplans der Einfluß der verwendeten Droge untersucht. Verglichen wurden zwei Fagopyrum-Drogen, die von unterschiedlichen Herstellern bezogen wurden. Die erste Droge („Calbe-Droge“) stammt von der Agrargenossenschaft Calbe und wurde im Jahr 1998 angebaut. Als Referenz wird eine Droge der Firma Caesar & Loretz (abgekürzt mit „Caelo-Droge“) verwendet, die im Jahr 2000 angebaut wurde.

Um den Einfluß der genannten Faktoren beurteilen zu können, werden die folgenden Zielgrößen betrachtet:

1. Trockenrückstand
2. Gehalt an phenolischen Substanzen (photometrisch)
3. Grünfärbung
4. antioxidativen Eigenschaften im DPPH-Assay
5. Fagopyrin-Gehalt
6. Gehalt an Flavonoiden und Phenolcarbonsäuren (HPLC)

Die ersten drei Zielgrößen werden dabei an den nativen Flüssigextrakten untersucht, während die letzten drei Größen anhand der gefriergetrockneten Extrakte beurteilt werden. Die Versuche werden jeweils an zwei Extraktchargen durchgeführt.

4.1.2 Analytik der Flüssigextrakte

4.1.2.1 Trockenrückstand

Der Trockenrückstand eines Flüssigextraktes ist ein Maß für die Gesamtmenge an extrahierten Stoffen. Aus technologischen Gründen ist es günstig, einen hohen Trockenrückstand zu erzielen, da so für die Herstellung eines Trockenextraktes zum einen eine geringere Menge Lösungsmittel für die gleiche Ausbeute entfernt werden muß

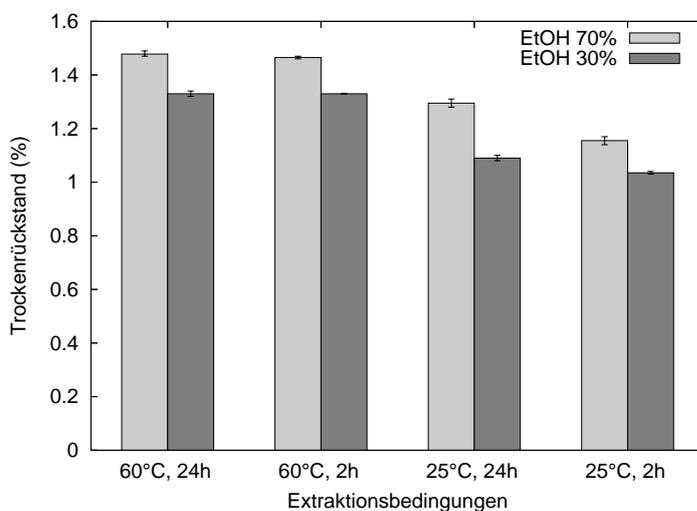


Abbildung 4.1: Trockenrückstand der Flüssigextrakte in Abhängigkeit von den Extraktionsbedingungen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von zwei unabhängigen Extraktchargen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Spannweite der beiden Einzelwerte.

sowie für die gleiche Ausbeute mit geringeren Ansätzen gearbeitet werden kann. Der Trockenrückstand gibt allerdings keinen Aufschluß über die Qualität des Extraktes. Die Ergebnisse des Versuchsplans für die Zielgröße Trockenrückstand ist in Abb. 4.1 dargestellt.

Die Faktoren Konzentration, Extraktionsdauer und Temperatur haben jeweils einen signifikant positiven Effekt auf den Trockenrückstand. Außerdem gibt es einen signifikant positiven Effekt der Wechselwirkung zwischen den Faktoren Konzentration und Extraktionsdauer sowie einen signifikant negativen Effekt der Wechselwirkung zwischen den Faktoren Temperatur und Extraktionsdauer. Der Effekt der Dreifach-Wechselwirkung zwischen den Faktoren (3FWW) ist ebenfalls signifikant negativ. Dies bedeutet, daß man für die Zielgröße Trockenrückstand alle drei Faktoren gemeinsam betrachten muß. Dabei stellt sich heraus, daß die Ausbeuten für die Extraktion bei höherer Temperatur über denen für die niedrigere Temperaturstufe liegen. Eine Verlängerung der Extraktionsdauer hat für beiden Konzentrationsstufen nur bei der niedrigen, nicht aber bei der höheren Temperatur einen Effekt. Die Ursache dafür läßt sich in einer schnellen Gleichgewichtseinstellung bei höherer Temperatur (entweder durch Sättigung des Menstruums oder durch erschöpfende Extraktion der Droge) vermuten.

4.1.2.2 Gehalt an phenolischen Substanzen

Der Gehalt an phenolischen Substanzen wird für die Flüssigextrakte in $\mu\text{g/ml}$ phenolische Substanzen, berechnet als Rutin, angegeben (s. Abb. 4.2). Er dient als Gesamtmaß für die Inhaltsstoffe der Extrakte, denen eine potentielle antioxidative Wirkung zuge-

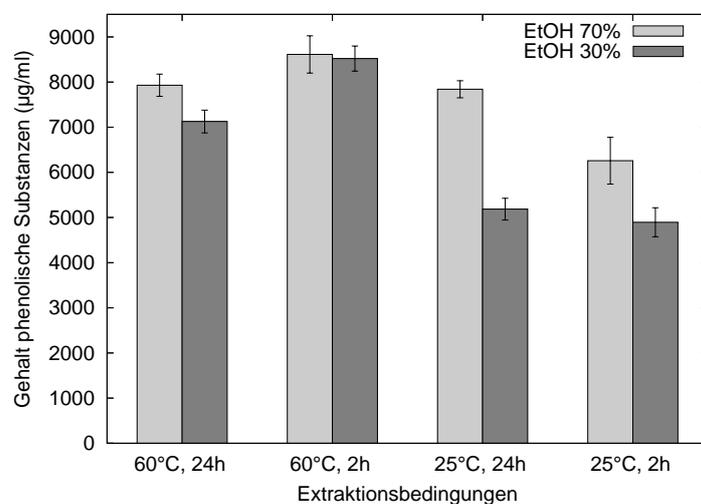


Abbildung 4.2: Gehalt an phenolischen Substanzen (berechnet als Rutin) in Abhängigkeit von den Extraktionsbedingungen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von zwei unabhängigen Extraktchargen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Spannweite der beiden Einzelwerte.

sprochen wird. Eine Gesamtbestimmung ist deswegen sinnvoll, da im Buchweizenkraut auch antioxidative Substanzen in geringen Mengen enthalten sind, die mittels HPLC nicht einzeln quantifiziert werden können. Auf diesem Hintergrund ist es erstrebenswert, wenn der Gehalt an phenolischen Substanzen möglichst groß ist.

Neben den signifikant positiven Effekten der Faktoren Konzentration und Temperatur sind die Effekte der Wechselwirkungen zwischen Konzentration und Temperatur sowie zwischen Temperatur und Extraktionsdauer signifikant negativ. Dabei führt eine Verlängerung der Extraktionsdauer bei 25 °C zu einem Anstieg der phenolischen Substanzen, während sich bei 60 °C zunehmend weniger phenolische Substanzen nachweisen lassen. Der Effekt der Temperatur ist also bei einer Extraktionsdauer von zwei Stunden höher als bei einer Extraktionsdauer von 24 Stunden. Erklären läßt sich dieses Phänomen wiederum durch eine langsame Gleichgewichtseinstellung bei niedriger Temperatur, während es bei der höheren Temperatur zu Zersetzungserscheinungen kommt. Bei der höheren Temperatur zeigt sich für beide untersuchte Konzentrationen kein signifikanter Unterschied in der Ausbeute an phenolischen Substanzen.

4.1.2.3 Grünfärbung der Extrakte

Bei der Extraktion von Drogen werden auch immer unerwünschte Begleitstoffe mit aus der Matrix herausgelöst. Da es sich im vorliegenden Fall um eine Herba-Droge handelt, ist in den Extrakten immer ein gewisses Maß an Chlorophyll bzw. entsprechender Abbauprodukte enthalten, die zu einer Grünfärbung der Extrakte führen. Ein hoher Chlorophyllgehalt im Extrakt hat zwei Nachteile: Zum einen erniedrigt er die kosmeti-

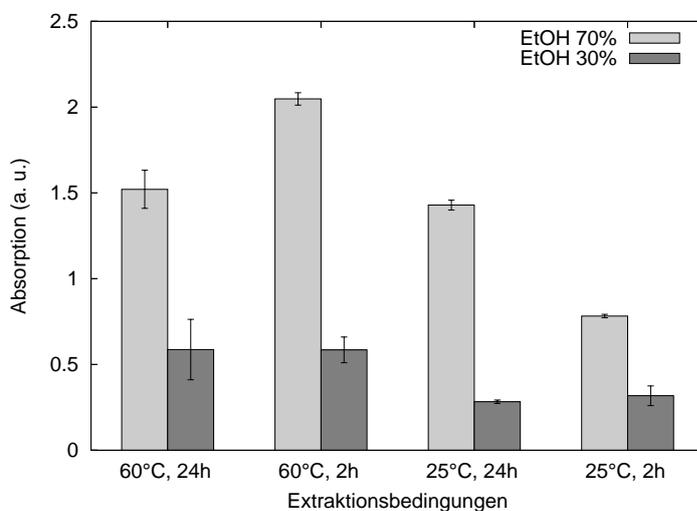


Abbildung 4.3: UV-Absorption bei 650 nm unter Berücksichtigung der Verdünnung. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von zwei unabhängigen Extraktchargen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Spannweite der beiden Einzelwerte.

sche Akzeptanz durch die verstärkte (Grün-)Färbung, zum anderen kann Chlorophyll selbst als Photosensibilisator wirken [42].

In der Literatur sind spektroskopische Methoden für die Chlorophyllbestimmung bekannt [33, 99]. Für die Flüssigextrakte wurde die UV-Absorption bei 650 nm bestimmt (s. Abb. 4.3). Bei dieser Wellenlänge zeigen sowohl Chlorophyll a als auch Chlorophyll b einen hohen molaren Absorptionskoeffizienten [99]. Bei Absorptionen $> 0,8$ wurden die entsprechenden Extrakte verdünnt und die Absorption über den Verdünnungsfaktor hochgerechnet. In Ermangelung eines entsprechenden Standards konnten die Werte nicht als Chlorophyllgehalt angegeben werden.

Signifikant positive Effekte zeigen sich für die Faktoren Konzentration und Temperatur sowie für den Effekt der Wechselwirkung zwischen Konzentration und Temperatur. Ebenfalls signifikant sind die negativen Effekte der Wechselwirkung zwischen Temperatur und Extraktionsdauer sowie der 3FWW. Bei Verwendung von Ethanol 30 % zeigt sich unabhängig von der Temperatur kein Einfluß der Extraktionsdauer. Bei der höheren Konzentration ergibt sich jedoch für Extrakte, die bei 60 °C hergestellt wurden, mit zunehmender Extraktionsdauer eine Verminderung der Grünfärbung.

Diese Befunde sind in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen von EDELENBOS et al., die für rein wässrige Lösungen fanden, daß eine Wärmebehandlung zum Abbau von Chlorophyll a und b führt, wobei allerdings die Abbauprodukte ein dem nativen Chlorophyll sehr ähnliches Absorptionsspektrum zeigen, so daß die resultierende Grünfärbung sich nicht verändert [43].

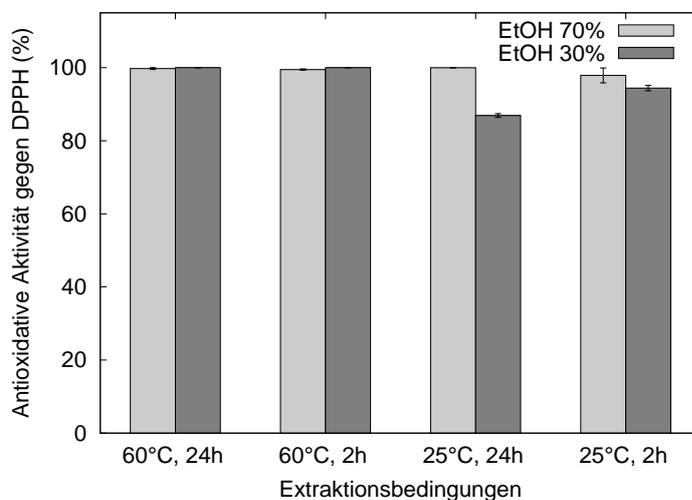


Abbildung 4.5: Antioxidative Aktivität als Radikalfänger von DPPH in Abhängigkeit von den Extraktionsbedingungen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von zwei unabhängigen Extraktchargen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Spannweite der beiden Einzelwerte.

bestimmt. Die Auswertung des Versuchsplanes auf die Zielgröße Fagopyringehalt ergibt folgendes Bild (Abb. 4.6): Signifikant positive Effekte rufen die Faktoren Konzentration und Temperatur sowie die Wechselwirkung zwischen diesen beiden Faktoren hervor. Die Extraktionsdauer spielt hier keine Rolle. Bei Verwendung von Ethanol 30 % hat die Temperatur keinen Einfluß auf den Fagopyringehalt.

Die gefundenen Werte für den Fagopyringehalt liegen etwas niedriger als in Untersuchungen von THEURER et al., die für Extrakte aus Buchweizenkraut, die durch Mazeration mit Ethanol 50 % hergestellt wurden, Werte von ca. 0,5 % Fagopyrin fanden. Dies läßt sich auch auf die unterschiedlichen Nachweismethoden (bei THEURER dünn-schichtchromatographisch) zurückführen. In Extrakten, die nur mit Wasser hergestellt wurden, war kein Fagopyrin nachweisbar [162], was in guter Übereinstimmung mit den vorliegenden Untersuchungen ist, in denen mit abnehmender Ethanol-Konzentration weniger Fagopyrin zu finden ist.

4.1.3.3 HPLC-Analytik

Chromatographische Zielgrößen

Die HPLC-Analytik erfolgte über eine Gradiententrennung an einer RP8-Säule mit UV-Detektion. Die einzelnen Komponenten wurden über den Vergleich der Retentionszeiten mit denen der jeweiligen Referenzsubstanzen identifiziert. Bestimmt wurden zunächst die Flavonoide, die in Herba Fagopyri zu einem relativ hohen Prozentsatz vorhanden sind, nämlich Rutin, Hyperosid und Quercitrin, sowie die Phenolcarbon-

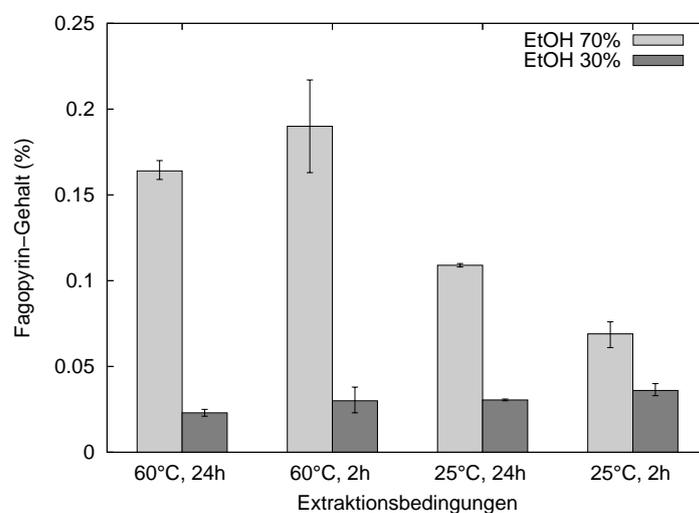


Abbildung 4.6: Fagopyringehalt der gefriergetrockneten Extrakte. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von zwei unabhängigen Extraktchargen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Spannweite der beiden Einzelwerte.

säure Chlorogensäure (vgl. Abb. 4.7). Quercetin konnte nicht bestimmt werden, da es zusammen mit Quercitrin eluierte.

Rutin

Für die Zielgröße Rutingehalt läßt sich folgendes feststellen: Signifikant positive Effekte haben die Faktoren Konzentration und Temperatur sowie die Wechselwirkung zwischen Konzentration und Extraktionsdauer. Dagegen findet sich ein signifikant negativer Effekt für die Wechselwirkung zwischen Konzentration und Temperatur. Es zeigt sich, daß eine Erhöhung der Temperatur bei Verwendung von Ethanol 30 % zu einer etwas höheren Ausbeute an Rutin führt als bei der höheren Konzentrationsstufe. Für die niedrigere Konzentration zeigt sich bei längerer Extraktionszeit ein leichter Abfall der Rutinkonzentration, während es bei der höheren Konzentration zu einer leichten Zunahme kommt.

Hyperosid

Der Gehalt an Hyperosid in den Extrakten beträgt nur ca. 10 % des Rutingehaltes. Für die gewählten Versuchsfaktoren lassen sich keine signifikanten Effekte auf den Hyperosidgehalt feststellen.

Chlorogensäure

Der Chlorogensäuregehalt in den Extrakten beträgt ca. 0,3-0,5 % und liegt damit ebenfalls deutlich unter dem Rutingehalt. Lediglich für den Faktor Konzentration zeigt sich ein signifikant negativer Effekt ($p < 0,01$). Das läßt sich auf die bessere Löslichkeit von Chlorogensäure in Wasser als in Ethanol zurückführen.

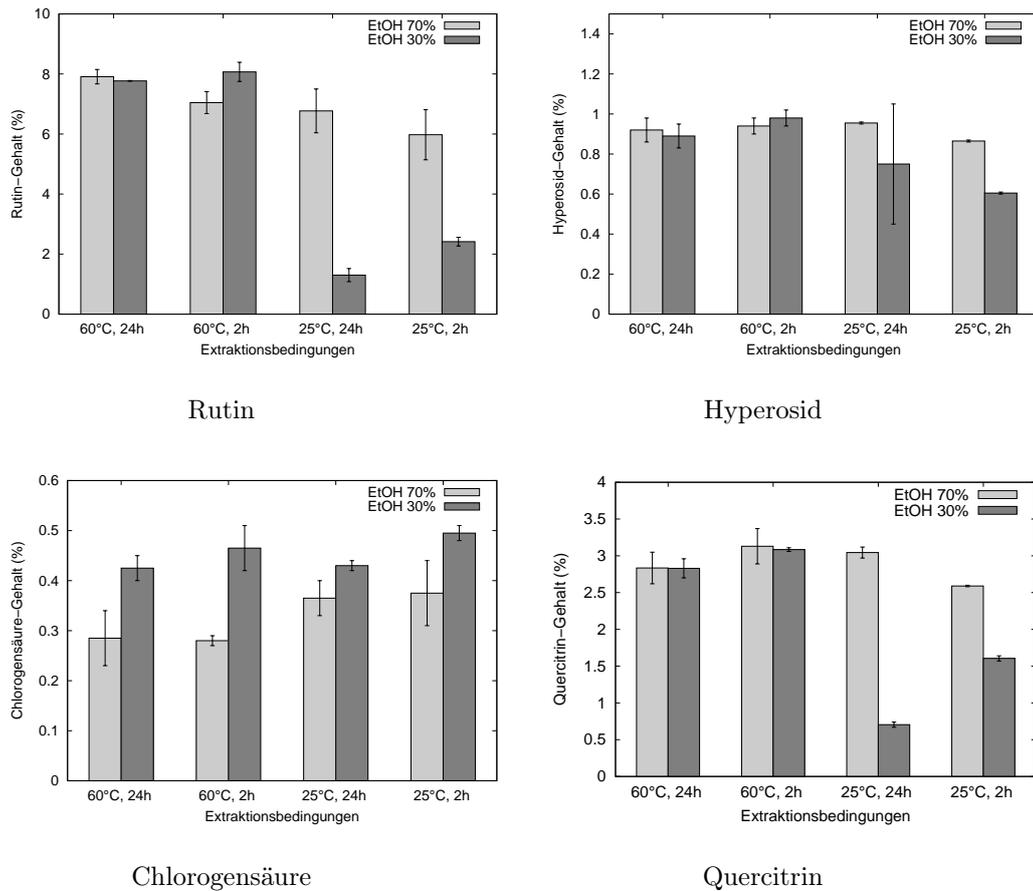


Abbildung 4.7: Gehalt der einzelnen phenolischen Substanzen in % der gefriergetrockneten Extrakte in Abhängigkeit von den Extraktionsbedingungen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von zwei unabhängigen Extraktchargen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Spannweite der beiden Einzelwerte.

Quercitrin

Für die Zielgröße Quercitrin sind die Effekte der Faktoren Konzentration und Temperatur signifikant positiv. Außerdem findet sich für die Wechselwirkung zwischen Konzentration und Zeit ein signifikant positiver Effekt, während der Effekt der Wechselwirkung zwischen Konzentration signifikant negativ ist. Gleiches gilt auch den Effekt der 3FWW. Bei der höheren Temperatur führt für beide Konzentrationsstufen eine Verlängerung der Extraktionsdauer zu einer Verringerung des Quercitringehaltes. Umgekehrt gilt auch, daß man auf beiden Stufen der Extraktionsdauer keine Steigerung der Ausbeute durch die höhere Konzentration erreicht, wenn man als Temperatur 60 °C wählt.

Die gefundenen Ergebnisse für die Ausbeute an phenolischen Substanzen stimmen gut mit Untersuchungen von NIESEL überein, der bei Extraktion von Buchweizenkraut im rein wässrigen Medium mit höherer Temperatur höhere Rutingehalte fand. Außerdem kam es bei einem Kaltansatz mit zunehmender Zeit zu einem Abbau von Rutin [125]. Daß dieses Phänomen bei der Extraktion bei 60 °C keine Rolle spielt, läßt sich mit Befunden von BAUMGERTEL et al. erklären. Sie isolierten aus getrocknetem Buchweizenkraut eine Flavonol-3-O- β -heterodisaccharidase, die mit einer hohen Aktivität im Temperaturbereich von 4 bis 50 °C Rutin zu Quercetin und Rutinose spaltet. Bei höheren Temperaturen nimmt die Aktivität deutlich ab, was zu einer höheren Stabilität von Rutin in der Lösung führt. Dieses Enzym ist sogar bei einem Zusatz von bis zu 33 % Methanol noch aktiv. In diesen Untersuchungen wurde kein erhöhter Quercetingehalt gefunden, was die Autoren mit einem weiteren Abbau des Quercetins zu verschiedenen Hydroxybenzoesäuren unter Einfluß von ebenfalls in der Droge vorkommenden Flavonoloxidasen erklären [12].

4.1.4 Vergleich verschiedener Fagopyrum-Drogen

Aus den vorhergehenden Untersuchungen wurde deutlich, daß für die meisten gewünschten Eigenschaften (z. B. Rutingehalt, antioxidative Aktivität) eine zufriedenstellende Ausbeute auch mit Ethanol 30 % erreicht werden kann. Gleichzeitig ergibt sich der Vorteil, daß mit Ethanol 30 % weniger unerwünschte Stoffe wie Chlorophyll und Fagopyrin aus der Droge herausgelöst werden. Um die beiden Fagopyrumdrogen zu vergleichen, wurden Extrakte mit 30 % Ethanol unter verschiedenen Bedingungen hergestellt und gefriergetrocknet. Verglichen wurden der Rückstand der Gefrier Trocknung sowie nach HPLC-Analytik der Gehalt an verschiedenen phenolischen Substanzen.

Vergleicht man den Rückstand der Gefrier Trocknung (Abb. 4.8), so stellt man fest, daß bei allen Extraktionsbedingungen die Caelo-Droge eine teilweise um bis zu 50 % höhere Ausbeute liefert. Bei allen Versuchsansätzen lassen sich deutliche Unterschiede zwischen der Calbe- und der Caelo-Droge finden.

Bezüglich der phenolischen Substanzen ergibt sich ein ähnliches Bild (Abb. 4.9): Mit der Caelo-Droge als Ausgangsdroge kann bis zu fünfmal mehr Chlorogensäure im Extrakt gefunden werden als in Extrakten aus der Calbe-Droge. Bezüglich des Rutingehaltes ist das Bild differenzierter: Bei den Extraktionen bei 60 °C finden sich große Unterschiede zwischen beiden Drogen ($p < 0,05$). Bei Verwendung der Caelo-Droge erhält man einen Rutingehalt von bis zu 20 %. Auch bei den Versuchsbedin-

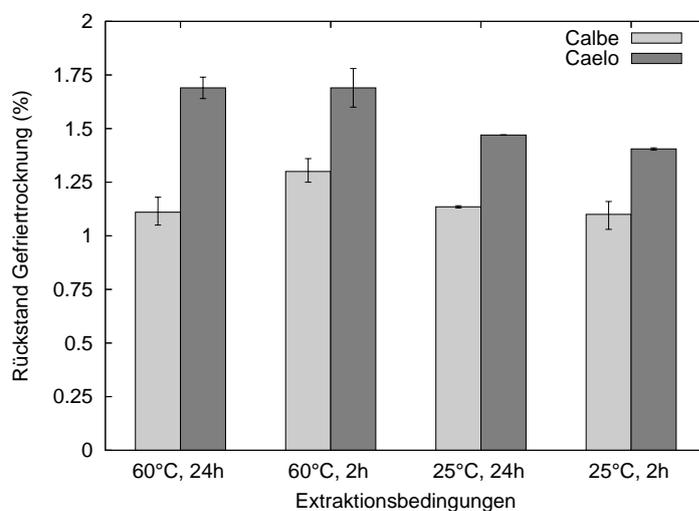


Abbildung 4.8: Rückstand der Gefriertrocknung von Extrakten verschiedener Drogen, jeweils hergestellt mit 30% Ethanol. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von zwei unabhängigen Extraktchargen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Spannweite der beiden Einzelwerte.

gungen 25 °C/2 Stunden ist für die Caelo-Droge eine höhere Ausbeute zu verzeichnen ($p < 0,01$), während sich bei den Bedingungen 25 °C/24 Stunden kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Drogen findet. Für den Hyperosidgehalt findet sich nur bei 25 °C/24 Stunden ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Drogen ($p < 0,01$). Bezüglich des Quercitringehaltes läßt sich nur bei einer Temperatur von 60 °C ein signifikanter Unterschied zwischen den Drogen herstellen ($p < 0,001$). Dabei liegen die Werte für die Calbe-Droge deutlich höher.

Um die überraschenden Unterschiede zwischen den beiden Drogen näher beleuchten zu können, wurde eine Gehaltsbestimmung auf Rutin (nach der Methode von HAGELS [65]) durchgeführt. Für die Calbe-Droge ergab sich ein Rutingehalt von $6,35 \pm 0,17\%$, für die Caelo-Droge ein Gehalt von $6,66 \pm 0,16\%$ ($n=3$). Der Rutingehalt in der Calbe-Droge ist also tatsächlich etwas niedriger als in der Caelo-Droge. Nach Auskunft des Herstellers in Calbe wurde die Droge zu spät geerntet, woraus ein verminderter Rutin-Gehalt resultieren kann [115]. In Untersuchungen von HAGELS et al. fanden sich für den Rutingehalt von Buchweizenkraut in Abhängigkeit von der Kultursorte und dem Erntezeitpunkt Schwankungen zwischen 1,45 und 9,3 % [64]. Dies belegt die Notwendigkeit einer Standardisierung des Ausgangsmaterials auch schon im Stadium des Anbaus, wie sie in dem HMPWP-Entwurf zu „Good Agricultural Practice“ beschrieben ist [70].

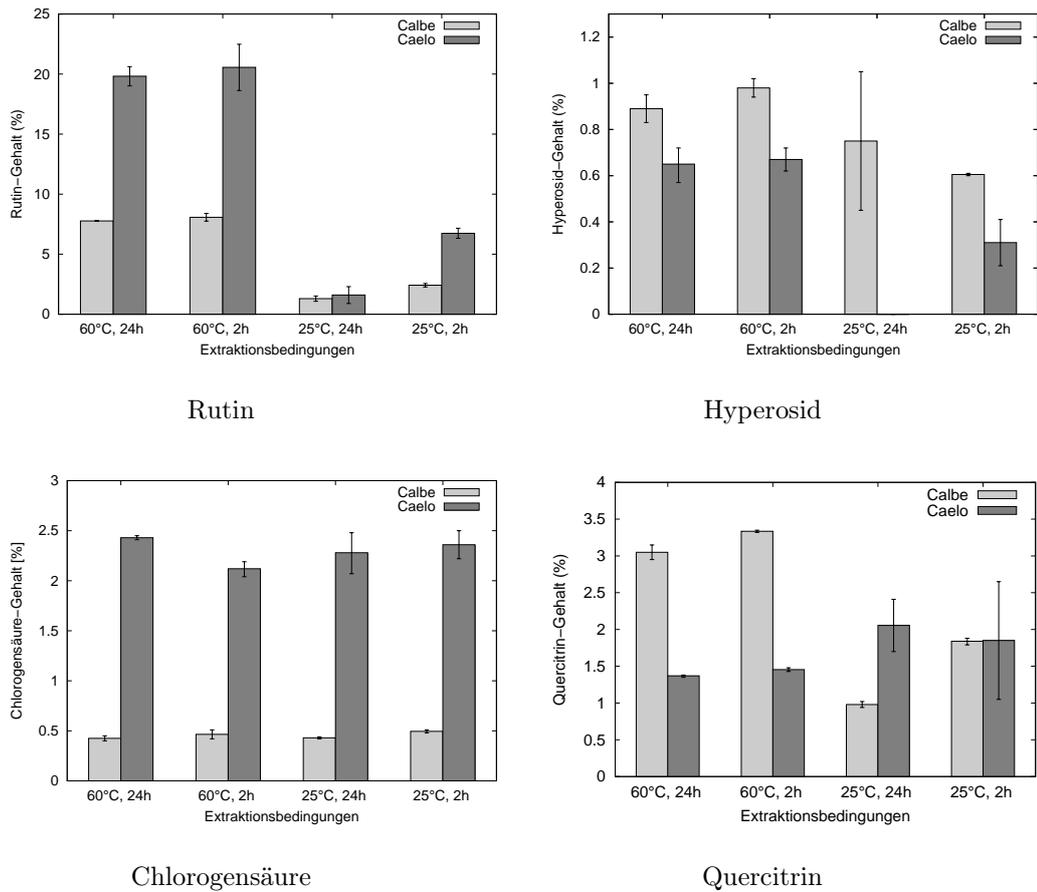


Abbildung 4.9: Gehalt der einzelnen phenolischen Substanzen in % der gefriergetrockneten Extrakte in Abhängigkeit von der verwendeten Droge. Die Extrakte wurden jeweils mit 30% Ethanol hergestellt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von zwei unabhängigen Extraktchargen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Spannweite der beiden Einzelwerte.

Tabelle 4.3: Überblick über die Effekte der Faktoren auf die Zielgrößen (Anteil an Gesamteffekten in %). +: positiver Effekt; -: negativer Effekt. Signifikante Effekte sind fett gedruckt ($p < 0,05$). Eine ausführliche Darstellung der Signifikanzen für die einzelnen Effekte findet sich im Anhang, S. 97

	Konz.	Dauer	Temp.	KxD ^a	DxT ^b	KxT ^c	3FWW
Trockenrückstand	+ 27,15	+ 9,27	+ 45,94	+ 4,36	- 8,16	- 1,90	- 3,24
phenol. Substanzen ^d	+ 21,57	- 0,90	+ 35,15	+ 8,80	- 17,33	- 13,70	- 2,55
Grünfärbung	+ 43,04	+ 0,94	+ 20,73	+ 1,64	- 12,21	+ 8,45	- 13,00
AA ^e	+ 18,96	- 6,21	+ 24,07	+ 11,90	+ 6,82	- 20,81	- 11,23
Fagopyrin	+ 44,35	+ 0,25	+ 17,59	+ 3,05	- 7,27	+ 20,50	- 6,99
Rutin	+ 21,81	+ 0,66	+ 38,39	+ 8,23	+ 2,37	- 26,55	- 1,99
Hyperosid	+ 21,72	+ 5,97	+ 26,49	+ 0,72	- 16,47	- 22,67	- 5,97
Chlorogensäure	- 45,54	- 9,82	- 18,75	+ 8,93	+ 3,57	- 12,50	- 0,89
Quercitrin	+ 23,45	- 6,91	+ 27,34	+ 9,14	- 0,73	- 22,75	- 9,69

^aWechselwirkung von Konzentration und Dauer

^bWechselwirkung von Dauer und Temperatur

^cWechselwirkung von Konzentration und Temperatur

^dUV-Bestimmung

^eantioxidative Aktivität

4.1.5 Zusammenfassung: Auswahl eines geeigneten Extraktes

Mit Hilfe des Versuchsplanes wurde der Einfluß der Faktoren Konzentration des Extraktionsmittels, Extraktionstemperatur sowie die Dauer des Extraktionsvorganges auf verschiedene Zielgrößen untersucht (Zusammenfassung in Tab. 4.3). Zusätzlich wurde für einige Zielgrößen auch der Einfluß der Ausgangsdroge ermittelt. Die Zielgrößen lassen sich unterteilen in erwünschte und unerwünschte Inhaltsstoffe bzw. Eigenschaften. Zu den erwünschten Eigenschaften zählen Trockenrückstand, Gehalt an phenolischen Substanzen, antioxidative Eigenschaften sowie der Gehalt an Rutin, Hyperosid, Quercitrin und Chlorogensäure. Die Grünfärbung der Extrakte sowie der Gehalt an Fagopyrin lassen sich zu den unerwünschten Eigenschaften rechnen.

Es zeigt sich, daß es für die unerwünschten Zielgrößen Grünfärbung und Fagopyringehalt einen deutlichen Einfluß der Konzentration gibt, d. h. man kann die beiden Zielgrößen auf niedrigem Niveau halten, wenn man Ethanol 30 % verwendet. Bei dieser Konzentration haben auch weder die Temperatur noch die Dauer einen signifikanten Einfluß.

Will man also möglichst viele unerwünschte Faktoren vermeiden, sollte man die Extraktion mit Ethanol 30 % durchführen. Wie müssen nun die anderen Parameter gewählt werden, damit ein qualitativ hochwertiger Extrakt hergestellt werden kann? Für

Tabelle 4.4: Phytochemische Parameter des Extraktes, hergestellt unter den Bedingungen Ethanol 30 %, 2 Stunden, 60 °C, Caelo-Droge. Der Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen wurde mit CE-Methode 1 bestimmt. Dargestellt sind die Spannen von sechs Chargen. n. b.: nicht bestimmt

Droge-Extrakt-Verhältnis	3,57–4,55:1
Rutin (%)	18,63–22,31
Hyperosid (%)	0,18–0,50
Chlorogensäure (%)	4,09–5,57
Quercitrin (%)	n. b.

einen hohen Trockenrückstand mit der Calbe-Droge benötigt man hohe Konzentration und hohe Temperatur. Betrachtet man dagegen den Rückstand der Gefriertrocknung für die beiden Drogen im Vergleich, stellt man fest, daß man mit Ethanol 30 % mit der Caelo-Droge sogar eine höhere Ausbeute erzielt als mit Ethanol 70 % unter Verwendung der Calbe-Droge. Bei höherer Temperatur ist eine höhere Ausbeute zu erzielen, die Extraktionsdauer spielt keine Rolle. Für den Gehalt an phenolischen Substanzen ist die höhere Temperatur ebenfalls vorteilhaft, dabei sollte die Extraktionsdauer auf dem unteren Niveau gehalten werden. Wenn man mit Ethanol 30 % arbeitet, beeinflusst die höhere Temperatur die antioxidativen Eigenschaften positiv, unabhängig von der Extraktionsdauer. Für den Gehalt an Rutin und Quercitrin erreicht man bei 60 °C mit Ethanol 30 % höhere Werte als bei 25 °C, dies kommt besonders bei der Caelo-Droge zum Tragen. Dieses Phänomen wird durch die Extraktionsdauer nicht beeinflusst, so daß eine Extraktionsdauer von 2 Stunden ausreichend ist.

Insgesamt betrachtet erzielt man einen optimierten Extrakt, wenn man die Bedingungen wie folgt wählt: Extraktion bei 60 °C mit Ethanol 30% über einen Zeitraum von zwei Stunden unter Verwendung der Caelo-Droge. Mit diesem Extrakt wurden alle weiteren Untersuchungen durchgeführt. Tab. 4.4 zeigt die Spannbreite der phytochemischen Parameter, die an sechs Chargen des unter den genannten Bedingungen hergestellten Extraktes bestimmt wurden.

Eine Korrelation der verschiedenen Zielgrößen (ausführliche Daten im Anhang, S. 98) zeigt, daß ein Zusammenhang zwischen der Grünfärbung und dem Fagopyringehalt besteht ($r^2=0,9192$). Dies läßt sich zum einen dadurch erklären, daß beide Verbindungen lipophiler als die Flavonoide sind und deswegen auch beide in ähnlichem Ausmaß extrahiert werden. Zum anderen wurden beide Parameter UV-photometrisch (bei 650 nm bzw. 590 nm) ohne vorherige Aufreinigung der Extrakte bestimmt, so daß die beiden Zielgrößen zum Teil nicht unabhängig voneinander erfaßt werden konnten.

Eine gute Korrelation mit den antioxidativen Eigenschaften zeigt sich sowohl für den Rutin- als auch für den Quercitringehalt ($r^2=0,8682$ bzw. $0,9532$). Dies entspricht zum einen den aus der Literatur bekannten guten antioxidativen Eigenschaften der beiden Verbindungen [145, 172], spiegelt aber auch den Anteil der in den Extrakten vorhandenen Polyphenole wider.

Die Korrelation des Gehaltes einzelner Polyphenole mit dem photometrisch bestimmten Gehalt an phenolischen Substanzen ist deutlich schlechter ($r^2=0,7579$ für

Rutin, 0,8470 für Hyperosid und 0,7911 für Quercitrin). Das deutet darauf hin, daß im Extrakt zum einen eine Vielzahl an niedermolekularen phenolischen Verbindungen vorhanden ist, wie z. B. durch HAGELS beschrieben [64], aber auch auf die Problematik der colorimetrischen Phenolbestimmung mit Eisensalzen, da unterschiedlich substituierte Polyphenole unter Umständen unterschiedliche Farben ergeben können [156]. Dies wird durch die besonders schlechte Korrelation des Gehalts an phenolischen Substanzen mit dem Gehalt an Chlorogensäure, die sich von der Struktur her deutlich von den Quercetinglykosiden unterscheidet, bestätigt. Auch die Korrelation des Gehaltes an phenolischen Substanzen mit den antioxidativen Eigenschaften ist eher moderat ($r^2=0,6065$). Der Einsatz der Preußisch-Blau-Methode ist dennoch gerechtfertigt, da sie im Vergleich zur mehr verbreiteten Methode nach Folin-Ciocalteu von der Durchführung her schneller [139] und unempfindlicher gegenüber dem Einfluß nichtphenolischer Substanzen ist [67]. Darüberhinaus lieferten Versuche der Korrelation der antioxidativen Eigenschaften mit dem Gehalt an phenolischen Substanzen, der mit der Methode nach Folin-Ciocalteu bestimmt wurde, Korrelationskoeffizienten in der gleichen Größenordnung [7, 22]. Der Trockenrückstand läßt sich mit keiner der anderen Zielgrößen mit ausreichender Güte korrelieren. Die photometrische Bestimmung der phenolischen Substanzen und der Trockenrückstand sind also keine geeigneten Surrogatparameter, um die Qualität des Extraktes in Bezug auf die antioxidativen Eigenschaften abschätzen zu können.

4.2 Untersuchungen zur Toxizität des Extraktes

Um das irritative bzw. toxische Potential von Substanzen an Haut und Schleimhaut zu untersuchen, wurde bisher häufig der Draize-Test am Kaninchenaugen verwendet. Da es sich jedoch um einen verbrauchenden Tierversuch handelt, wurde intensiv nach Alternativmethoden gesucht. Die COLIPA hat in verschiedenen Untersuchungen zwei Modellsysteme etabliert, den HET-CAM-Test an befruchteten und bebrüteten Hühnereiern sowie den 3T3-Zytotoxizitätstest an einer humanen Fibroblasten-Zelllinie [158]. In Untersuchungen von WILHELM et al. zeigte sich ebenfalls eine gute Korrelation von Zytotoxizitätsdaten, die an einer HaCaT-Zelllinie gewonnen wurden, mit in vivo-Irritationsstudien [174]. Die Bestimmung der Lebendzellzahl mit Hilfe der Kristallviolett-Färbung ist ähnlich empfindlich wie die Bestimmung der Neutralrot-Aufnahme [51].

4.2.1 Keratinozyten-Modell

Im Keratinozyten-Modell wird die HaCaT-Zelllinie verwendet, eine immortalisierte Zelllinie aus humanen Keratinozyten. Anhand der Kristallviolett-Färbung läßt sich nach Inkubation mit der zu untersuchenden Substanz die Anzahl der lebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmen. Nach 24stündiger Inkubation mit dem Extrakt zeigen sich mit den untersuchten Konzentrationen keine toxischen Erscheinungen. Allerdings kann ein leichter Proliferationsschub beobachtet werden (Abb. 4.10). Dieses Phänomen ist für Quercetinglykoside in der Literatur beschrieben [87, 124]. In Untersuchungen von NICKEL et al. erwies sich Rutin bis zu einer Konzentration von

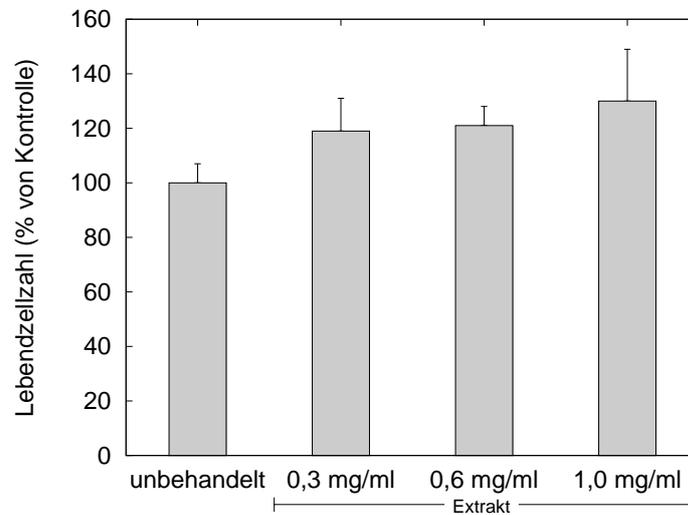


Abbildung 4.10: Bestimmung der Lebendzellzahl (Kristallviolett-Färbung) an HaCaT-Keratinocyten nach 24stündiger Extraktexposition. Dargestellt ist jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung ($n \geq 8$)

200 μ M als gut verträglich. Höhere Konzentrationen konnten aufgrund der schlechten Löslichkeit von Rutin im Zellkulturmedium nicht untersucht werden [124]. Bei einem Rutingehalt von ca. 20 % im Extrakt entsprechen 200 μ M Rutin einer Extraktkonzentration von ca. 0,61 mg/ml. Es wird also deutlich, daß die Verträglichkeit des Extraktes an der HaCaT-Zelllinie als sehr gut einzustufen ist.

4.2.2 HET-CAM-Modell

Das HET-CAM-Modell (Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane) stellt eine einfache, schnell durchführbare, kostengünstige und sehr empfindliche Methode für die Bewertung des toxischen Potentials von Substanzen *in vivo* dar. Die zu untersuchenden Substanzen werden in Lösung auf die stark vaskularisierte Chorio-Allantois-Membran befruchteter Hühnereier aufgebracht. Dieses System ist international etabliert. Der HET-CAM-Test zählt nicht als Tierversuch, da die CAM zum Zeitpunkt der Durchführung der Versuche (8-10 Tage nach der Befruchtung) zwar ein funktionstüchtiges Gefäßsystem enthält, jedoch keine Nervenzellen, so daß an schmerzfreier Materie gearbeitet wird [95]. Üblicherweise werden halbquantitative Parameter wie Membrandiskoloration, Thrombosierungen, Hämorrhagien und Letalität des Embryos bestimmt. WOHLRAB konnte jedoch zeigen, daß es eine gute Korrelation zwischen der Gefäßperfusion, bestimmt durch Laser-Doppler-Fluxmetrie (LDF), und den halbquantitativen Parametern gibt. Dabei zeigt sich bei irritativen Erscheinungen eine Erhöhung der Gefäßperfusion und damit des LDF-Indexes [3, 176].

Der Extrakt wird in einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS untersucht, außerdem

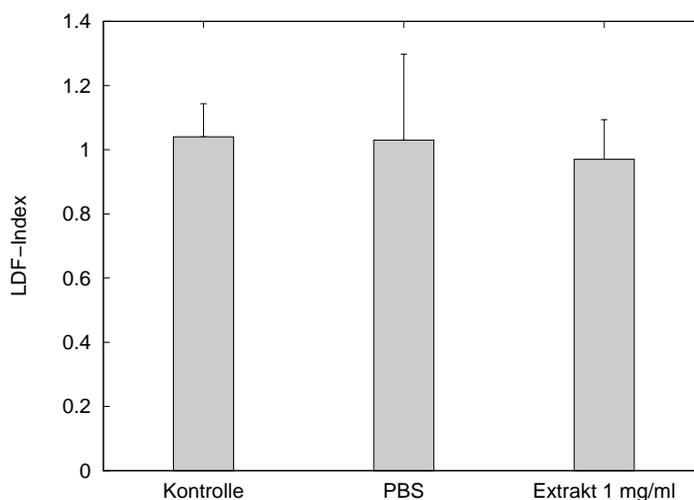


Abbildung 4.11: Einfluß von Lösungsmittel und Extrakt auf die Perfusion von befruchteten Hühnereiern. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung (n=12).

wird sowohl eine Leer- als auch eine Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Es zeigt sich (Abb. 4.11), daß es weder durch PBS noch durch den Extrakt in der untersuchten Konzentration zu irritativen oder toxischen Erscheinungen kommt. Die Werte für den LDF-Index unterscheiden sich nach 30minütiger Inkubation jeweils nicht signifikant von der Leerkontrolle.

Es zeigt sich also in beiden Modellen eine sehr gute Verträglichkeit des Extraktes in den untersuchten Konzentrationen.

4.3 Wirksamkeit des Extraktes als Photoprotektivum

Die menschliche Haut ist einer Vielzahl von Einflüssen ausgesetzt, die durch UV-Strahlung verursacht werden. Eine Substanz, die als Photoprotektivum wirken soll, sollte idealerweise über eine zweifache Wirkung verfügen: Zum einen soll sie UV-Strahlen in ausreichendem Ausmaß absorbieren, zum anderen aber auch antioxidativ wirken, um die durch UV-Strahlung erzeugten Radikale in der Haut unschädlich zu machen. Aus diesem Grund wird der Extrakt bezüglich seiner UV-Absorptionsfähigkeit sowie auf seine Wirkung als Antioxidans bzw. Radikalfänger untersucht. Für einzelne Flavonoide sind ihre UV-protektiven Eigenschaften in Pflanzen [68] sowie ihre antioxidativen Eigenschaften [144] bekannt.

4.3.1 Untersuchung der UV-Absorptionsfähigkeit

Für die Untersuchung der UV-Absorption sind zwei verschiedene Größen wichtig. Zum einen soll der Extrakt einen möglichst breiten Bereich des UV-Spektrums (von 290–

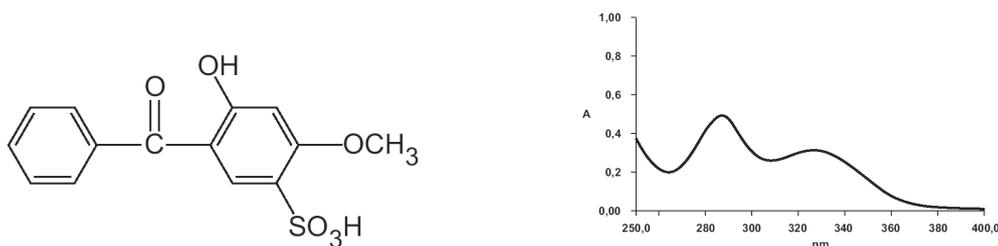


Abbildung 4.12: Strukturformel und Absorptionsspektrum von Uvinul MS 40 (entnommen aus [166])

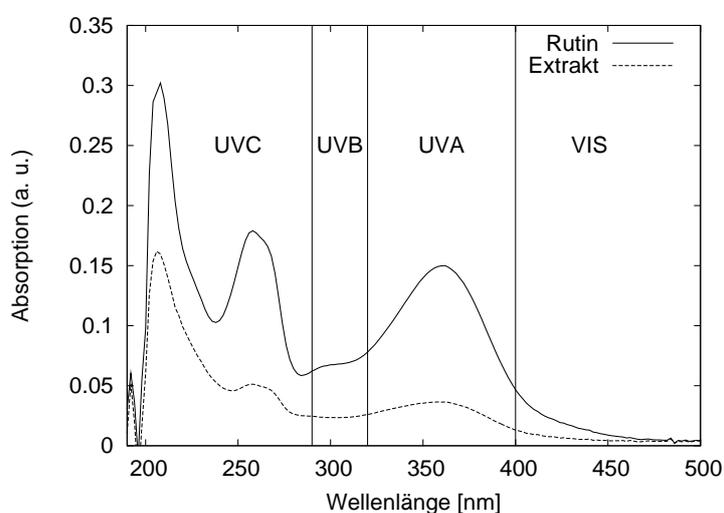


Abbildung 4.13: Absorptionsspektren von Rutin und Extrakt, jeweils in Methanol 80 %

400 nm) abdecken, zum anderen aber soll das Ausmaß der Absorption ausreichend sein. In den letzten Jahren wurden zahlreiche in-vitro-Methoden entwickelt, die sich gegenüber den in-vivo-Methoden durch ihre bessere Standardisierbarkeit auszeichnen [88]. Üblicherweise werden diese Methoden nicht an einzelnen Substanzen angewendet, sondern an einem handelsüblichen Sonnenschutzprodukt. Dies liegt in der Tatsache begründet, daß die Grundlage der kosmetischen Formulierung zum einen eine Eigenabsorption aufweist und zum anderen mit der Substanz wechselwirken kann, was u. U. zu Verschiebungen im Absorptionsspektrum führt. Allerdings läßt sich durch Untersuchungen an der Substanz herausfinden, ob es sich um einen als UV-Filter geeigneten Kandidaten handelt.

Der Extrakt wird in den Untersuchungen mit reinem Rutin sowie mit einem chemischen UV-Absorber, Uvinul MS 40 (INCI-Name Benzophenone-4) verglichen. Die UV-Spektren der drei Substanzen sind in Abb. 4.12 und 4.13 dargestellt.

Um die drei Substanzen zu charakterisieren, wird anhand der Absorptionsspektren

Tabelle 4.5: Charakterisierung der UV-Absorptionsfähigkeit von Rutin, Extrakt und Uvinul MS 40. Dargestellt ist jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=3$). λ_{\max} : Wellenlänge des Absorptionsmaximums; spA_{\max} : spezifische Absorption (berechnet für eine 1%ige Lösung bei einer Schichtdicke von 1 cm) im Absorptionsmaximum; c_{\min} : Mindestkonzentration für ausreichende Protektion; AS: nach Australischem Standard; λ_c : kritische Wellenlänge.

Parameter	Rutin	Extrakt	Uvinul MS 40
λ_{\max} UVA (nm)	358	350	322
spA_{\max} UVA	$263,20 \pm 7,82$	$56,95 \pm 2,08$	$254,37 \pm 22,73$
c_{\min} UVA (%)	$6,46 \pm 0,19$	$29,88 \pm 1,09$	$6,72 \pm 0,63$
c_{\min} AS (%)	$8,33 \pm 0,26$	$26,79 \pm 0,97$	$30,02 \pm 3,43$
λ_{\max} UVB (nm)	320	320	290
spA_{\max} UVB	$150,18 \pm 4,72$	$46,70 \pm 1,70$	$384,62 \pm 34,03$
c_{\min} UVB (%)	$11,33 \pm 0,36$	$36,43 \pm 1,32$	$4,44 \pm 0,41$
λ_c (nm)	381	379	345
UVA/UVB-Quotient	$1,445 \pm 0,006$	$0,986 \pm 0,001$	$0,332 \pm 0,005$

jeweils das Absorptionsmaximum bestimmt sowie die spezifische Absorption am Maximum berechnet. Die Absorption wird als ausreichend betrachtet, wenn eine 0,1%-ige Lösung der betreffenden Substanz eine Durchlässigkeit von maximal zwei Prozent hat [73]. Anhand der spezifischen Absorption läßt sich die nötige Einsatzkonzentration berechnen, um diese Absorption zu erreichen. Für den UVA-Bereich wird außerdem die Konzentration bestimmt, die nötig wäre, um UVA-Schutz nach dem Australischen Standard AS/NZS 2604:1998 zu gewährleisten. Dazu muß am Absorptionsminimum im Bereich 320–360 nm bei einer Schichtdicke von 8 μ m mindestens 90 % der Strahlung absorbiert werden [71].

Um den Bereich der UV-Absorption einer Substanz zu beschreiben, wurden von DIFFEY et al. zwei Konzepte vorgeschlagen, den UVA/UVB-Quotienten sowie die kritische Wellenlänge λ_c [38]. Zur Berechnung des UVA/UVB-Quotienten werden die mittleren Flächen unter der Absorptionskurve in den Bereichen 320–400 nm und 290–320 nm ins Verhältnis gesetzt. Ein Breitbandfilter erreicht dabei Werte von mindestens 0,8, idealerweise aber um 1,0. Der Parameter λ_c ist die Wellenlänge, bei der die Fläche unter der Kurve 90 % der Gesamtfläche im Bereich 290–400 nm erreicht. Ein Breitbandfilter hat eine kritische Wellenlänge von ≥ 370 nm. Sowohl bei der kritischen Wellenlänge als auch bei dem UVA/UVB-Quotient handelt es sich um relative Parameter, die keinen Rückschluß auf die absolute UV-Absorption zulassen [57, 118].

Aus Tab. 4.5 läßt sich entnehmen, daß Rutin und Uvinul MS 40 im UVA-Bereich ähnliche spezifische Absorptionen besitzen. Deswegen ergeben sich auch nahezu gleiche nötige Einsatzkonzentrationen. Der berechnete Wert für die spezifische Absorption des Rutins beträgt bei 358 nm ca. 263 und ist damit in guter Übereinstimmung mit dem Wert 267, der in der Literatur angegeben wird [147]. Die spezifische Absorption für den Extrakt liegt in diesem Bereich um den Faktor 5 niedriger. Dies legt den Schluß nah, daß für die UV-Absorption des Extraktes hauptsächlich das Rutin verantwortlich ist, das im Extrakt mit einer Konzentration von ca. 20 % vorhanden ist. Die nöti-

gen Einsatzkonzentrationen liegen für Rutin und Uvinul MS 40 in einer realistischen Größenordnung (ca. 6 %), während für den Extrakt die Konzentration ca. 30 % betragen müßte, um einen ausreichenden UVA-Schutz zu erzielen. Für den UVA-Bereich ist der Extrakt als alleiniger UV-Filter folglich nicht geeignet. Nach den Maßstäben des Australischen Standards liegen die notwendigen Konzentrationen in der gleichen Größenordnung wie die vorher berechneten Konzentrationen, während für Uvinul MS 40 eine deutlich höhere Konzentration nötig wäre. Dies belegt die unzureichende UVA-Schutzwirkung von Uvinul MS 40.

Im UVB-Bereich ist die spezifische Absorption von Rutin nur etwa halb so groß wie die von Uvinul MS 40. Daraus resultieren Mindesteinsatzkonzentrationen für Rutin von ca. 11%, für Uvinul MS 40 von ca. 4%. An Extrakt müßte eine noch höhere Konzentration als im UVA-Bereich eingesetzt werden, so daß der alleinige Einsatz auch im UVB-Bereich keinen ausreichenden Schutz bietet.

Es wird deutlich, daß sich die UV-Filter-Profile von Rutin und Extrakt auf der einen Seite und Uvinul MS 40 auf der anderen Seite deutlich unterscheiden. Uvinul MS 40 weist im UVB-Bereich eine höhere Absorptionswirkung auf als im UVA-Bereich, während es sich bei Rutin und dem Extrakt umgekehrt verhält. Dieser Unterschied wird auch durch den UVA/UVB-Quotient dargestellt. Für Uvinul MS 40 liegt dieser Wert unter 1, d. h. die Absorption ist im UVA-Bereich schwächer als im UVB-Bereich. Für Rutin und den Extrakt liegt der UVA/UVB-Quotient bei 1,445 bzw. 0,986. Ein idealer Breitband-Filter würde einen UVA/UVB-Quotient von 1 besitzen, d. h. in beiden Bereiche nahezu gleich stark absorbieren. Der Extrakt kommt dieser Forderung am nächsten. Rutin absorbiert mehr im UVA-Bereich als im UVB-Bereich. Betrachtet man das Kriterium kritische Wellenlänge, so stellt man fest, daß Rutin und der Extrakt im Gegensatz zu Uvinul MS 40 das Kriterium für einen Breitband-Filter erfüllen ($\lambda_c \geq 370$ nm).

4.3.2 Scavenger-Eigenschaften am DPPH-Modell

Obwohl DPPH kein biologisch relevantes Radikal ist, ist der DPPH-Assay dennoch gut geeignet, um die antioxidativen Eigenschaften von Substanzen abschätzen zu können. Im folgenden werden die Reaktivität mit DPPH von Extrakt (Rutingehalt 20 %) und der äquivalenten Konzentration an reinem Rutin verglichen. Für beide Substanzen wird in Abhängigkeit von der Konzentration die antioxidative Aktivität bestimmt. Aus den ermittelten Werten wird mittels nicht-linearer Regression der SC_{50} -Wert berechnet, d. h. die Konzentration, die nötig ist, um 50 % des DPPH zu reduzieren. Wie aus Abb. 4.14 ersichtlich ist, ist die antioxidative Aktivität für den Extrakt und Rutin konzentrationsabhängig ausgeprägt. Der SC_{50} -Wert für den Extrakt liegt bei $59,01 \pm 5,93$ µg/ml, entsprechend $11,87 \pm 1,24$ µg/ml, berechnet als Rutin. Der SC_{50} -Wert für Rutin unterscheidet sich signifikant von dem des Extraktes (berechnet als Rutin) ($p < 0,01$) und liegt bei $16,67 \pm 1,11$ µg/ml. Dies läßt darauf schließen, daß im Extrakt neben dem Rutin auch noch weitere Substanzen für die antioxidative Wirkung verantwortlich sind. Extrakt und Rutin unterscheiden sich unter den gewählten Bedingungen nur bei Konzentrationen bis 20 µg/ml ($p < 0,01$). Die fehlende Signifikanz bei höheren Konzentrationen ist auf die vorliegende DPPH-Konzentration zurückzu-

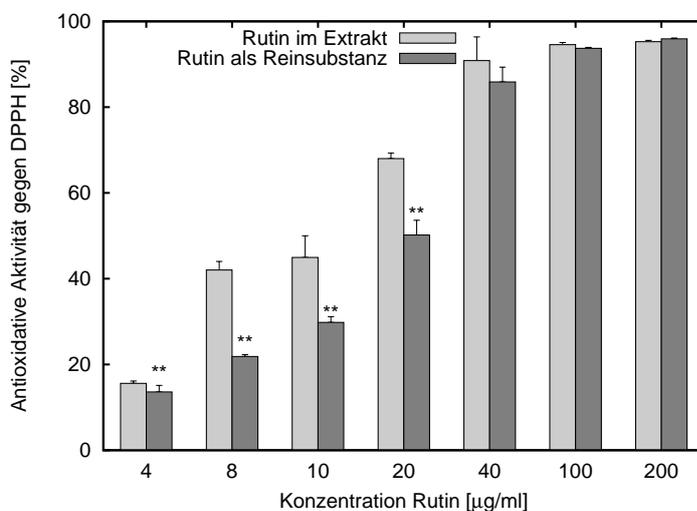


Abbildung 4.14: Scavenger-Eigenschaften von Rutin und Extrakt am DPPH-Modell. Dargestellt ist jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=3$). **: signifikant verschieden von der jeweiligen Extraktkonzentration ($p < 0,01$).

führen. Das molare Verhältnis DPPH:Rutin liegt bei einer Rutinkonzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$ bei 42:1, bei 40 $\mu\text{g/ml}$ bei 4:1 und bei 200 $\mu\text{g/ml}$ bei 0,85:1. Für den Extrakt kommt es ab einer Konzentration von ca. 40 $\mu\text{g/ml}$ zu keiner nennenswerten Steigerung der antioxidativen Aktivität mehr, d. h. eine Differenzierung bezüglich der antioxidativen Aktivität zwischen Rutin und Extrakt wäre nur bei Einsatz eines größeren Verhältnisses DPPH zu Antioxidans möglich. Die erzielten Ergebnisse liegen in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen von MENSOR et al., die im DPPH-Assay für Rutin einen SC_{50} -Wert von 14,16 $\mu\text{g/ml}$ fanden [109].

4.3.3 Hemmung der Ketoprofen-induzierten Linolsäureperoxidation

Der folgende Versuch beruht auf der Tatsache, daß durch UVA-Bestrahlung aus Ketoprofen verschiedene Photoprodukte entstehen, die entweder direkt oder indirekt über reaktive Sauerstoffspezies aus Linolsäure die entsprechenden Peroxide (Hydroperoxyoctadecadiensäuren, HPODE) bilden können [142]. Dieses Modell ist physiologisch relevant, da Linolsäure Bestandteil der Hautlipide ist [126] und UV-Strahlung in vivo eine wichtige Quelle für die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies darstellt [45]. Der Buchweizenextrakt sollte in der Lage sein, über zwei verschiedene Reaktionsmechanismen die Ketoprofen-induzierte Linolsäureperoxidation zu hemmen: zum einen über die Absorption von UV-, besonders UVA-Strahlung, zum anderen als Radikalfänger für Ketoprofen-Photoprodukte bzw. radikale Sauerstoffspezies. Zu diesem Zweck werden Lösungen von Linolsäure und Ketoprofen mit Zusatz von Buchweizenextrakt in drei verschiedenen Konzentrationen mit UVA im Dosisbereich 1-5 J/cm^2

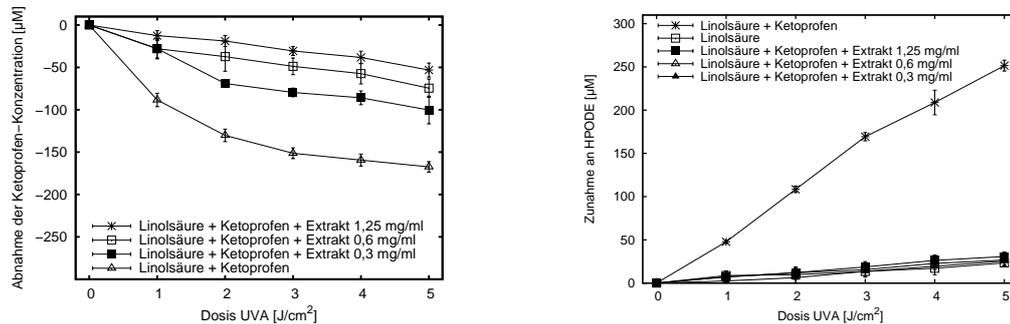


Abbildung 4.15: Hemmung des Ketopfenabbaus (links) sowie der Linolsäureperoxidation (rechts) durch Zusatz von Extrakt im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle. Dargestellt ist jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=3$).

bestrahlt. 5 J/cm^2 UVA entsprechen einer Bestrahlungszeit von ca. 20 Minuten im Juni im Mittelmeerraum [154].

In Abb. 4.15 wird deutlich, daß der Ketopfen-Abbau durch den Zusatz von Extrakt konzentrationsabhängig gehemmt wird. Bei einer Bestrahlungsdosis von 5 J/cm^2 erreicht man mit allen Extraktkonzentrationen eine signifikante Hemmung des Ketopfenabbaus gegenüber der Kontrolle ohne Extrakt ($p < 0,01$). Die Effekte der Konzentrationen unterscheiden sich zwischen 0,3 und 1,25 mg/ml sowie zwischen 0,6 und 1,25 mg/ml ebenfalls signifikant ($p < 0,05$), d. h. je mehr Extrakt man einsetzt, desto geringer fällt die Ketopfenzersetzung aus. Das läßt sich dadurch erklären, daß die UV-Absorptionsfähigkeit des Extraktes proportional zur eingesetzten Konzentration und der Ketopfenabbau abhängig von der eingestrahnten Menge an UVA-Strahlung ist.

Es wird ebenfalls deutlich, daß der Extrakt in der Lage ist, die Bildung von Linolsäureperoxiden zurückzudrängen (s. Abb. 4.16). Alle Extraktkonzentrationen beeinflussen hochsignifikant die Linolsäureperoxidation gegenüber der Kontrolle ohne Extrakt ($p < 0,001$). Allerdings finden sich hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen. Für alle Extraktkonzentrationen ist die Menge an entstandenen Linolsäureperoxiden nicht signifikant verschieden von der Konzentration, die bei einer Bestrahlung von Linolsäure ohne protektive Zusätze entsteht (s. Abb. 4.15 rechts). Gegenüber den äquivalenten Mengen an Rutin zeigt sich für den Buchweizenextrakt bei allen Konzentrationen eine signifikant höhere Reduktion der HPODE-Menge ($p < 0,01$). Für Rutin wird zudem eine Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung beobachtet (Abb. 4.16).

Außerdem wird die Wirkung des Extraktes mit der eines reinen UV-Absorbers, Uvinul MS 40, verglichen. Dazu werden Konzentrationen mit gleicher UV-Absorptionsfähigkeit im UVA-Bereich (bestimmt als integrale Absorption, vgl. Abb. 4.17) eingesetzt. Dies spiegelt sich in der gleichen Hemmung der Ketopfen-Zersetzung wider (Abb. 4.18 links).

In Abb. 4.18 links ist zu erkennen, daß die Hemmung des Ketopfen-Abbaus bei

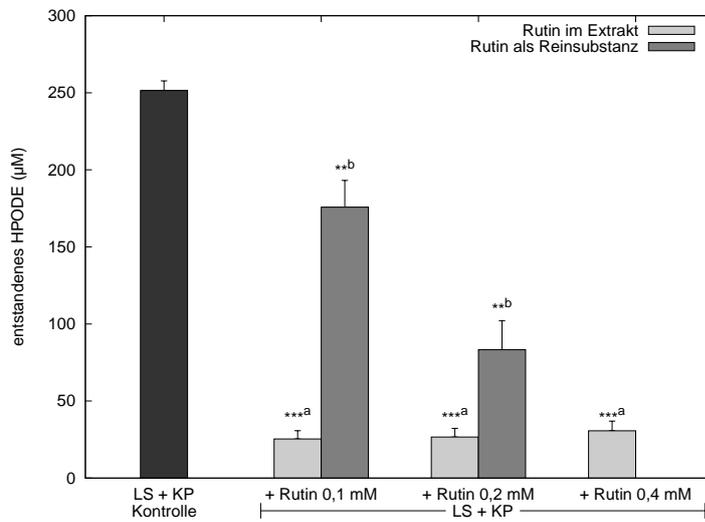


Abbildung 4.16: Vergleich der entstandenen Mengen an HPODE (Linolsäureperoxiden, bestimmt als 13-HPODE) bei einer Bestrahlungsdosis von 5 J/cm^2 UVA unter Einsatz verschiedener Rutin- und Extraktkonzentrationen. Die Daten für Rutin sind entnommen aus [84]. Der Wert für Rutin als Reinsubstanz in der Konzentration 0,4 mM wurde nicht bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=3$). ***a: signifikant verschieden von der bestrahlten Kontrolle ($p < 0,001$); **b: signifikant verschieden von den jeweiligen Werten für den Extrakt ($p < 0,01$). LS: Linolsäure, KP: Ketoprofen

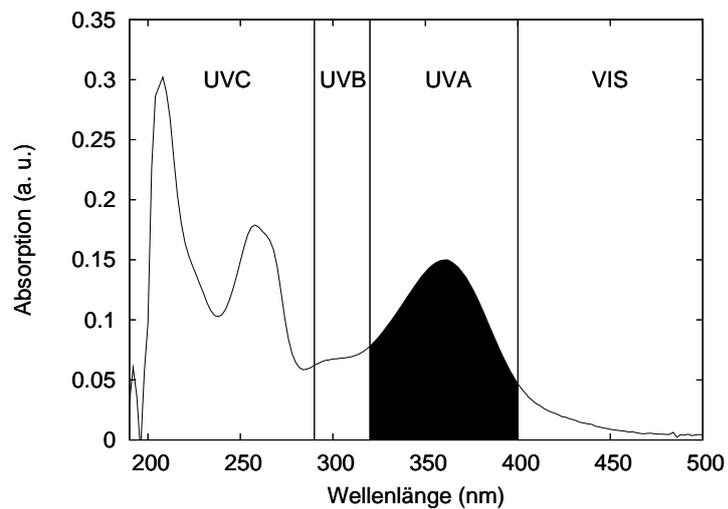


Abbildung 4.17: Bestimmung der integralen Absorption für Rutin im Bereich 320-400 nm

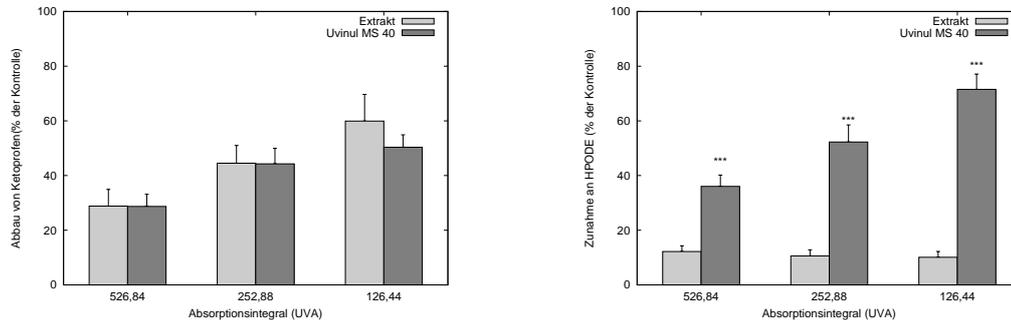


Abbildung 4.18: Vergleich der Auswirkungen von Extrakt und Uvinul MS 40 auf die Zersetzung von Ketoprofen (links) und die Bildung von HPODE (rechts). ***: signifikant verschieden von den jeweiligen Werten für den Extrakt ($p < 0,001$).

Zusatz äquivalenter Mengen Extrakt und Uvinul sich nicht signifikant unterscheidet. Dies bestätigt die Richtigkeit der Konzentrationsberechnungen aus den spezifischen integralen Absorptionen und bedeutet also den Einsatz von Konzentrationen mit der gleichen Fähigkeit zur UV-Absorption.

Hätte der Extrakt über die UV-Absorptionsfähigkeit hinaus keine weiteren photoprotektiven Eigenschaften, müßten sich für die Hemmung der Linolsäureperoxidation ähnliche Werte wie bei Zusatz von Uvinul MS 40 ergeben. Aus Abb. 4.18 rechts wird aber deutlich, daß für alle eingesetzten Konzentrationen die Zunahme an HPODE beim Extrakt signifikant niedriger ist als bei Zusatz von Uvinul MS 40 ($p < 0,001$). Dabei zeigt sich für Uvinul MS 40 eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit, während dies für den Extrakt nicht der Fall ist. Dies führt zu dem Schluß, daß der Extrakt zusätzlich zu seinen UV-Absorptionseigenschaften antioxidative Eigenschaften hat, die die Peroxidation von Linolsäure verhindern können, und daß die antioxidativen Eigenschaften stärker ausgeprägt sind als die UV-absorbierende Wirkung.

4.3.4 Wirksamkeit am Keratinozyten-Modell

In Untersuchungen von STRAFACE et al. konnte gezeigt werden, daß die HaCaT-Zelllinie geeignet ist, um die UV-induzierte Zytotoxizität zu untersuchen. Dabei ergaben sich mikroskopisch sichtbare morphologische Veränderungen sowohl nach UVA- als auch nach UVB-Bestrahlung [159]. In der Literatur konnte anhand des Keratinozyten-Modells auch der protektive Effekt von Antioxidantien bei Schädigung durch UV-Strahlung nachgewiesen werden [132]. Es soll nun untersucht werden, welchen Effekt der Zusatz des Buchweizenextraktes in verschiedenen Konzentrationen auf die Lebendzellzahl nach UV-Bestrahlung hat.

Nach einer UVA-Bestrahlung von 8 J/cm^2 zeigt sich ein deutlicher Rückgang der Lebendzellzahl gegenüber der unbestrahlten Kontrolle ($p < 0,001$). Durch Zusatz des Buchweizenextraktes läßt sich die Lebendzellzahl gegenüber der bestrahlten Kontrolle signifikant steigern ($p < 0,05$), allerdings nicht mehr auf das Niveau der unbestrahl-

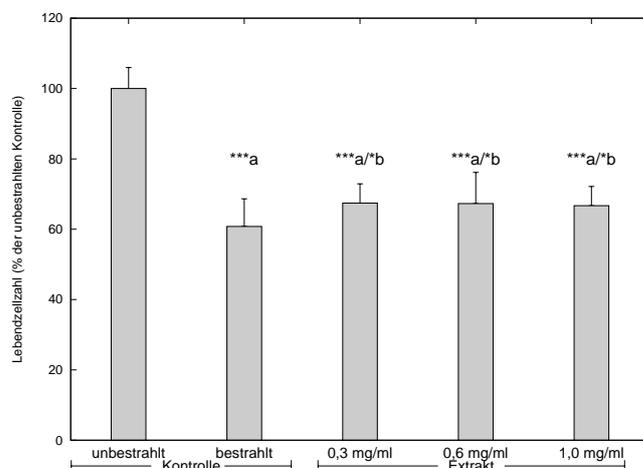


Abbildung 4.19: Lebendzellzahl (Kristallviolett-Färbung) von humanen Keratinozyten nach Bestrahlung mit 8 J/cm^2 UVA und Einfluß des Buchweizenextraktes in % der unbestrahlten Kontrolle. Dargestellt ist jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung ($n \geq 8$). ***a: signifikant verschieden von der unbestrahlten Kontrolle ($p < 0,001$); *b: signifikant verschieden von der bestrahlten Kontrolle ($p < 0,05$).

ten Kontrolle. Die Unterschiede zwischen den eingesetzten Konzentrationen sind nicht signifikant.

Die Bestrahlung mit 100 mJ/cm^2 UVB führt zu einer signifikanten Reduktion der vitalen Zellen gegenüber der unbestrahlten Kontrolle ($p < 0,001$). Die Behandlung der Zellen mit Buchweizenextrakt führt gegenüber der bestrahlten Kontrolle zu einer signifikant höheren Lebendzellzahl ($p < 0,001$). Im Unterschied zur UVA-Bestrahlung läßt sich bei UVB-Bestrahlung durch Zusatz von Buchweizenextrakt eine Protektion auf das Niveau der unbestrahlten Kontrolle erreichen. Der Unterschied zwischen den Konzentrationen ist wiederum nicht signifikant.

Der protektive Effekt von Rutin im Zellmodell wurde in der Literatur bereits untersucht. Dabei findet sich eine gute Übereinstimmung mit Ergebnissen von NICKEL. Dabei wird die protektive Wirkung von Rutin hauptsächlich auf die UV-absorbierenden Eigenschaften zurückgeführt [124]. Allerdings sollten sich in diesem Fall die Konzentrationsunterschiede auswirken (durch Erhöhung der UV-Absorption). Außerdem lassen sich damit nicht die gefundenen Unterschiede zwischen UVA- und UVB-Bestrahlung erklären, da der Extrakt im UVA-Bereich deutlich mehr absorbiert als im UVB-Bereich (vgl. Abschnitt 4.3.1). Daneben ist aber auch zu beachten, daß die UVA-Dosis deutlich höher liegt als die UVB-Dosis, so daß auch von einer höheren Schädigung durch die UVA-Bestrahlung auszugehen ist. Es zeigt sich also, daß im Modellsystem HaCaT-Keratinozyten der Extrakt sowohl bei UVA- als auch bei UVB-Bestrahlung einen protektiven Effekt auf die Lebendzellzahl hat.

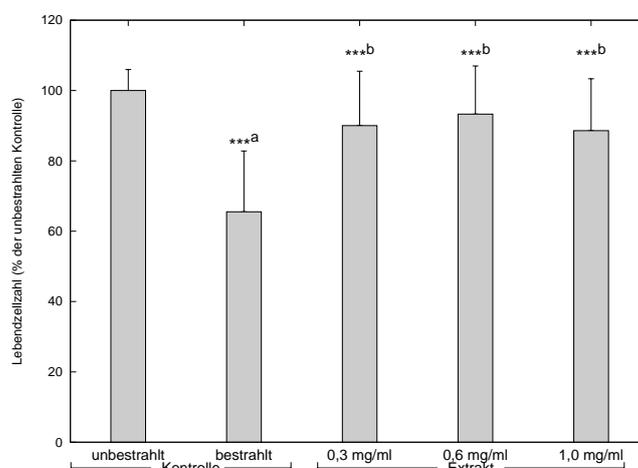


Abbildung 4.20: Lebendzellzahl (Kristallviolett-Färbung) von humanen Keratinozyten nach Bestrahlung mit 100 mJ/cm^2 UVB und Einfluß des Buchweizenextraktes in % der unbestrahlten Kontrolle. Dargestellt ist jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung ($n \geq 8$). ***a: signifikant verschieden von der unbestrahlten Kontrolle ($p < 0,001$); ***b: signifikant verschieden von der bestrahlten Kontrolle ($p < 0,001$).

4.3.5 Photoprotektive Eigenschaften am HET-CAM-Modell

In Untersuchungen von NEUMANN et al. wurde die Eignung des HET-CAM-Modells zur Evaluierung von Photoprotektiva festgestellt [122]. Mit Hilfe dieses Modells wird nun der Schutzeffekt des Extraktes gegen UV-Strahlung untersucht. Als Strahlungsdosen werden 5 J/cm^2 UVA sowie 120 mJ/cm^2 UVB eingesetzt. Der Extrakt wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet, als Kontrolle dienen Eier mit PBS, die jeweils mit der gleichen Dosis bestrahlt werden.

In Abb. 4.21 zeigt sich, daß die gewählte Dosis an UVA-Strahlung keinen Einfluß auf die Perfusion hat. Der LDF-Index unterscheidet sich nicht signifikant von dem Wert für die Kontrolle. Um einen eventuellen Effekt des Extraktes nachweisen zu können, müßten weitere Untersuchungen mit einer höheren UVA-Dosis vorgenommen werden. Bei der Bestrahlung mit UVB zeigt sich für die bestrahlte Kontrolle ein erhöhter Wert für die Perfusion, was auf irritative Prozesse schließen läßt. Die eingesetzte Dosis Extrakt kann den LDF-Index auf einen signifikant niedrigeren Wert senken ($p < 0,05$).

In der Literatur ist die Verwendung des sogenannte „Photo-HET-CAM-Tests“ nicht weit verbreitet. Es finden sich dazu lediglich zwei Veröffentlichungen von NEUMANN et al. [121, 122]. Bezüglich der verwendeten UV-Dosen lassen sich die Ergebnisse bestätigen: Eine Dosis von 5 J/cm^2 UVA bewirkt keine toxischen Effekte, wohingegen 120 mJ/cm^2 UVB zu irritativen Phänomenen führt. Auch finden sich die beschriebenen großen Streuungen des Modells. Dies ist verständlich, da es sich bei dem HET-CAM-Modell um ein komplexes biologisches System handelt.

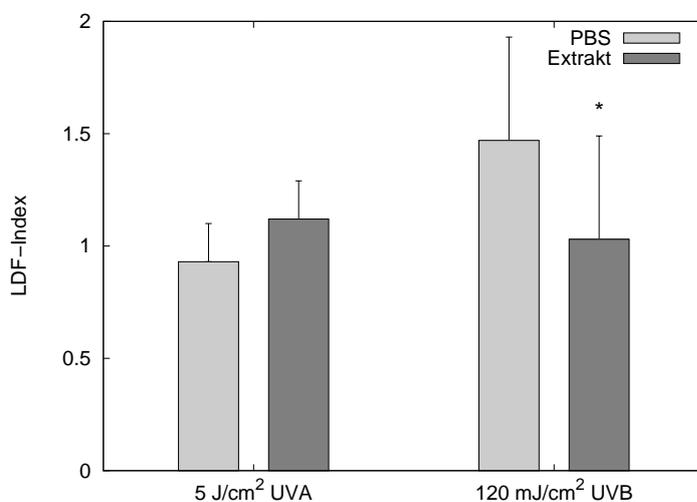


Abbildung 4.21: Einfluß von Buchweizenextrakt (1 mg/ml) auf UV-induzierte Schäden, bestimmt als LDF-Index 25 Minuten nach der Bestrahlung, am HET-CAM-Modell. Dargestellt ist jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung (n=12). *: signifikant verschieden gegenüber bestrahlter Kontrolle ($p < 0,05$).

4.3.6 Zusammenfassung: Eignung des Extraktes als Photoprotektivum

Die Wirksamkeit des Extraktes als Photoprotektivum wurde mit verschiedenen Methoden untersucht. Im Vergleich zu reinem Rutin und dem kommerziellen UV-Filter Uvinul MS 40 zeigte sich für den Extrakt eine Breitbandwirkung in der Absorption von UV-Strahlen. Allerdings ist die Absorption insgesamt nicht stark genug, so daß der Extrakt nicht allein als UV-Filter eingesetzt werden kann.

Im DPPH-Assay waren die antioxidative Eigenschaften des Extraktes signifikant stärker ausgeprägt als die entsprechender Mengen Rutin. Unter Verwendung eines Modells der Ketoprofen-verstärkten UVA-induzierten Peroxidation von Linolsäure konnte der Extrakt konzentrationsabhängig die Ketoprofen-Photodegradation hemmen. Gleichzeitig zeigte sich für die Zunahme an Linolsäure-Peroxidationsprodukten, daß der Extrakt stärker inhibierend wirkt als äquivalente Mengen Rutin. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, daß die Wirkung des Extraktes in diesem System nicht nur auf die UV-absorbierenden Eigenschaften zurückzuführen ist, da Extrakt-Konzentrationen, die den Ketoprofen-Zerfall im gleichen Ausmaß wie Uvinul MS 40 hemmen, die Bildung von Linolsäureperoxiden signifikant stärker zurückdrängen als der reine UV-Filter.

An einer humanen Keratinozyten-Zelllinie konnte der Extrakt die Lebendzellzahl sowohl bei UVA- als auch bei UVB-Bestrahlung signifikant gegenüber der bestrahlten Kontrolle erhöhen. Im HET-CAM-Modell zeigte sich aufgrund zu niedriger UVA-Dosen die Schutzwirkung des Extraktes lediglich im UVB-Bereich.

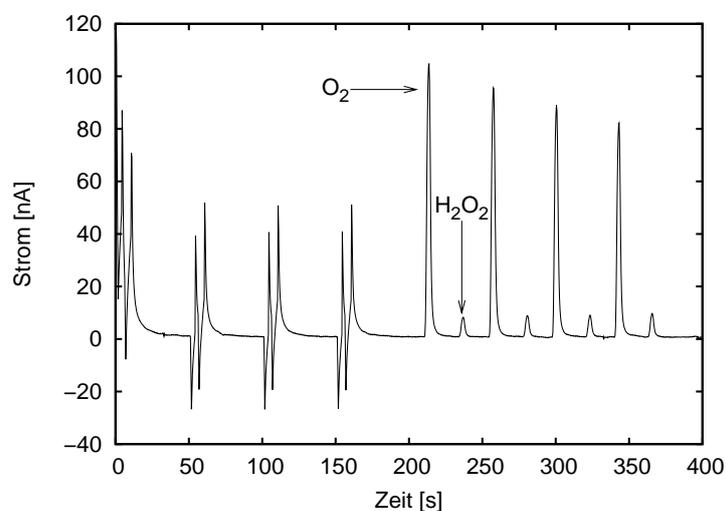


Abbildung 4.22: Beispielhaftes Elektropherogramm (CE mit elektrochemischer Detektion, CE-Methode 3) zur Bestimmung von Sauerstoffverbrauch und Zunahme an Wasserstoffperoxid bei der Bestrahlung einer Extraktlösung mit sichtbarem Licht.

Insgesamt läßt sich feststellen, daß der Extrakt über ausgezeichnete photoprotektive Eigenschaften verfügt und damit geeignet ist, in Sonnenschutzprodukten verwendet zu werden. Um die unzureichenden UV-Filtereigenschaften auszugleichen, bietet sich die gleichzeitige Einarbeitung eines chemischen UV-Filters bzw. von Mikropigmenten wie Titandioxid oder Zinkoxid an. Außerdem muß noch der Einfluß von Formulierungsgrundlagen auf die UV-Absorption eines extrakthaltigen Sonnenschutzmittels untersucht werden. Weiterführende Experimente sollten die Schutzwirkung des Extraktes auf verschiedene Zielstrukturen der menschlichen Haut *in vivo* untersuchen.

4.4 Photochemische Eigenschaften

In den letzten Jahren haben Untersuchungen Aufsehen erregt, in denen nachgewiesen wurde, daß viele chemische UV-Filter, die in Sonnenschutzprodukten eingesetzt werden, bei Lichtbestrahlung nicht stabil sind [39, 118, 154]. Aus diesem Grund wird die Wirkung verschiedener Arten von Strahlung auf den Extrakt untersucht.

4.4.1 Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht

Mit Hilfe der Kapillarelektrophorese mit elektrochemischer Detektion (wie z. B. in [141] beschrieben) kann parallel die Sauerstoffabnahme sowie die Zunahme an Wasserstoffperoxid in einer bestrahlten Extraktlösung beobachtet werden. Während der

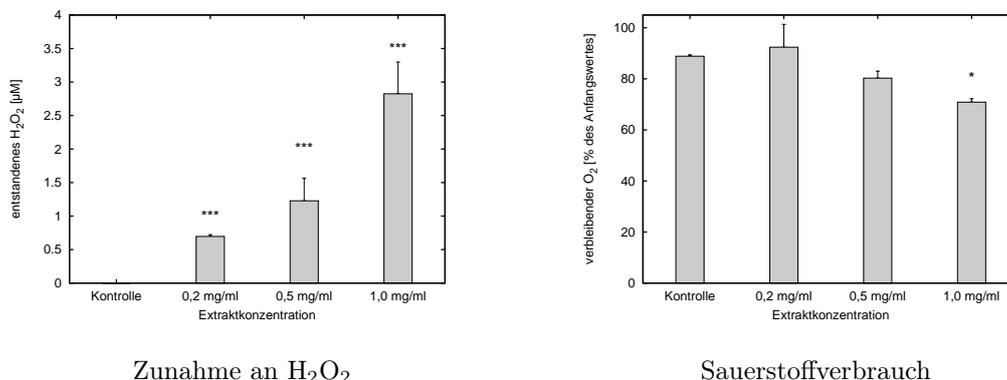


Abbildung 4.23: Zunahme an Wasserstoffperoxid und Sauerstoffverbrauch bei 15minütiger Bestrahlung einer Extraktlösung mit sichtbarem Licht in Abhängigkeit von der eingesetzten Extraktkonzentration. Dargestellt ist jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=3$). *: signifikant verschieden von der Kontrolle ($p < 0,05$); ***: $p < 0,001$.

Messung erfolgt die Bestrahlung mit einem 50 W-Halogenstrahler aus einer Entfernung von 25 cm. Nach der Messung wird die Probe weitere 8 min bestrahlt, danach erfolgt eine weitere Injektion. Eine beispielhafte Darstellung der sich ergebenden Elektropherogramme findet sich in Abb. 4.22.

In Abb. 4.23 ist zu sehen, daß es bei Bestrahlung der Extraktlösung zur Entstehung von Wasserstoffperoxid kommt. Die Menge an entstandenem Wasserstoffperoxid unterscheidet sich bei allen eingesetzten Extraktkonzentrationen signifikant von der Kontrolle ($p < 0,001$). Auch der Zuwachs mit steigender Extraktkonzentration ist signifikant ($p < 0,05$). Bezüglich des Sauerstoffverbrauchs unterscheiden sich die Konzentrationen 0,2 mg/ml und 0,5 mg/ml nicht signifikant von der Kontrolle, während es bei einer Extraktkonzentration von 1,0 mg/ml zu einem signifikant höheren Sauerstoffverbrauch als beim reinen Lösungsmittel kommt ($p < 0,05$).

Die Produktion von Wasserstoffperoxid bzw. Hydroxylradikalen durch Flavonoide (allerdings ohne Bestrahlung) ist in der Literatur beschrieben [26, 28, 75, 112]. In Untersuchungen von CANADA wurde die Entstehung von H₂O₂ auf Autoxidationsprozesse zurückgeführt, die mit zunehmendem pH-Wert deutlich schneller verlaufen [26]. In den vorliegenden Experimenten wurde der Extrakt in 10 mM Borax (pH 8,5) gelöst, so daß durch den alkalischen pH-Wert Autoxidationsprozesse nicht ausgeschlossen werden können. Es bleibt also zu untersuchen, ob der pH-Wert des Lösungsmittels einen Einfluß auf die Photostabilität hat (vgl. Abschnitt 4.4.3). Außerdem stellt sich die Frage, ob die Art der eingesetzten Strahlung die Photostabilität des Extraktes beeinflusst.

Bezüglich der absoluten Menge an Wasserstoffperoxid läßt sich feststellen, daß bei einer Extraktkonzentration von 1,0 mg/ml bei 15 min Bestrahlung ca. 2,8 µM Wasserstoffperoxid entstanden sind. NICKEL stellte in Untersuchungen an humanen Keratinozyten fest, daß erst ab einer Konzentration von ca. 100 µM Wasserstoffperoxid mit

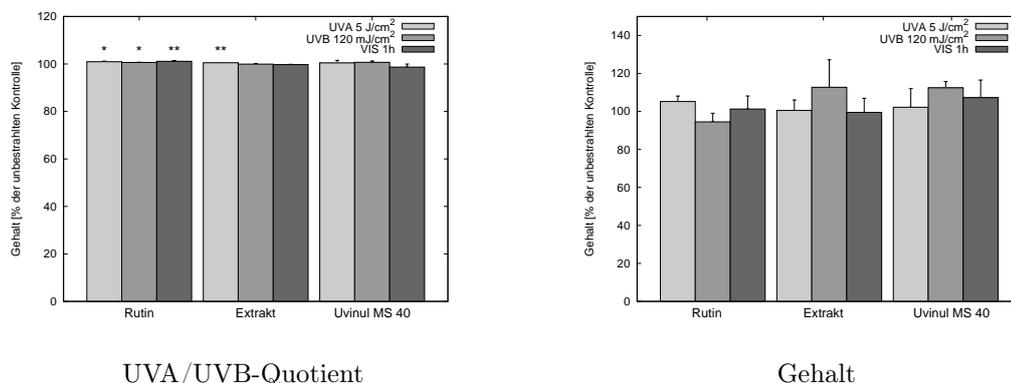


Abbildung 4.24: Photostabilität von Rutin, Extrakt und Uvinul MS 40 als Festfilm. Die Werte sind jeweils angegeben als % der unbestrahlten Kontrolle (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=3$). *: signifikant verschieden von der unbestrahlten Kontrolle, $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Auswirkungen auf die Vitalität der Keratinozyten zu rechnen ist [124]. Bei den untersuchten Extraktkonzentrationen und Bestrahlungszeiten ist also nicht mit toxischen Erscheinungen zu rechnen.

4.4.2 Photostabilität des Extraktes als Festfilm

Um die Photostabilität des Extraktes umfassend charakterisieren zu können, wird der Extrakt zuerst als Festfilm entsprechend eines Protokolls der COLIPA untersucht [13]. Als Referenz werden Rutin als Reinsubstanz sowie der kommerziell verwendete UV-Filter Uvinul MS 40 eingesetzt. Nach dem Auftragen auf Glasplatten werden die eingetrockneten Lösungen mit 5 J/cm^2 UVA, 120 mJ/cm^2 UVB bzw. 1 h mit sichtbarem Licht (50 W aus einer Entfernung von 40 cm) bestrahlt. Die eingesetzten Strahlungsdosen entsprechen (gemessen im Juni im Mittelmeerraum) einer Bestrahlungszeit von 20 min (für die UVA-Dosis) bzw. 12 min (für die UVB-Dosis) [154]. Die UVB-Dosis von 120 mJ/cm^2 entspricht außerdem 5 MED (mittlere Erythemdosis), die von der COLIPA als Dosis für Photostabilitätsuntersuchungen empfohlen wurden [13, 88]. Danach wird der Festfilm mit Methanol 80 % (V/V) abgewaschen und die UV-Spektren aufgenommen. Zusätzlich wird mit CE der Gehalt an Rutin bzw. Uvinul MS 40 bestimmt. Als Kontrolle dienen Lösungen, die zwar auf die Glasplatten aufgetragen, aber nicht bestrahlt wurden.

Aus den UV-Spektren werden die Flächen unter der Absorptionskurve im Bereich der UVA-Strahlung (320–400 nm) und der UVB-Strahlung (290–320 nm) bestimmt und daraus der Quotient berechnet. Dieser Quotient ist ein Maß für eventuelle Veränderungen im Flavonoid-Grundgerüst, da bestimmten Teilen des Gerüsts Banden im Absorptionsspektrum zugeordnet werden können [24]. Durch Veränderungen im Spektrum kann sich auch die kritische Wellenlänge λ_c verschieben [40].

Aus Abb. 4.24 läßt sich entnehmen, daß sich unter den gewählten Bedingungen für Rutin und den Extrakt teilweise zwar Veränderungen im UVA/UVB-Quotienten erge-

ben, die Bestrahlung aber keinen signifikanten Einfluß auf den Gehalt der jeweiligen Substanz hat. Auch in der kritischen Wellenlänge ergeben sich keine signifikanten Verschiebungen (Daten nicht abgebildet). Man kann also davon ausgehen, daß die drei untersuchten Substanzen unter den gewählten Bestrahlungsbedingungen als Festfilm stabil sind. Unter ähnlichen Bedingungen (5 MED UVB) wurden in Experimenten von BERSET et al. für den synthetischen UV-Filter Octylmethoxycinnamat Zersetzungsraten von ca. 25 % gefunden. In Untersuchungen von MENDL zeigte Rutin als Festfilm einen Zerfall von ca. 10 % nach Bestrahlung mit UVC-Licht ($6,5 \text{ J/cm}^2$), während Quercetin unter den gleichen Bedingungen zu ca. 25 % zersetzt wurde [108]. Allerdings sind diese Untersuchungen nur bedingt mit den hier durchgeführten vergleichbar, da, abgesehen von der höheren Strahlendosis, z. B. Rutin im Bereich der UVC-Strahlung etwa doppelt so viel Licht absorbiert wie im Bereich der UVA-Strahlung.

4.4.3 Photostabilität des Extraktes in Lösung

Zusätzlich zur Bestrahlung als Festfilm soll auch die Stabilität in Lösung in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht werden. Dazu wird der Extrakt sowohl in Borax (pH 8,5) als auch in einem Phosphatpuffer (pH 7,0) gelöst. Zusätzlich wird auch das Verhalten von Rutin in Borax untersucht. Die Bestrahlungsdauer mit sichtbarem Licht wird auf 30 min verkürzt, um den ungefähren Bestrahlungszeiten im Sonnenlicht für die eingesetzten UVA- und UVB-Dosen zu entsprechen.

Es zeigt sich (s. Abb. 4.25), daß bezüglich des UVA/UVB-Quotienten sich bei allen drei Strahlungsarten signifikante Unterschiede zur unbestrahlten Kontrolle für die Extraktlösungen ergeben, unabhängig vom pH-Wert der Lösung. Dabei sind die Veränderungen bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht jeweils am stärksten ausgeprägt. Der Rückgang des UVA/UVB-Quotienten ist für den Extrakt in Boraxpuffer bei allen Bestrahlungsarten stärker als für den Extrakt in Phosphatpuffer. Für Rutin bleibt der UVA/UVB-Quotient konstant. Betrachtet man die gemessenen Rutin-Konzentrationen, zeigt sich, daß bei Bestrahlung des Extraktes in Borax mit sichtbarem Licht es zu einem signifikanten Zerfall kommt ($p < 0,05$). Auf den Rutingehalt des Extraktes in Phosphatpuffer und von Rutin in Boraxpuffer haben die untersuchten Strahlungsdosen keinen Einfluß.

Die Veränderungen in den UVA/UVB-Quotienten lassen sich unter der Annahme oxidativer Veränderungen gut mit Befunden von MAKRIIS und ROSSITER begründen. In diesen Untersuchungen war bei der Oxidation von Rutin und auch Quercetin in den Spektren ein Rückgang der Absorption bei 359 nm und eine Erhöhung der Absorption bei 299 nm zu verzeichnen [105]. Bei einer solchen Veränderung wird bei der Berechnung der UVA/UVB-Quotienten die Fläche für den UVA-Bereich und damit der Quotient kleiner. Die Veränderungen in den Spektren können sich auch schon bei oxidativen Veränderungen in den Molekülen bemerkbar machen, die noch keinen Einfluß auf das Migrationsverhalten in der CE haben.

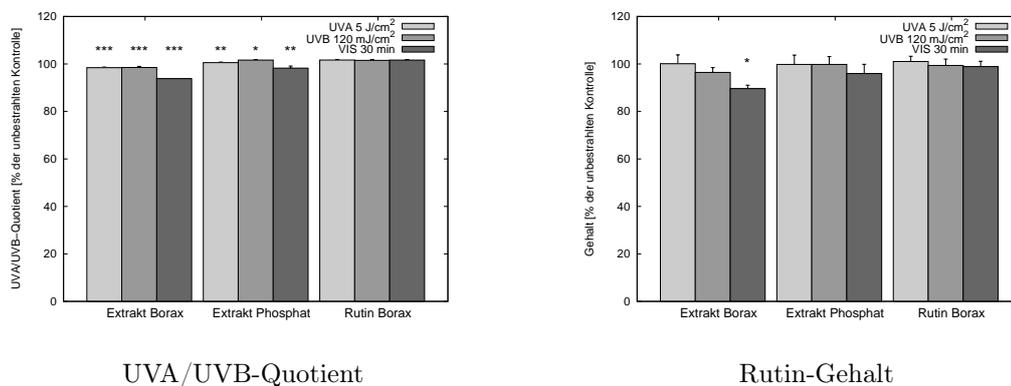


Abbildung 4.25: Photostabilität von Rutin und Extrakt in Lösung in Abhängigkeit vom gewählten Lösungsmittels. Die Werte sind jeweils angegeben als % der unbestrahlten Kontrolle (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=3$). *: signifikant verschieden von der unbestrahlten Kontrolle, $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4.4.4 Zusammenfassung: Stabilität des Extraktes bei Bestrahlung

Bei der Bestrahlung des Extraktes als Festfilm sowie in Lösung mit UVA, UVB und sichtbarem Licht zeigte sich für den Parameter UVA/UVB-Quotient jeweils ein signifikanter Unterschied zur unbestrahlten Kontrolle. Allerdings äußerte sich bei der Bestrahlung als Festfilm dieser Unterschied nicht in einer Verringerung des Rutin-Gehaltes. Für den Extrakt in Lösung zeigte sich eine Abhängigkeit der Photostabilität vom verwendeten Lösungsmittel. Bei einem pH-Wert von 7,0 (Phosphatpuffer) zeigte sich kein Unterschied zur unbestrahlten Kontrolle, während sich für den in Borax (pH 8,5) gelösten Extrakt bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht, nicht aber bei UVA- oder UVB-Bestrahlung ein signifikanter Abfall im Rutin Gehalt ergab. Dies ist evtl. auch auf den höheren Energieeintrag durch die Bestrahlung mit sichtbarem Licht zurückzuführen. Eine Lösung von reinem Rutin in Borax war hingegen stabil.

Mit Hilfe eines CE-Systems mit elektrochemischer Detektion konnte für den in Borax gelösten Extrakt die Entstehung von Wasserstoffperoxid bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht nachgewiesen werden. In Untersuchungen von KEMPE zeigte sich bei identischem Versuchsaufbau, daß dieses Phänomen nicht bei Rutin, jedoch bei Quercetin auftritt. Da im Buchweizenextrakt Quercetin durch hydrolytische Prozesse in alkalischem Milieu entstehen kann [36], läßt sich dadurch die Entstehung von Wasserstoffperoxid erklären.

In der Literatur ist die Photooxidation von Quercetin beschrieben. Dieser Prozeß wird durch die Anwesenheit eines Photosensitizers (Riboflavin) enorm beschleunigt. Allerdings läßt sich das Ausmaß der Photooxidation durch den Zusatz von Ascorbinsäure reduzieren [161]. In Untersuchungen von MONICI zeigte sich für Flavon eine deutliche Abhängigkeit der Photodegradation vom verwendeten Lösungsmittel. Der Zusatz von Tensiden, so daß das Flavonoid in mizellarer Lösung vorlag, führte zu einem fast kompletten Schutz vor Photooxidation [113].

MIROSSAY et al. untersuchten die Phototoxizität von Quercetin bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht in einer HL-60-Zelllinie. Dabei konnten sie bis zu einer Konzentration von 10 μM keine Beeinträchtigung der Zellvitalität feststellen. Darüberhinaus war Quercetin aber sogar in der Lage, die Phototoxizität von Hypericin positiv zu beeinflussen [111]. Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Arbeitsgruppe um WILHELM, die in humanen Keratinozyten die Phototoxizität von einem Extrakt aus *Hypericum perforatum* durch Zusatz verschiedener Flavonoide hemmen konnten [173].

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß es unter den untersuchten Bedingungen nur bei einer alkalischen Lösung des Extraktes zu nennenswerten Photoinstabilitäten kam. Da der Extrakt in topischen Formulierungen jedoch im neutralen bis leicht sauren Milieu zum Einsatz kommt, ist davon auszugehen, daß der Extrakt unter den normalen Einsatzbedingungen über eine ausreichende Photostabilität verfügt. Da aus der Literatur bekannt ist, daß die Stabilität von UV-Filtern in Sonnenschutzprodukten auch stark von den weiteren Hilfsstoffen abhängt [104], sollten die Untersuchungen zur Photostabilität ebenfalls an der extrakthaltigen Formulierung durchgeführt werden.

4.5 Galenik

4.5.1 Präformulierungsstudien

4.5.1.1 Hygroskopizität

Pflanzliche Trockenextrakte sind häufig hygroskopisch. Dies läßt sich zum einen auf die in pflanzlichen Extrakten ubiquitär vorhandenen Kohlenhydrate (z. B. Zucker) zurückführen [30], zum anderen aber auch auf die Lyophilisation, der der vorliegende Buchweizenextrakt unterzogen wurde. Die Hygroskopizität des Extraktes kann Auswirkungen auf die galenische Verarbeitbarkeit haben (Verklumpung, verbunden mit einer langsameren Auflösung in Vehikeln), aber auch u. U. Stabilitätsprobleme mit sich bringen, da in Anwesenheit von Wasser z. B. glykosidische Bindungen leichter gespalten werden können [15]. Die Hygroskopizität des Buchweizenextraktes (berechnet als mittlere Gleichgewichtsfeuchte EMC) wurde mit Hilfe der Methode von CALLAHAN charakterisiert [25].

In Abbildung 4.26 wird deutlich, daß es schon bei Luftfeuchten von unter 50% zu einer deutlichen Zunahme der EMC kommt. Nach CALLAHAN ist der Extrakt in die Hygroskopizitätsklasse IV (sehr hygroskopisch) einzuordnen. Bei Luftfeuchten von mehr als 50% verliert der Extrakt seine Pulvereigenschaften und wird zu einer zähen Masse, die sich nicht mehr verarbeiten läßt. Die Aufbewahrung des Extraktes sollte also bei niedrigen Luftfeuchten erfolgen. Der Einfluß der Luftfeuchte auf die Stabilität des Extraktes wird in Abschnitt 4.5.2 untersucht.

4.5.1.2 Löslichkeitsuntersuchungen

Die Löslichkeit des Extraktes in Wasser spielt für die Einarbeitung in topische Vehikel eine wichtige Rolle. Die Löslichkeit in Dodecanol und Glycerol wird untersucht, um einen Hinweis auf einen geeigneten Akzeptor für Liberationsuntersuchungen zu erhalten.

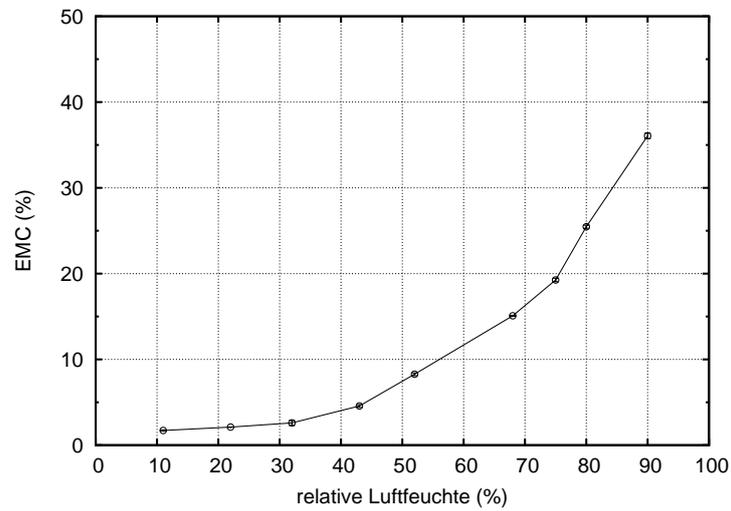


Abbildung 4.26: Hygroskopizität des Extraktes: mittlere Gleichgewichtsfeuchte (EMC) in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchte. Dargestellt ist jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung (n=2).

Tabelle 4.6: Sättigungslöslichkeiten von Rutin als Reinsubstanz bzw. im Buchweizenextrakt, jeweils in $\mu\text{g}/\text{ml}$. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3).

Medium	Reinsubstanz	im Extrakt
Dodecanol	77,39 \pm 3,52	60,74 \pm 5,94
Wasser	37,35 \pm 4,47	169,73 \pm 20,06
Glycerol	4859,32 \pm 472,24	4046,41 \pm 541,95

Aus den Löslichkeitsuntersuchungen (vgl. Tabelle 4.6) wird deutlich, daß Rutin im Extrakt eine deutlich bessere Wasserlöslichkeit besitzt als Rutin als Reinsubstanz ($p < 0,001$). Zu diesem Ergebnis kam auch NIESEL [125]. Die beiden Löslichkeiten unterscheiden sich um den Faktor 5. Rutin im Extrakt ist in Dodecanol allerdings schlechter löslich als Rutin als Reinsubstanz ($p < 0,05$). Hier ist der Unterschied in der Löslichkeit geringer als in Wasser (Faktor 1,3).

Für die Verarbeitbarkeit in topischen Arzneiformen ist die höhere Wasserlöslichkeit des Extraktes vorteilhaft. Ob sie allerdings bezüglich der Penetrationsfähigkeit in die Haut Nachteile mit sich bringt, wird in einem späteren Kapitel untersucht.

Zusätzlich wird die Löslichkeit des Extraktes in Mikroemulsionen untersucht. Mikroemulsionen sind moderne galenische Systeme, die eine Vielzahl von Vorteilen aufweisen. Sie verfügen über gute Solubilisierungseigenschaften für viele Arzneistoffe, fördern die Penetration von Arzneistoffen in die Haut, sind einfach herzustellen und besitzen eine hohe thermodynamische Stabilität [96]. Untersucht wurden zwei Mikroemulsionssysteme, die am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entwickelt worden sind und eine gute Hautverträglichkeit aufweisen [72, 79]. Die beiden Mikroemulsionen unterscheiden sich sowohl im verwendeten Tensidanteil als auch in der lipophilen Komponente. Es wird jeweils die Sättigungslöslichkeit von Rutin sowohl als Reinsubstanz als auch im Extrakt bestimmt.

In Abb. 4.27 zeigt sich, daß der Extrakt in beiden Mikroemulsionen besser löslich ist als Rutin als Reinsubstanz ($p < 0,001$). Zum einen läßt sich dieses Ergebnis auf den hohen Wasseranteil der Mikroemulsionen (50 %) zurückführen, da der Extrakt sich besser in Wasser löst als reines Rutin. Andererseits sind sowohl Extrakt als auch Rutin in den Mikroemulsionen wesentlich besser löslich als in reinem Wasser. Die IPP-Mikroemulsion verbessert die Extraktlöslichkeit im Vergleich zu Wasser fast um den Faktor 30, für Rutin sogar um den Faktor 1800.

Vergleicht man die beiden untersuchten Mikroemulsion, stellt man fest, daß sowohl Rutin im Extrakt als auch als Reinsubstanz in der Planta-Mikroemulsion deutlich besser löslich sind als in der IPP-Mikroemulsion ($p < 0,01$). Bei einem Rutin-Gehalt von 20 % in Extrakt lösen sich in der IPP-Mikroemulsion ca. 2,3 % Extrakt, in der Planta-Mikroemulsion dagegen 2,75 %.

4.5.1.3 Verteilungskoeffizient

Für Rutin im Extrakt und als Reinsubstanz wurde der scheinbare Verteilungskoeffizient im System Oktanol/Phosphatpuffer bei zwei verschiedenen pH-Werten (pH 5,5 und 7,4) untersucht. Für den Verteilungskoeffizienten in diesem System findet sich in der Literatur eine gute Korrelation mit den Verteilungskoeffizienten zwischen Wasser und humanem Stratum corneum [60]. Die pH-Werte des Phosphatpuffers wurden aufgrund der Verhältnisse in der Haut gewählt. Während in der Epidermis der pH-Wert bei 7,4 liegt, beträgt der pH-Wert an der Hautoberfläche ca. 5,5 [127]. Durch diesen pH-Gradienten werden ionisierbare Arzneistoffe wie das Rutin in ihrem Ionisierungsgrad und damit in ihrer Lipophilie beeinflusst.

Es zeigt sich für beide untersuchte Substanzen (Tab. 4.7) eine deutliche Abhängigkeit

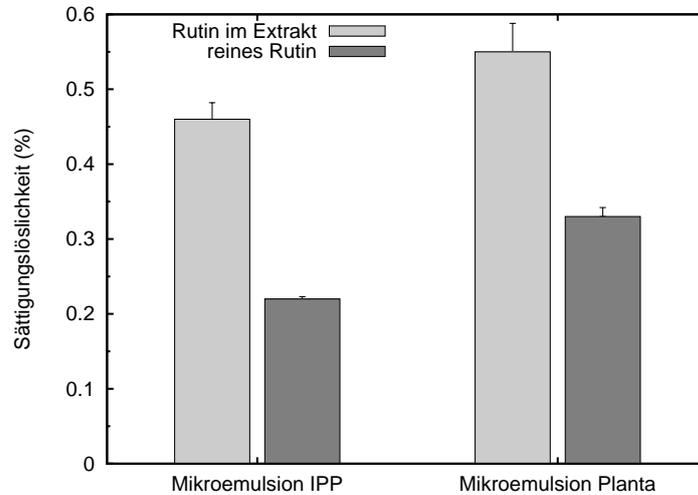


Abbildung 4.27: Löslichkeit von Rutin als Reinsubstanz und im Extrakt in verschiedenen Mikroemulsionen. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=3$).

Tabelle 4.7: log P-Werte für Rutin als Reinsubstanz und im Extrakt in Abhängigkeit vom pH-Wert. Dargestellt sind jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=3$).

	pH 5,5	pH 7,4
Rutin	0,65 \pm 0,07	-0,33 \pm 0,02
Extrakt	0,20 \pm 0,03	-0,39 \pm 0,02

des Verteilungskoeffizienten vom pH-Wert ($p < 0,001$). Der Verteilungskoeffizient ist in beiden Fällen bei pH 5,5 größer als bei pH 7,4. Die Änderungen mit zunehmendem pH-Wert fallen deswegen so gravierend aus, da der pK_S -Wert des Rutins mit einem Wert von ca. 6,8 zwischen den beiden untersuchten pH-Werten liegt. Im Bereich des pK_S -Wertes ändert sich der Grad der Ionisierung und damit die Verteilung zwischen der lipophilen und der hydrophilen Phase sprunghaft. Bei pH 5,5 ist der Lipophilie-Unterschied zwischen Rutin als Reinsubstanz und im Extrakt deutlich ausgeprägt ($p < 0,001$), während er bei pH 7,4 nicht signifikant ist.

Eine Substanz, die in Oktanol und Wasser gleichverteilt wäre, hätte einen log P-Wert von 0. Sowohl Rutin als auch der Extrakt liegen vom Verteilungskoeffizienten her nur wenig im lipophilen Bereich. Rutin als Reinsubstanz besitzt eine höhere Lipophilie als Rutin im Extrakt. Dieser Unterschied hat sich auch schon in den Löslichkeitsuntersuchungen gezeigt (vgl. Abschnitt 4.5.1.2). RODE fand für Verbindungen mit ähnlichem log P-Wert wie Rutin im Extrakt eine gute Penetration in das Stratum corneum von exzidiierter Schweinehaut [146]. Vom Verteilungskoeffizienten her ist also zu erwarten, daß der Extrakt in den Formulierungen ebenfalls gut in das Stratum corneum penetriert.

Tabelle 4.8: Wiederfindungsraten für die Analytik der halbfesten Formulierungen mit CE-Methode 1. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung (n=2).

Lipophile Creme	99,50 \pm 1,41
Basiscreme	97,77 \pm 3,36

4.5.2 Stabilitätsuntersuchungen

4.5.2.1 Stabilität des Extraktes in Abhängigkeit von der relativen Feuchte

Da der Extrakt stark hygroskopisch ist, nimmt er unter entsprechenden Lagerungsbedingungen Wasser auf. Für wäßrige Lösungen von Quercetinglykosiden ist bekannt, daß ihre Haltbarkeit sehr eingeschränkt ist [16]. Es soll im folgenden untersucht werden, ob die Wasseraufnahme einen Einfluß auf die Stabilität der Inhaltsstoffe hat, da glykosidische Bindungen eine hydrolytische Empfindlichkeit aufweisen. Der Extrakt wird über einen Zeitraum von 26 Wochen bei 22 °C und relativen Luftfeuchten von 11 % bzw. 57 % aufbewahrt und in regelmäßigen Abständen mit Hilfe einer CE-Methode auf den Gehalt an Rutin und Chlorogensäure untersucht. Da die Untersuchungen an jeweils nur einer Probe vorgenommen wurden, lassen sich die Ergebnisse nicht statistisch auswerten.

Wie in Abbildung 4.28 dargestellt, liegen der Ausgangsgehalt des Extraktes bei 22,3 % Rutin und 4,5 % Chlorogensäure. Die Lagerung bei 11% r. F. führt beim Extraktes zu einem Feuchtegehalt von ca. 1,7 %, bei einer Umgebungsfeuchte von 57 % zu einem Feuchtegehalt von ca. 9,2 %. Über einen Zeitraum von 12 Wochen ist der Extrakt unter den untersuchten Bedingungen stabil. Für den 26-Wochen-Wert zeigt sich bei beiden Raumfeuchten ein Abbau der Inhaltsstoffe von ca. 10-15 %. Ähnliche Ergebnisse fanden auch GIOVANELLI et al., die die Stabilität von Inhaltsstoffen (u. a. Rutin) in getrockneten Tomaten bei unterschiedlichen Feuchtegehalten untersuchten. Dabei stellten sie fest, daß der Rutingehalt bei einem Feuchtigkeitsgehalt der Tomatenpulpe von 9 % bei 4 °C und 20 °C über einen Zeitraum von 3 Monaten um ca. 10 % abnahm, der Abbau bei höheren Temperaturen allerdings deutlich schneller verlief. Der Unterschied zwischen den unterschiedlichen Feuchtigkeitsgehalten war nur bei 37 °C deutlich ausgeprägt [59].

Die Lagerung des Extraktes sollte also bei möglichst niedrigen Temperaturen über maximal 3 Monate erfolgen. Um eine gute Verarbeitbarkeit zu gewährleisten, sollte auf eine niedrige Umgebungsluftfeuchte geachtet werden. Mit den vorgenommenen Untersuchungen konnte nicht festgestellt werden, ob der Feuchtegehalt tatsächlich einen Einfluß auf die Stabilität des Extraktes hat. Möglicherweise spielt der Einfluß von Luftsauerstoff auf die oxidative Zersetzung von Rutin auch eine große Rolle. Dies könnte durch Lagerung unter Luftausschluß untersucht werden.

4.5.2.2 Stabilität des Extraktes in Standardvehikeln

Damit der Extrakt topisch eingesetzt werden kann, muß er in einer topisch applizierbaren Formulierung vorliegen. Kosmetisch akzeptable Formulierungen enthalten häufig einen hohen Wasseranteil, was aber u. U. zu Stabilitätsproblemen bezüglich des Ex-

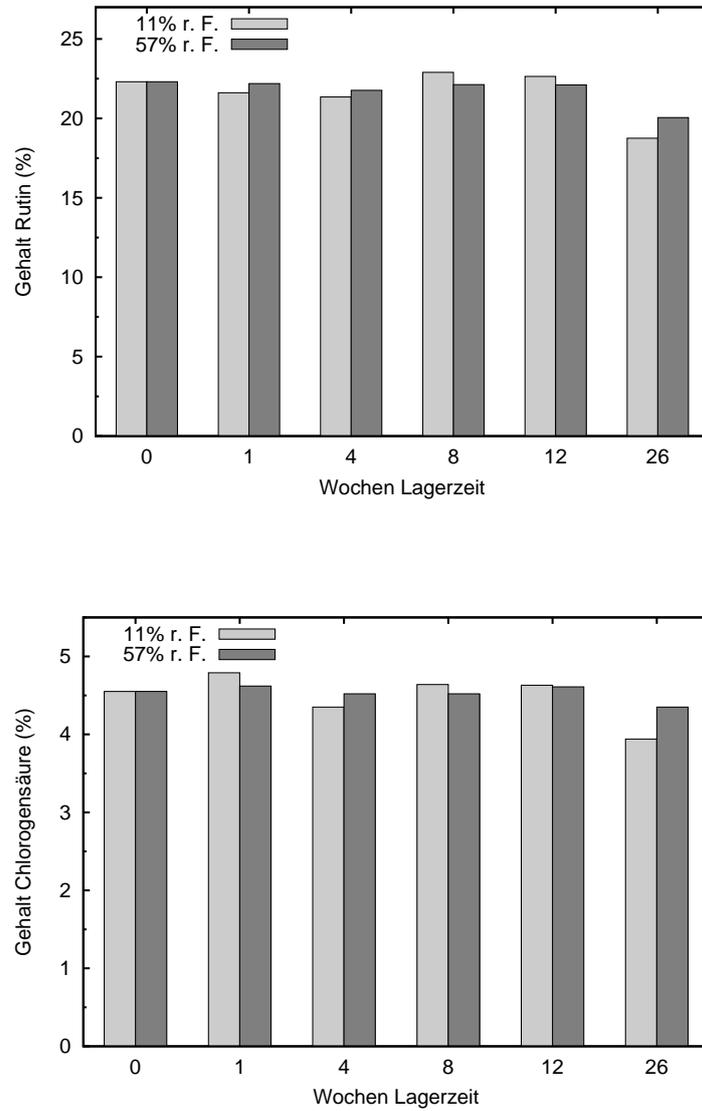


Abbildung 4.28: Stabilität des Extraktes in Abhängigkeit von verschiedenen Luftfeuchten. Der Gehalt an Rutin (oben) und Chlorogensäure (unten) wurde jeweils an einer Probe untersucht.

Tabelle 4.9: Rutingehalt des Extraktes in halbfesten Formulierungen unter verschiedenen Bedingungen (RT = Raumtemperatur, KT = Kühlschranktemperatur). Dargestellt ist jeweils der Rutingehalt in % der Ausgangskonzentration (Mittelwert \pm Standardabweichung, n=2).

Wochen	Basiscreme		Lipophile Creme	
	RT	KT	RT	KT
0	100,00 \pm 0,31	100,00 \pm 0,31	100,00 \pm 0,22	100,00 \pm 2,61
1	100,64 \pm 1,92	100,27 \pm 2,44	99,03 \pm 1,99	100,72 \pm 1,30
4	99,87 \pm 1,18	100,18 \pm 1,30	99,96 \pm 2,16	100,09 \pm 0,43
8	101,80 \pm 1,74	100,15 \pm 2,31	100,58 \pm 1,86	100,51 \pm 2,05
12	100,92 \pm 0,68	100,68 \pm 1,58	99,96 \pm 1,37	100,70 \pm 1,00
26	74,46 \pm 2,46	72,66 \pm 3,82	80,05 \pm 1,09	72,15 \pm 3,48

traks führen kann. Um diese Effekte zu untersuchen, wurde der Extrakt jeweils in einer Konzentration von 2 % in unterschiedliche halbfeste Formulierungen eingearbeitet.

Gewählt wurden zwei Standardvehikel des DAC bzw. NRF, die über gute kosmetische Eigenschaften verfügen. Die Lipophile Cremegrundlage (NRF 11.104) ist eine hydrophobe W/O-Creme mit einem hohen Wasseranteil (65 %). Sie verfügt über eine hohe chemische, physikalische und mikrobielle Stabilität (durch die Konservierung mit Kaliumsorbat und Citronensäure), ist wollwachsfrei und von weicher Konsistenz, wodurch sie leicht streichfähig ist. Die Basiscreme DAC ist eine amphiphile Creme, die sowohl O/W- als auch W/O-Emulgatoren enthält und sich dadurch für die Einarbeitung vieler Arzneistoffe eignet. Sie enthält einen Wasseranteil von 40 % und ist mit Propylenglykol konserviert, das gleichzeitig auch als Penetrationsenhancer dienen kann.

Die Proben wurden über einen Zeitraum von einem halben Jahr (Juli bis Januar) sowohl bei Raumtemperatur (RT) als auch bei Kühlschranktemperatur (KT) gelagert, und in regelmäßigen Abständen wurde der Rutingehalt mittels CE untersucht. Die Wiederfindungsraten für die Methode liegen jeweils bei nahezu 100 % (vgl. Tab. 4.8). Die Lagerung erfolgt als worst-case-Szenario bezüglich der oxidativen Bedingungen, d. h. in nur wenig gefüllten Behältnissen. Rutin dient als analytischer Marker für die Stabilität des Extraktes, da die anderen Polyphenole im Extrakt in einer zu niedrigen Konzentration vorliegen, um in den halbfesten Formulierungen noch mit ausreichender Genauigkeit bestimmbar zu sein.

Die Ergebnisse zeigen, daß der Extrakt in beiden halbfesten Formulierungen über einen Zeitraum von drei Monaten eine gute Stabilität aufweist. Der Rutingehalt unterscheidet sich nicht signifikant vom Ausgangswert. In den Meßwerten nach einem halben Jahr wird jedoch deutlich, daß es in beiden Formulierungen zu einem signifikanten Abbau des Rutins kommt ($p < 0,001$). Sowohl die Lagerungstemperatur als auch die Art der Formulierung haben dabei keinen Einfluß auf die Stabilität. Für die bei Raumtemperatur gelagerten Formulierungen zeigt sich im Laufe der Lagerungszeit außerdem eine deutliche Braunverfärbung. MAKRIŠ et al. führen diese Verfärbung auf oxidative Prozesse unter Beteiligung von Übergangsmetallionen zurück [105].

Tabelle 4.10: Einfluß von Ascorbinsäure auf den Rutingehalt (% des Ausgangswertes) von Extrakt in Phosphatpuffer pH 7,0 nach 24stündiger Lagerung bei 40 °C. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung (n=4). ***: signifikant verschieden von den Werten für den Extrakt ohne Ascorbinsäure ($p < 0,001$).

Extrakt	55,52 \pm 2,38
Extrakt + Ascorbinsäure	77,57 \pm 3,79 ***

Stabilitätsprobleme mit Flavonoidglykosiden in wäßrigen Lösungen bzw. in wasserhaltigen halbfesten Formen sind in der Literatur bekannt. In Untersuchungen von BILIA et al. zeigte sich für den Gehalt an Quercetinglykosiden in Tinkturen aus Calendula-Blüten ein mehr als 10%iger Abfall innerhalb von 4 Monaten (für Tinkturen mit 40 % Ethanol) bzw. 5 Monaten (für Tinkturen mit 60 % Ethanol) [16]. In Tinkturen aus Johanniskraut ergaben sich für Rutin t_{90} -Werte von 45 Tagen (für Tinkturen mit 40 % Ethanol) bzw. von 90 Tagen (mit Ethanol 60 %) [14]. MAKRIS et al. beschreiben für Rutin und Quercetin in Lösung einen großen Einfluß von Sauerstoff auf die Abbaurate [106]. RODE fand für in Emulsionen eingearbeitete Grüntee-Extrakte bei einer Lagerung bei 25 °C über einen Zeitraum von 6 Monaten einen deutlichen Abfall des Gehaltes an Catechin und Epicatechin. Dabei zeigte sich im Fall der W/O-Emulsion bereits nach 3 Monaten ein Abbau von nahezu 50 %, während die Stabilität der Wirkstoffe in der O/W-Emulsion etwas besser war. Eine Stabilisierung der Catechine ließ sich durch Zusatz von Ascorbinsäure als Antioxidans sowie EDTA als Chelatbildner erreichen. Durch Lagerung unter Luftausschluß erhöhte sich die Stabilität ebenfalls beträchtlich [146]. BORS et al. konnten ebenfalls für Quercetin und Rutin nachweisen, daß Ascorbinsäure das jeweilige Flavonoid aus dem mittels Pulselektrolyse erzeugten Aroxylradikal recyceln kann [21].

Um den Einfluß von Ascorbinsäure auf die Stabilität von Buchweizenextrakt abzuschätzen, wurde eine Lösung des Extraktes in Phosphatpuffer pH 7,0 mit und ohne Zusatz von Ascorbinsäure (im Verhältnis Extrakt:Ascorbinsäure = 1:2) bei 40 °C über 24 Stunden inkubiert und bezüglich des Rutingehaltes analysiert. Es zeigt sich (vgl. Tabelle 4.10), daß die Stabilität des Extraktes durch Ascorbinsäure signifikant positiv beeinflusst wird ($p < 0,001$). Die Flächen des Ascorbinsäure-Peaks verringern sich gleichzeitig auf $41,80 \pm 1,23$ % des Ausgangswertes.

Um eine höhere Stabilität des Extraktes in den Formulierungen zu erreichen, sollten die Effekte folgender Maßnahmen untersucht werden: Lagerung unter Luftausschluß bzw. in möglichst gefüllten Behältnissen sowie Zusatz von Ascorbinsäure als Antioxidans und/oder Zusatz eines Chelatbildners (z. B. EDTA oder Citronensäure) zur Verhinderung von durch Übergangsmetallionen katalysierten oxidativen Prozessen.

4.5.2.3 Stabilität des Extraktes in Mikroemulsionen

Da der Extrakt sich gut in die beiden beschriebenen Mikroemulsionen einarbeiten ließ, wurden ebenfalls Stabilitätsuntersuchungen mit diesen Formulierungen durchgeführt (vgl. Abb. 4.11). Es erfolgte allerdings im Gegensatz zu den halbfesten Formulierungen lediglich eine Lagerung bei Raumtemperatur, da es im Kühlschrank zum Erstarren der

Mikroemulsionen kam.

Für die IPP-Mikroemulsion zeigt sich bei einer Lagerung von bis zu 3 Monaten keine signifikante Gehaltsänderung. Der Wert für einen Lagerungszeitraum von 6 Monaten liegt dagegen signifikant unter dem Ausgangswert ($p < 0,001$). Im Vergleich zur Basiscreme und zur lipophilen Creme zeigt sich für die IPP-Mikroemulsion kein Unterschied bezüglich der Stabilität. Ebenso zeigte sich für die Planta-Mikroemulsion im untersuchten Zeitraum kein Unterschied zur IPP-Mikroemulsion.

Tabelle 4.11: Stabilitätsuntersuchungen des Extraktes in Mikroemulsionen bei Raumtemperatur. Dargestellt ist jeweils der Rutingehalt in % der Ausgangskonzentration (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=2$). n. b.: nicht bestimmt.

Wochen	IPP	Planta
0	100,00 \pm 2,55	100,00 \pm 5,47
1	101,46 \pm 1,09	100,10 \pm 4,97
4	95,77 \pm 2,76	100,73 \pm 0,69
8	100,62 \pm 2,77	99,93 \pm 2,82
12	101,43 \pm 2,40	n. b.
26	82,95 \pm 2,24	n. b.

4.5.3 Zusammenfassung: Galenischen Eigenschaften des Extraktes

Die Hygroskopizität des Extraktes erfordert eine Lagerung und Verarbeitung bei niedrigen Umgebungsluftfeuchten. Unter den untersuchten Bedingungen war die Stabilität des Extraktes auf 3 Monate beschränkt. In Untersuchungen zur Löslichkeit zeigte sich, daß der Extrakt besser in Wasser löslich ist als reines Rutin. Im Medium Dodecanol verhält es sich genau umgekehrt. Die Löslichkeit sowohl von Extrakt als auch von Rutin ist in Glycerol im Vergleich zu Wasser noch einmal erhöht. Glycerol bietet sich daher als Akzeptorphase in Freisetzungsuntersuchungen mit Hilfe des Mehrschichtmembranmodells an.

Der Extrakt läßt sich gut in Standardvehikel (untersucht wurden Basiscreme DAC und die Lipophile Cremegrundlage NRF) einarbeiten und zeigt darin über einen Zeitraum von drei Monaten ausreichende Stabilität. In ausgewählten Mikroemulsionen löst sich der Extrakt in einer Konzentration von $> 2\%$, und ist über 3 Monate ebenfalls stabil. Nach einem halben Jahr zeigen sich in allen untersuchten Vehikeln Abbauererscheinungen von Rutin. Erste Versuche mit wäßrigen Lösungen zeigen aber, daß eine Stabilisierung mit Ascorbinsäure erfolgsversprechend scheint.

In der Literatur finden sich keine Untersuchungen, in denen pflanzliche Extrakte in Mikroemulsionen eingearbeitet worden sind. Es wurde lediglich ein Beitrag veröffentlicht, in dem die isolierten Flavonoide Genistein, Fisetin und Luteolin in Mikroemulsionen zur ophthalmologischen Anwendung eingesetzt wurden [80]. Die vorliegenden Untersuchungen beschreiben also zum ersten Mal den Einsatz von Flavonoiden in Mikroemulsionen zur dermalen Anwendung.

4.6 Biopharmazeutische Untersuchungen

Den biopharmazeutischen Untersuchungen der entwickelten topischen Formulierungen auf der Basis des hergestellten Buchweizenextraktes kommen besondere Bedeutung zu. Untersuchungen zur biopharmazeutischen Charakterisierung von dermalen Darreichungsformen sind immer noch Gegenstand vieler Debatten, da zwar zahlreiche in-vitro-Modelle entwickelt wurden (eine Übersicht gibt NEUBERT in [120]), aber sich in den Arzneibüchern keine verbindliche Vorgabe dafür findet. Es existiert lediglich eine Guideline der FDA, in der für Freisetzungsuntersuchungen eine Franz-Zelle mit synthetischen porösen Membranen und einem flüssigen Akzeptor vorgeschlagen wird [47]. Schwierigkeiten bereitet diese Versuchsanordnung bezüglich der möglichen Diffusion von Akzeptormedium in das Vehikel. Das Mehrschichtmembranmodell (MSMM) nach FÜRST und NEUBERT umgeht diese Schwierigkeit durch Verwendung von Membranen, in denen der Akzeptor (Dodecanol bzw. Glycerol) in eine Matrix aus Collodium eingebettet ist [119]. Zur Charakterisierung der Penetration in die Haut hat sich die Verwendung der Franz-Zelle mit exzidiierter Humanhaut durchgesetzt [137]. Speziell die Frage nach der biopharmazeutischen Charakterisierung von Darreichungsformen mit pflanzlichen Extrakten wird aktuell diskutiert [50]. Für schnellfreisetzende feste Phytopharmaka veröffentlichte die HMPWP kürzlich Kriterien zur in-vitro-Freisetzung [74], für dermale Darreichungsformen stehen diese noch aus. Unbestritten ist jedoch, daß im Gegensatz zu synthetischen UV-Filtern, die möglichst nicht in tiefere Hautschichten penetrieren sollen [97], es für Radikalfänger wichtig ist, daß sie an den Ort gelangen, an dem besonders die UVA-Strahlung Schäden verursacht, nämlich in die lebenden Hautschichten von Epidermis und Dermis [52]. In den vorliegenden Untersuchungen wurde jeweils der Gehalt an Rutin bestimmt, da außer Rutin kein anderes Polyphenol in zur Quantifizierung ausreichenden Mengen in den topischen Formulierungen vorliegt. Für die biopharmazeutischen Untersuchungen wurden Formulierungen mit einem Extraktgehalt von 2 %, entsprechend 0,4 % Rutin, eingesetzt.

4.6.1 Untersuchungen zur Freisetzung aus topischen Formulierungen am Mehrschichtmembranmodell

Für die Freisetzungsuntersuchungen aus drei topischen Formulierungen wurde das Mehrschichtmembranmodell mit 2%igen Glycerol-Collodium-Membranen eingesetzt. Glycerol wurde verwendet, weil die Löslichkeit des Extraktes in diesem Medium deutlich höher liegt als in Dodecanol (vgl. Abschnitt 4.5.1.2). Damit die Löslichkeit im Akzeptor nicht die Freisetzung behindert, sollten möglichst sink-Bedingungen eingehalten, d. h. maximal 10 % der Akzeptorkapazität ausgenutzt werden. Bei einer Auftragemenge von 20 mg bedeutet dies bei einer Formulierung mit 2 % Extrakt, daß bei vollständiger Freisetzung 12 Membranen eingesetzt werden müßten. Das ist allerdings unpraktikabel. Aus diesem Grund wurden lediglich 3 Membranen verwendet. Als Formulierungen wurden die Planta-Mikroemulsion, die Basiscreme sowie die lipophile Creme verwendet und die Freisetzung nach 30 min und nach 300 min untersucht.

Es zeigt sich (s. Abb. 4.29), daß sich bei der Mikroemulsion mit zunehmender Zeit eine signifikante Steigerung der Freisetzung erreichen läßt ($p < 0,001$). Bei der Basis-

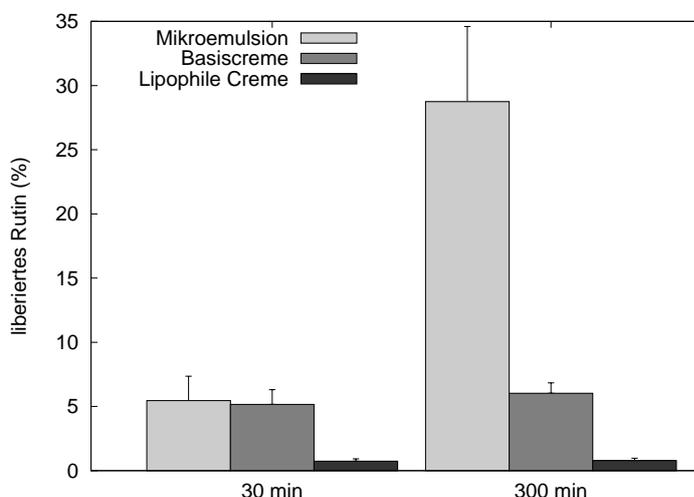


Abbildung 4.29: Freisetzung des Extraktes (bestimmt als Rutin) aus Mikroemulsion Planta, Basiscreme und Lipophiler Creme in Abhängigkeit von der Zeit. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=5$).

creme und der Lipophilen Creme läßt sich keine signifikante Zunahme in Abhängigkeit von der Zeit feststellen. Bei 30 min unterscheiden sich Mikroemulsion und Basiscreme nicht signifikant, allerdings ist die Freisetzung aus beiden Formulierungen signifikant höher als aus der lipophilen Creme ($p < 0,001$). Nach 300 min sind die Unterschiede zwischen allen Formulierungen signifikant ($p < 0,001$). Dabei setzt die Mikroemulsion besser frei als die Basiscreme und diese wiederum besser als die lipophile Creme. KREILGAARD erklärt die guten Liberationseigenschaften von Mikroemulsionen mit den hohen Diffusionskoeffizienten der eingearbeiteten Wirkstoffe [96]. Dabei spielt sicherlich auch die niedrigere Vehikelviskosität der Mikroemulsion im Vergleich zu den beiden halbfesten Formulierungen eine wichtige Rolle.

Für die Verteilung in den Membranen (vgl. Abb. 4.30) läßt sich feststellen, daß sich im Fall der lipophilen Creme die gesamte freigesetzte Menge in der ersten Membran befindet (Daten nicht gezeigt). Für die Mikroemulsion und die Basiscreme findet sich bei allen Zeiten der Extrakt in allen drei Membranen. Mit zunehmender Zeit nähert sich die Verteilung in den Membranen aneinander an. Dies läßt auf Diffusionsprozesse zwischen den Membranen schließen.

Insgesamt finden sich für alle drei Formulierungen in Anbetracht der langen Versuchszeit von 300 min relativ niedrige Freisetzungsraten. Dafür gibt es verschiedene Erklärungsansätze: Zum einen kann durch die nicht-sink-Bedingungen die Freisetzung aus den Formulierungen behindert sein. Dies trifft besonders auf die Mikroemulsion zu. Die Freisetzungsraten bei 300 min liegen mit rund 25 % um den Faktor niedriger, um den die Zahl der eingesetzten Membranen von der zur Erreichung der sink-Bedingungen nötigen abweicht (3 Membranen vs. 12 Membranen).

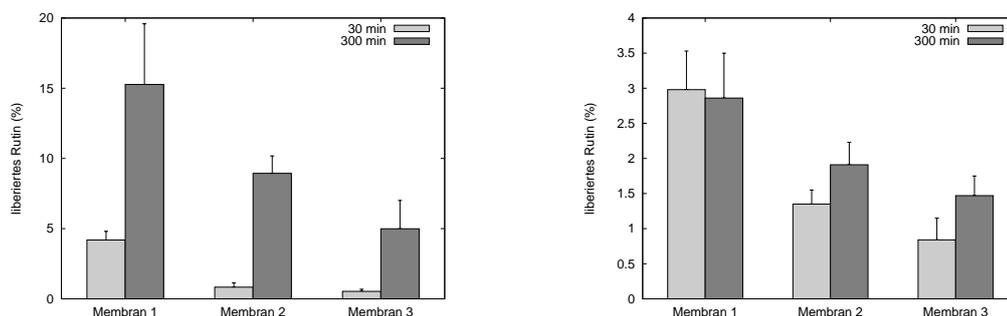


Abbildung 4.30: Verteilung des Extraktes (bestimmt als Rutin) in den Membranen bei Freisetzung im MSMM. Links: Mikroemulsion Planta, rechts: Basiscreme. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=5$).

Dies erklärt allerdings noch nicht die geringe Freisetzung aus den beiden halbfesten Formulierungen. In der Literatur finden sich Untersuchungen von ARCT et al., in denen der Einfluß von hydrophilen Hilfsstoffen auf die Permeationsrate von Flavonoiden durch eine Lipidmembran untersucht wurde. Dabei zeigte sich, daß die Hilfsstoffe wie Propylenglykol, Glycerol und verschiedene PEG-Arten die Löslichkeit von Rutin im Vehikel erhöhten und gleichzeitig die Permeationsrate senkten [5]. Ähnliche Phänomene können in den vorliegenden Untersuchungen dazu geführt haben, daß die Affinität des Extraktes zum Vehikel höher ist als zum Akzeptor. Wenn die Formulierungen eine gute Löslichkeit für den Extrakt zeigen, ist seine thermodynamische Aktivität und damit das Bestreben, die Formulierung zu verlassen, entsprechend gering.

Zur Freisetzung von Flavonoiden aus topischen Arzneiformen finden sich in der Literatur relativ wenige Untersuchungen. In Liberationsstudien von GETIE et al. am MSMM wurden Flavonoide in Extrakten aus *Dodonea viscosa* am besten aus Unguentum emulsificans freigesetzt (75 % der applizierten Dosis nach 180 min). Nur ca. ein Drittel dieser Menge wurde bei Verwendung von Basiscreme DAC gefunden, während aus Wollwachsalkoholsalbe praktisch keine Liberation stattfand. Allerdings wurden zur Analytik die Flavonoide hydrolysiert, so daß keine Unterscheidung zwischen den Glykosiden und den Aglyka möglich war [58]. VENNAT et al. konnten zeigen, daß die Freisetzung von Propolis-Flavonoiden (hauptsächlich Galangin) nach 8 Stunden aus isotropen kubisch-flüssigkristallinen Tensidgelen mit ca. 60 % der eingesetzten Dosis deutlich höher war als aus hydrophilen PEG-Salben (ca. 45 %) und aus lipophilen Salben (ca. 3 %) [170]. Die geringe Freisetzung aus lipophilen Salben stimmt mit den vorliegenden Untersuchungen überein. VALENTA et al. erhielten Freisetzungsraten für als Reinsubstanz eingesetztes Rutin, die nach 3 Stunden bei ca. 4 % für ein Gel aus Natriumdesoxycholat, bei ca. 2 % für ein Hydroxyethylcellulosegel und bei ca. 1 % der eingesetzten Dosis für ein Polyacrylatgel lagen [167]. Aus diesen Untersuchungen geht also hervor, daß das eingesetzte Vehikel einen großen Einfluß auf die Freisetzung hat. Die Ergebnisse von VENNAT und GETIE lassen sich nur schwierig mit den vorliegenden Untersuchungen vergleichen, da die eingesetzten Extraktmengen (bei nicht deklarier-

tem Flavonoidgehalt) wesentlich höher lagen (10 % bei GETIE, 5 % bei VENNAT) und eine höhere Konzentration die Freisetzung positiv beeinflusst [103]. Im Vergleich zu den Ergebnissen von VALENTA, bei denen Vehikel mit 0,2 % Rutin zum Einsatz kamen, scheint die Mikroemulsionsformulierung eine höhere Freisetzung zu gewährleisten.

4.6.2 Untersuchungen zur Penetration mit Hilfe der Franz-Zelle

Da die lipophile Creme in den Freisetzungsuntersuchungen nur eine sehr geringe Liberationsrate zeigte, wurden die Penetrationsuntersuchungen lediglich mit der Planta-Mikroemulsion und der Basiscreme durchgeführt. Aus organisatorischen Gründen stand pro Zeit und Formulierung lediglich ein Hautstück zur Verfügung, so daß auf eine statistische Auswertung verzichtet werden muß. Die Untersuchungen können also nur erste Anhaltspunkte liefern.

Es zeigt sich dennoch ein klarer Trend, daß die penetrierte Rutinmenge aus der Mikroemulsion mit der Zeit zunimmt (Abb. 4.31). Nach 30 Minuten findet sich mit 4 % der eingesetzten Dosis der größte Anteil des Rutins im Stratum corneum. Bei einer Verlängerung der Versuchszeit auf 300 Minuten läßt sich dieser Anteil auf 11 % steigern. Nahezu 70 % des Rutins befinden sich nach dieser Zeit im Akzeptor. Auch nach Applikation der Basiscreme findet sich der größte Teil des Rutins im Stratum corneum, allerdings ist kein Rutin im Akzeptor nachweisbar (Abb. 4.32). Nach 30 Minuten sind die Konzentrationen an Rutin in Epidermis und Dermis für beide Vehikel nahezu gleich niedrig (0,01-0,05 % der eingesetzten Dosis). Mit zunehmender Zeit scheint aus der Basiscreme nicht wesentlich mehr Rutin in die Haut penetriert zu sein. Diese Tendenz war bereits in den Liberationsuntersuchungen sichtbar. Insgesamt scheint die Mikroemulsion der Basiscreme als Vehikel für den Extrakt überlegen zu sein.

Zur Penetration von Flavonoiden und anderen phenolischen Verbindungen in Humanhaut gibt es nur wenige Untersuchungen in der Literatur. Die meisten Studien untersuchten isolierte Substanzen. So konnten SAIJA et al. sowohl für Ferulasäure als auch für Kaffeesäure zeigen, daß beide Substanzen aus gesättigten Pufferlösungen durch exzidierte Humanhaut permeieren. Aus Pufferlösungen pH 3 betrug der permeierte Anteil nach 24 Stunden für Ferulasäure ca. 20 %, für Kaffeesäure ca. 11 %. Aus Pufferlösungen pH 7,2 lag der permeierte Anteil deutlich niedriger (ca. 2 %) [149, 150]. BONINA et al. konnten für Hesperetin nach 24 Stunden höhere Permeationsraten (10 %) durch exzidierte Humanhaut nachweisen als für Naringenin (8 %) und Quercetin (1 %) [18]. Für Apigenin und Apigenin-7-O-glucosid in einer gesättigten wäßrig-alkoholischen Lösung zeigten MERFORT et al., daß die Flavonoide auch in tiefere Hautschichten penetrieren können. Der Flux war für das Glykosid dabei geringer als für das Aglykon [110]. Diese Befunde konnten von LI et al. an Mäusen bestätigt werden [100].

VALENTA et al. entwickelten Gelsysteme auf der Basis von Natriumdesoxycholat, mit denen die Permeation von Rutin durch exzidierte Rattenhaut auf das Doppelte gegenüber einer wäßrigen Lösung gesteigert werden konnte. Die absoluten Werte lagen dabei nach 6 Stunden bei 3 % der applizierten Dosis [167]. Für (-)-Epigallocatechingallat war die Hautpenetration aus hydrophiler Salbe USP nach 24 Stunden mit ca. 19 % der eingesetzten Dosis deutlich höher als aus einer Lösung in Aceton (5 %). Die permeierte Menge lag für beide Vehikel bei etwa 1 % [41]. Für das wasserlösliche Rutinderivat Tro-

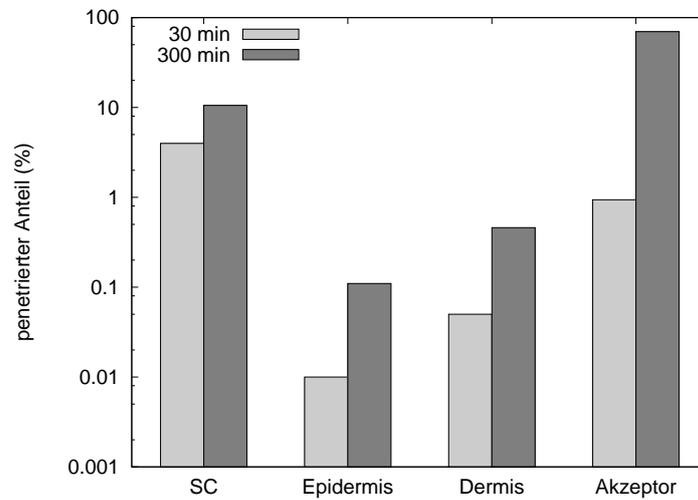


Abbildung 4.31: Penetration von Rutin im Extrakt aus der Planta-Mikroemulsion in exzidierte Humanhaut in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Die Versuche wurden jeweils an einem Hautstück durchgeführt. SC: Stratum corneum.

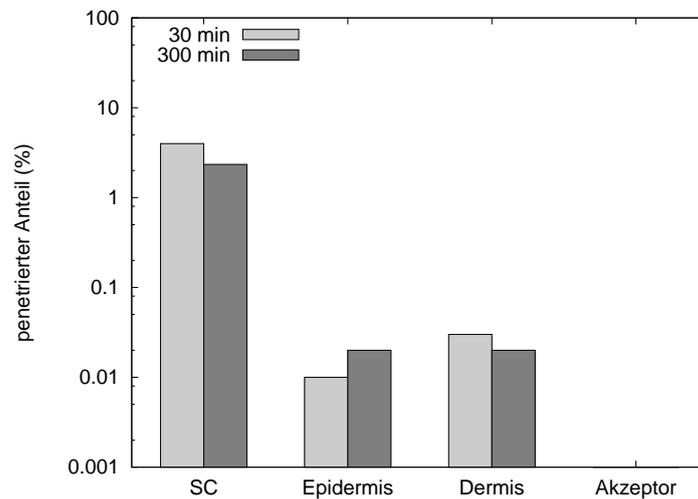


Abbildung 4.32: Penetration von Rutin im Extrakt aus der Basiscreme in exzidierte Humanhaut in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Die Versuche wurden jeweils an einem Hautstück durchgeführt. SC: Stratum corneum.

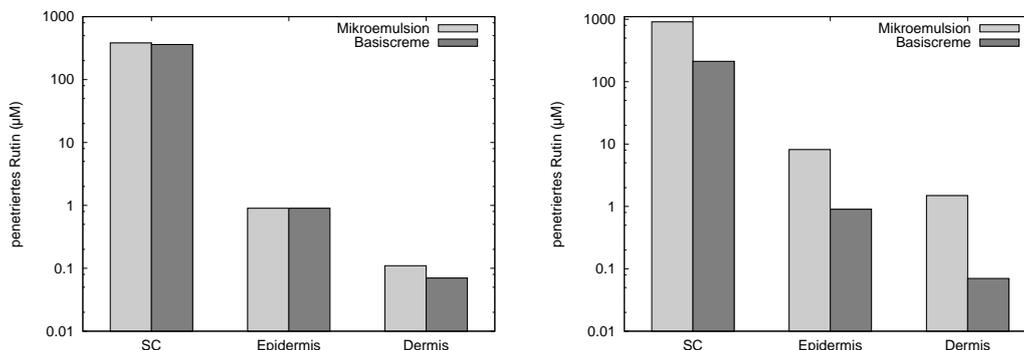


Abbildung 4.33: Gefundene Rutinmengen (μM) in den verschiedenen Hautschichten in Abhängigkeit vom eingesetzten Vehikel. Links: nach einer Versuchszeit von 30 min, rechts: nach einer Versuchszeit von 300 min. Die Versuche wurden jeweils an einem Hautstück durchgeführt. SC: Stratum corneum.

xerutin konnten KESSLER et al. bei Applikation in einem alkoholhaltigen Hydroxypropylcellulosegel nach 45 Minuten mit Hilfe der Tape-stripping-Methode Konzentrationen von 80 % der applizierten Dosis in den ersten drei Tesafilm-Abrissen des Stratum corneum finden [86]. NICKEL untersuchte die Penetration von Rutin als Reinsubstanz in exzidierte Humanhaut in Abhängigkeit vom verwendeten Vehikel. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen einer hydrophilen und einer lipophilen Formulierung [124]. In Untersuchungen von RODE zur Penetration von Grüntee-Extrakten aus einer O/W-Emulsion in exzidierte Schweinehaut fanden sich nach 20 Stunden im Stratum corneum ca. 20 % der eingesetzten Dosis an Catechin und in der Epidermis ca. 2 %. In tieferen Hautschichten sowie im Akzeptor war kein Catechin nachweisbar. Die Werte für die weiteren polyphenolischen Inhaltsstoffe lagen in der gleichen Größenordnung [146].

In Tab. 4.12 sind die in den vorliegenden Untersuchungen gefundenen Ergebnisse Literaturwerten gegenübergestellt. Es zeigt sich, daß sowohl das Vehikel als auch das verwendete Polyphenol einen Einfluß auf Penetrations- und Permeationsraten haben. Allerdings scheint die Lipophilie des betreffenden Polyphenols nicht allein ausschlaggebend für die Penetrationsfähigkeit in die Haut zu sein, da sich in Untersuchungen von BONINA et al. der $\log k'$ -Wert (ein chromatographisch ermittelter Verteilungskoeffizient) nicht mit der permeierten Menge korrelieren ließ [18]. Für die Mikroemulsion zeigt sich gegenüber den Literaturwerten eine deutliche Steigerung der Permeation, und auch in den relevanten Hautschichten finden sich beachtliche Mengen an Rutin.

In Abb. 4.33 sind die absoluten Mengen an Rutin in den einzelnen Hautschichten nach Applikation von Mikroemulsion und Basiscreme dargestellt. Für die Konzentrationsberechnungen wurde die Dicke des Stratum corneums mit $20 \mu\text{m}$ angenommen, die der Epidermis mit $160 \mu\text{m}$ sowie die der Dermis mit $4000 \mu\text{m}$ [179]. Nach 30 Minuten Versuchsdauer liegen die Werte sowohl für die Mikroemulsion als auch die Basiscreme bei ca. $400 \mu\text{M}$ im Stratum corneum, $1 \mu\text{M}$ in der Epidermis und $0,1 \mu\text{M}$ in der Dermis.

Tabelle 4.12: Penetrierte und permeierte Anteile von Rutin im Buchweizenextrakt (BWE) aus der Mikroemulsion in exzidierte Haut im Vergleich mit Literaturwerten. SC: Stratum corneum, EP: Epidermis, DE: Dermis, k. A.: keine Angabe.

Vehikel	Zeitraum	Polyphenol	permeierter Anteil	penetriertes Anteil	Referenz
Mikroemulsion	5 h	Rutin (BWE)	70 %	SC 11 %, EP 0,1 % DE 0,5 %	
Desoxycholol-Gel	6 h	Rutin	3 %	k. A.	VALENTA et al. [167]
Hydrophile Salbe USP	24 h	EGCG ^a	1 %	Gesamthaut 19 %	DVORAKOVA et al. [41]
Aceton	24 h	EGCG	1 %	Gesamthaut 5 %	DVORAKOVA et al. [41]
O/W-Emulsion	20 h	EGCG	–	SC 20 %, EP 2 %, DE –	RODE [146]
Aceton	24 h	Quercetin	1 %	k. A.	BONINA et al. [18]
Aceton	24 h	Hesperetin	10 %	k. A.	BONINA et al. [18]
Aceton	24 h	Naringenin	8 %	k. A.	BONINA et al. [18]

^aEpigallocatechingallat

Durch Verlängerung der Versuchszeit lassen sich bei Applikation der Mikroemulsion die Werte auf ca. 1000 μM im Stratum corneum, 10 μM in der Epidermis und 1,5 μM in der Dermis steigern. Die von NICKEL gefundenen penetrierten Rutinmengen aus Unguentum emulsificans aquosum liegen ungefähr um den Faktor 10 höher. Dies läßt sich auf zwei Faktoren zurückführen: zum einen war die eingesetzte Rutinmenge mit 1 % höher als in den vorliegenden Experimenten (0,4 %), zum anderen kann die höhere Lipophilie des reinen Rutins die Penetration gegenüber dem Extrakt erhöhen.

Zur benötigten Mindestkonzentration für ausreichende Photoprotektion gibt es in der Literatur keine in-vivo Untersuchungen. Die von NICKEL niedrigste eingesetzte Konzentration von 50 μM Rutin war im Keratinozyten-Modell ausreichend photoprotektiv gegen sowohl UVA- als auch UVB-Strahlung [124]. Da sich durch eine Steigerung der Konzentration keine Steigerung der protektiven Eigenschaften ergab, läßt sich spekulativ vermuten, daß eventuell bereits niedrigere Konzentrationen als 50 μM photoprotektiv wirksam sind. Für diese Annahme sprechen auch die in-vitro gefundenen IC_{50} -Werte für die Hemmung der Lipidperoxidation durch Rutin, die im Bereich von 10–20 μM liegen [69, 148, 169]. Es gibt allerdings auch Untersuchungen, die eine antioxidative Wirksamkeit von Rutin schon im Bereich von 0,1–1 μM nachweisen konnten [24, 98].

Außerdem ist ungeklärt, in welchem Ausmaß die weiteren antioxidativ wirksamen Begleitsubstanzen aus dem Buchweizenkraut in Humanhaut penetrieren. Zwischen der Franz-Zelle und Humanhaut in vivo gibt es noch einen interessanten Unterschied: An der Stelle des wäßrigen Akzeptors befindet sich bei Humanhaut in vivo die Subkutis, die hauptsächlich aus Fettgewebe besteht [179]. Da der Extrakt eine gute Wasserlöslichkeit, jedoch eine schlechte Lipidlöslichkeit besitzt, läßt sich spekulieren, daß in vivo die Penetration in die Subkutis geringer ausfällt als in der Franz-Zelle die Penetration in den wäßrigen Akzeptor, so daß es zu einer Aufkonzentration des Extraktes in der Epidermis und vor allem in der Dermis kommen könnte (ein Übergang in die dermalen Blutgefäße ist aufgrund der schlechten Lipidlöslichkeit des Extraktes unwahrscheinlich). Ob dieses Phänomen tatsächlich auftritt, läßt sich nur durch in-vivo-Untersuchungen abschließend beurteilen.

4.6.3 Zusammenfassung: Biopharmazeutische Charakterisierung von topischen Formulierungen des Extraktes

In den vorliegenden Untersuchungen wurde zum ersten Mal die Freisetzung und Penetration in exzidierte Humanhaut eines flavonoidreichen Extraktes aus einer Mikroemulsion im Vergleich zu herkömmlichen Vehikeln untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Liberation von Rutin im Extrakt aus der Mikroemulsion schneller erfolgte als aus der Basiscreme. Aus der lipophilen Creme ließ sich nahezu keine Freisetzung nachweisen. Aus diesem Grund wurden lediglich die Mikroemulsion und die Basiscreme für Penetrationsuntersuchungen an exzidierte Humanhaut (Franz-Zelle) verwendet. Dabei konnte die Aussage der Liberationsuntersuchungen bestätigt werden. Die Penetration von Rutin erfolgte aus der Mikroemulsion im Vergleich zur Basiscreme zu einem höheren Ausmaß in tiefere Hautschichten. Dabei fanden sich für die Mikroemulsion nach 300 Minuten beachtliche Mengen im Akzeptor. Eine Aussage über ausreichen-

de Wirkkonzentrationen in den lebenden Hautschichten kann aufgrund der schlechten Datenlage in der Literatur und fehlender in-vivo-Untersuchungen nicht getroffen werden. Um diese Frage abschließend klären zu können, sind Wirksamkeitsstudien in vivo nötig.

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung eines antioxidativ wirksamen Extraktes aus Buchweizenkraut für die dermale Anwendung. Nach einer Optimierung der Herstellungsparameter der Mazeration erfolgte die Prüfung des erhaltenen Extraktes auf Wirksamkeit und Unbedenklichkeit. Außerdem wurden erste galenische Untersuchungen mit topischen Formulierungen sowie deren biopharmazeutische Charakterisierung durchgeführt.

Die Herstellungsparameter Ethanol-Konzentration, Extraktionsdauer und Temperatur wurden bezüglich des Einflusses auf verschiedene Zielgrößen evaluiert. Dabei stellte sich heraus, daß bei einer Verwendung von Ethanol 30 % sich die unerwünschten Zielgrößen Fagopyringehalt und Grünfärbung minimieren lassen. Mit einer Erhöhung der Extraktionstemperatur auf 60 °C ließen sich hohe Ausbeuten an phenolischen Substanzen erzielen. Die Extraktionsdauer hatte in den meisten Fällen keinen signifikanten Einfluß. Bei einer Variation der Ausgangsdroge wurde mit der beschriebenen Extraktionsmethode ein Rutingehalt im Extrakt von ca. 20 % gefunden, der damit deutlich höher liegt als in kommerziell erhältlichen Extrakten aus Buchweizenkraut.

Im Keratinozyten- und HET-CAM-Modell zeigte der Extrakt eine gute Verträglichkeit. In alkalischer Lösung ließ sich bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht zwar die Entstehung von Wasserstoffperoxid und eine Verminderung des Rutingehaltes beobachten, aber bei physiologischen pH-Werten trat dieses Phänomen nicht auf. Unter UV-Bestrahlung ließ sich ebenfalls keine Veränderung feststellen. Für den Extrakt konnte also eine ausreichende Photostabilität nachgewiesen werden.

In den Untersuchungen zur Wirksamkeit als Antioxidans war der Extrakt in den *in-vitro*-Versuchen reinem Rutin überlegen. Im Keratinozyten-Modell war sowohl unter UVA- als auch unter UVB-Bestrahlung bei Inkubation der Zellen mit Extraktlösung eine höhere Lebendzellzahl zu finden als bei der bestrahlten Kontrolle. Im HET-CAM-Modell konnte die photoprotektive Wirkung des Extraktes nur bei UVB-Bestrahlung nachgewiesen werden, da die gewählte UVA-Dosis nicht zu einer Schädigung führte. Der Extrakt ist dennoch nicht zum alleinigen Einsatz in photoprotektiven Kosmetika geeignet, da die Eigenabsorption des Extraktes im UV-Bereich nicht ausreichend ist. Es sollte allerdings überprüft werden, ob der Extrakt in einer geeigneten Grundlage mehr bzw. ausreichend viel UV-Strahlung absorbiert. Auch eine Kombination mit Mikropigmenten wie Zinkoxid oder Titandioxid scheint vielversprechend.

Im Vergleich zu reinem Rutin hat der Extrakt eine bessere Wasserlöslichkeit. Ebenfalls zeigt er in zwei untersuchten Mikroemulsionen eine höhere Löslichkeit. Die vorliegenden Untersuchungen stellen die erste Veröffentlichung über die Entwicklung von flavonoidhaltigen Mikroemulsionen zur dermalen Anwendung dar. In Standardvehikel läßt sich der Extrakt ebenfalls gut einarbeiten und ist, wie auch in den Mikroemulsionen, über einen Zeitraum von drei Monaten stabil. Bei längeren Zeiträumen zeigt sich

in allen Vehikeln ein Abbau von Rutin. Erste Versuche in einer Modellösung zeigen aber, daß sich mit einem Zusatz von Ascorbinsäure die Stabilität des Extraktes erhöhen läßt. In weiteren Untersuchungen sollte also der Einfluß von Ascorbinsäure auf die Stabilität des Extraktes in den topischen Formulierungen untersucht werden. Es scheint auch interessant, den Einfluß eines Chelatbildners mit Übergangsmetallionen, wie z. B. EDTA, zu überprüfen.

In Freisetzungsuntersuchungen am Mehrschichtmembranmodell zeigte sich die beste Freisetzung von den untersuchten Vehikeln aus der Mikroemulsion. Die lipophile Creme setzte Rutin deutlich schlechter frei als die Basiscreme. Mit der Mikroemulsion und der Basiscreme wurde ein Pilotversuch zur Penetration in exzidierte Humanhaut vorgenommen. Dort zeigte sich, daß aus der Mikroemulsion tendenziell mehr Extrakt in tiefere Hautschichten penetriert als aus der Basiscreme. Durch Verwendung der Mikroemulsion ließ sich der Anteil an penetrierten und permeiertem Rutin im Vergleich zu Werten aus der Literatur deutlich steigern. In weiterführenden Untersuchungen muß in-vivo geprüft werden, ob die penetrierten Mengen an Extrakt ausreichend sind, um eine antioxidative Wirkung in den lebenden Hautschichten zu entfalten. Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß der hergestellte Extrakt aus Buchweizenkraut ein vielversprechender Kandidat für die Entwicklung eines photoprotektiven Kosmetikums ist.

Literaturverzeichnis

- [1] I. Afanas'ev, A. Dorozhko, A. Brodskii, V. Kostyuk und A. Potapovitch. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 38: 1763–1769, 1989
- [2] F. Afaq und H. Mukhtar. Photochemoprevention by botanical antioxidants. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 15: 297–306, 2002
- [3] T. Agner und J. Serup. Skin reactions to irritants assessed by non-invasive bioengineering methods. *Contact Dermatitis* 20: 352–359, 1989
- [4] J. Alonso-Lebrero, C. Domínguez-Jiménez, R. Tejedor, A. Brieva und J. Pivel. Photoprotective properties of a hydrophilic extract of the fern *Polypodium leucotomos* on human skin cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 70: 31–37, 2003
- [5] J. Arct, A. Oborska, M. Mojski, A. Binkowska und B. Swidzikowska. Common cosmetic hydrophilic ingredients as penetration modifiers of flavonoids. *Int. J. Cosmetic Sci.* 24: 357–366, 2002
- [6] B. Armstrong und A. Krickler. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 63: 8–18, 2001
- [7] A. Arnous, D. Makris und P. Kefalas. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wine. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5736–5742, 2001
- [8] A. Arora, T. Byrem, M. Nair und G. Strasburg. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 373: 102–109, 2000
- [9] A. Arora, M. Nair und G. Strasburg. Structure-activity relationship for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Rad. Biol. Med.* 24: 1355–1363, 1998
- [10] K. Azuma, M. Nakayama, M. Koshioka, K. Ipposushi, Y. Yamaguchi, K. Kohata, Y. Yamauchi, H. Ito und H. Higashio. Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus Olitorius L.* *J. Agric. Food Chem.* 47: 3963–3966, 1999
- [11] K. Bauer, K. Frömming und C. Führer. *Kapitel 18: Pflanzliche Arzneizubereitungen.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1997

- [12] A. Baumgertel, R. Grimm, W. Eisenbeiß und W. Kreis. Purification and characterization of a flavonol-3- α - β -heterodisaccharidase from the dried herb of *Fagopyrum esculentum* Moench. *Phytochemistry* 64: 411–418, 2003
- [13] G. Berset, H. Gonzenbach, R. Christ, R. Martin, A. Deflandre, R. Mascotto, J. Jolley, W. Lowell, R. Pelzer und T. Stiehm. Proposed protocol for determination of photostability part I: Cosmetic UV filters. *Int. J. Cosmet. Sci.* 18: 167–177, 1996
- [14] A. Bilia, M. Bergonzi, G. Mazzi und F. Vincieri. Analysis and stability of the constituents of artichoke and St. John's wort tinctures by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Drug Devel. Ind. Pharm.* 28: 609–619, 2002
- [15] A. Bilia, M. Bergonzi, F. Morgenni, G. Mazzi und F. Vincieri. Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. *Int. J. Pharm.* 213: 199–208, 2001
- [16] A. R. Bilia, M. Bergonzi, S. Gallori, G. Mazzi und F. Vincieri. Stability of the constituents of calendula, milk-thistle and passionflower tinctures by LC-DAD and LC-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30: 613–624, 2002
- [17] M. Blois. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199–1200, 1958
- [18] F. Bonina, M. Lanza, L. Montenegro, C. Puglisi, A. Tomaino, D. Trombetta, F. Castelli und A. Saija. Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. *Int. J. Pharm.* 145: 87–94, 1996
- [19] F. Bonina, C. Puglia, A. Tomaino, A. Saija, N. Mulinacci, A. Romani und F. Vincieri. In-vitro antioxidant and in-vivo photoprotective effect of three lyophilized extracts of *Sedum Telephium* L. leaves. *J. Pharm. Pharmacol.* 52: 1279–1285, 2000
- [20] M. Bors, W. Heller, C. Michel und M. Saran. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. In L. Packer, Hg., *Methods Enzymol., Oxygen radicals in biological systems B*, Bd. 186, S. 343–355. Academic Press, New York, 1990
- [21] W. Bors, C. Michel und S. Schikora. Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: A pulse radiolysis study. *Free Rad. Biol. Med.* 19: 45–52, 1995
- [22] O. Brenna und E. Pagliarini. Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. *J. Agr. Food Chem.* 49: 4841–4844, 2001
- [23] H. Brockmann, E. Weber und G. Pampus. Protofagopyrin und Fagopyrin, die photodynamisch wirksamen Farbstoffe des Buchweizens (*Fagopyrum esculentum*). *Liebigs Ann. Chem.* 575: 53–83, 1952

- [24] J. Brown, H. Khodr, R. Hider und C. Rice-Evans. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: Implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.* 330: 1173–1178, 1998
- [25] J. Callahan, G. Cleary, M. Elefant, G. Kaplan, T. Kensler und R. Nash. Equilibrium moisture content of pharmaceutical excipients. *Drug Devel. Ind. Pharm.* 8: 355–369, 1982
- [26] A. Canada, E. Giannella, T. Nguyen und R. Mason. The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. *Free Radical Biol. Med.* 9: 441–449, 1990
- [27] G. Cao, E. Sofic und R. Prior. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Rad. Biol. Med.* 22: 749–760, 1997
- [28] T. Chan, G. Galati und P. O'Brian. Oxygen activation during peroxidase catalysed metabolism of flavones or flavanones. *Chem. Biol. Interactions* 122: 15–25, 1999
- [29] H. Chick und P. Ellinger. The photo-sensitizing action of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *J. Physiol.* 100: 212–230, 1941
- [30] K. Chu und A. Chow. Impact of carbohydrate constituents on moisture sorption of herbal extracts. *Pharm. Res.* 17: 1133–1137, 2000
- [31] M. Dalle Carbonare und M. Pathak. Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 14: 105–124, 1992
- [32] O. Dangles, G. Fargeix und C. Dufour. One-electron oxidation of quercetin and quercetin derivatives in protic and non protic media. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* S. 1387–1395, 1999
- [33] L. Dao und M. Friedman. Chlorophyll, chlorogenic acid, glycoalkaloid, and protease inhibitor content of fresh and green potatoes. *J. Agric. Food Chem.* 42: 633–639, 1994
- [34] A. Dattner. From medical herbalism to phytotherapy in dermatology: back to the future. *Dermatologic Therapy* 16: 106–113, 2003
- [35] F. De Gruijl. Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB. *Method. Enzymol.* 319: 359–366, 2000
- [36] E. Dechene. The relative stability of rutin and quercetin in alkaline solution. *J. Americ. Pharm. Assoc.* 40: 495–497, 1951
- [37] E. Dičkancaitė, A. Nemeikaitė, A. Kalvelytė und N. Čėnas. Prooxidant character of flavonoid cytotoxicity: Structure-activity relationships. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 45: 923–930, 1998

- [38] B. Diffey. A method for broad spectrum classification of sunscreens. *Int. J. Cosmet. Sci.* 16: 47–52, 1994
- [39] B. Diffey, R. Stokes, S. Forestier, C. Mazilier und A. Rougier. Suncare product photostability: a key parameter for a more realistic in vitro efficacy evaluation. *Eur. J. Dermatol.* 7: 226–228, 1997
- [40] B. Diffey, P. Tanner, P. Matts und J. Nash. In vitro assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. *J. Am. Acad. Dermatol.* 43: 1024–1035, 2000
- [41] K. Dvorakova, R. Dorr, S. Valcic, B. Timmermann und D. Alberts. Pharmacokinetics of the green tea derivative, EGCG, by the topical route of administration in mouse and human skin. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 43: 331–335, 1999
- [42] R. Ebermann, G. Alth, M. Kreitner und A. Kubin. Natural products derived from plants as potential drugs for photodynamic destruction of tumor cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 36: 95–97, 1996
- [43] M. Edelenbos, L. Christensen und K. Grevsen. HPLC determination of chlorophyll and carotenoid pigments in processed green pea cultivars (*Pisum sativum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 49: 4768–4774, 2001
- [44] M. Eder und W. Mehnert. Bedeutung pflanzlicher Begleitstoffe in Extrakten. *Pharmazie* 5: 285–293, 1998
- [45] E. Elsner. *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin*. BI-Wiss.-Verl., Mannheim, 1990
- [46] C. Enk, M. Hochberg, A. Torres, O. Lev, I. Dor, M. Srebnik und V. Dembitsky. Photoprotection by *Cichorium endivia* extracts: Prevention of UVB-induced erythema, pyrimidine dimer formation and IL-6 expression. *Skin Pharmacol. Physiol.* 17: 42–48, 2004
- [47] FDA guidance for industry: SUPAC-SS nonsterile semisolid dosage forms. Scale-up and postapproval changes: Chemistry, manufacturing, and controls; in vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation, 1997
- [48] S. F'guyer, F. Afaq und H. Mukhtar. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 19: 56–72, 2003
- [49] H. Fiedler. *Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete*. Editio Cantor Verlag, Aulendorf, 1996
- [50] FIP. Biopharmaceutical characterisation of herbal medicinal products. *Pharm. Ind.* 63: 1005–1010, 2001
- [51] D. Flick und G. Gifford. Comparison of in vitro cell cytotoxicity assays for tumor necrosis factor. *J. Immunol. Methods* 68: 167–175, 1984

- [52] J. Fuchs. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR- α -tocopherol, L-ascorbic acid and β -carotene in cutaneous photoprotection. *Free Radical Biol. Med.* 25: 848–873, 1998
- [53] J. Fuchs und L. Packer. Photooxidative stress in the skin. In H. Sies, Hg., *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*, S. 559–583. Academic Press, New York, 1991
- [54] L. Fukumoto und G. Mazza. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3597–3604, 2000
- [55] F. Gaedcke und B. Steinhoff. *Herbal medicinal products. Scientific and regulatory basis for development, quality assurance and marketing authorization*. medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 2003
- [56] G. Galati, O. Sabzevari, J. Wilson und P. O'Brian. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 177: 91–104, 2002
- [57] H. Gens-Barlag, E. Klette, C. Springob, P. Finkel, T. Rudolph, H. Gonzenbach, P. Schneider, D. Kockott, U. Heinrich, H. Tronnier, R. Bernklau, W. Johncock, R. Langner, H. Driller und H. Westenfelder. In vitro testing to assess the UVA protection performance of sun care products. *Int. J. Cosmet. Sci.* 23: 3–14, 2001
- [58] M. Getie, T. Gebre-Mariam, R. Rietz und R. Neubert. Evaluation of the release profiles of flavonoids from topical formulations of the crude extract of the leaves of *Dodonea viscosa* (Sapindaceae). *Pharmazie* 57: 320–322, 2002
- [59] G. Giovanelli und A. Paradiso. Stability of dried and intermediate moisture tomato pulp during storage. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7277–7281, 2002
- [60] T. Gogoleva, J. Ademola, R. Wester, P. Magee und H. Maibach. Relative contributions of human skin layers to partitioning of chemicals with varying lipophilicity. In R. Bronaugh und H. Maibach, Hg., *Percutaneous absorption. Drugs – Cosmetics – Mechanisms – Methodology*, S. 451–461. Marcel Dekker, New York, Basel, 1999
- [61] E. Gonzalez und S. Gonzalez. Drug photosensitivity, idiopathic photodermatoses, and sunscreens. *J. Am. Acad. Dermatol.* 35: 871–885, 1996
- [62] B. Habermann. Protofagopyrin or fagopyrin, what is genuine? *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 333, Suppl. 2: 13, 2000
- [63] I. Hadshiew, F. Stäb, S. Untiedt, K. Bohnsack, F. Rippke und E. Hölzle. Effects of topically applied antioxidants in experimentally provoked polymorphous light eruption. *Dermatology* 195: 362–368, 1997
- [64] H. Hagels. *Analytische, pharmazeutische, phytochemische sowie inter- und intraindividuelle Untersuchungen zu Fagopyrum-Arten*. Dissertation, Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin, 1996

- [65] H. Hagels, C. Lapke, H. Schilcher und E. Riedel. Comparison of the distribution of free amino acids and phenolic compounds in *Fagopyrum esculentum* Moench. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 8: 181–183, 1998
- [66] Monographie Fagopyrum und Fagopyrum-esculentum-Kraut, 1990
- [67] A. Hagerman und L. Butler. Assay of condensed tannins or flavonoid oligomers and related flavonoids in plants. In L. Packer, Hg., *Methods Enzymol., Oxygen radicals in biological systems, part D*, Bd. 234, S. 429–437. Academic Press, New York, 1994
- [68] J. Harborne und C. Williams. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481–504, 2000
- [69] C. Heijnen, G. Haenen, R. Oostveen, E. Stalpers und A. Bast. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: The structure activity relationship revisited. *Free Rad. Res.* 36: 575–581, 2002
- [70] Herbal Medicinal Products Working Party. Points to consider on good agricultural and collection practice for starting materials of herbal origin, 2001
- [71] B. Herzog, S. Mongiat, C. Deshayes, M. Neuhaus, K. Sommer und A. Mantler. In vivo and in vitro assessment of UVA protection by sunscreen formulations containing either butyl methoxy dibenzoyl methane, methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol, or microfine ZnO. *Int. J. Cosmet. Sci.* 24: 170–185, 2002
- [72] S. Heuschkel. Dissertation, FB Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, in Vorbereitung
- [73] J. Hild. Zur Analytik von Ultraviolett-Filtern für kosmetische Mittel. *Dt. Lebensmittel Rundschau* 89: 7–10, 1993
- [74] HMPWP. Points to consider on the biopharmaceutical characterisation of herbal medicinal products, 2003
- [75] W. Hodnick, B. Kalyanaraman, C. Pritsos und R. Pardini. The production of hydroxyl and semiquinone free radicals during the autoxidation of redox active flavonoids. *Basic Life Sci.* 49: 149–152, 1988
- [76] ICH Topic Q2B. Note for guidance on validation of analytical procedures: methodology (CPMP/ICH/281/95), 1997
- [77] ICH Topic Q3C. Note for guidance on impurities: Residual solvents (CPMP/ICH/283/95), 1998
- [78] N. Ihme, H. Kiesewetter, F. Jung, K. Hoffmann, A. Birk, A. Müller und K. Grütznert. Leg oedema protection from a buckwheat herb tea in patients with chronic venous insufficiency: A single-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 50: 443–447, 1996

- [79] K. Jahn. *Moderne galenische Zubereitungen zur dermalen Anwendung von Ciclosporin A und Mycophenolatmofetil*. Dissertation, Fachbereich Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2002
- [80] A. Joussen, K. Rohrschneider, J. Reichling, B. Kirchhof und F. Kruse. Treatment of corneal neovascularization with dietary isoflavonoids and flavonoids. *Exp. Eye Res.* 71: 483–487, 2000
- [81] S. Katiyar, F. Afaq, A. Perez und H. Mukhtar. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Carcinogenesis* 22: 287–297, 2001
- [82] S. Katiyar, N. Ahmad und H. Mukhtar. Green tea and skin. *Arch. Dermatol.* 136: 989–994, 2000
- [83] S. Katiyar und N. Korman. Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. *J. Nat. Canc. Inst.* 89: 556–566, 1997
- [84] S. Kempe. Diplomarbeit, Fachbereich Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, in Vorbereitung
- [85] M. Kessler, G. Ubeaud und L. Jung. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.* 55: 131–142, 2003
- [86] M. Kessler, G. Ubeaud, T. Walter, F. Sturm und L. Jung. Free radical scavenging and skin penetration of troxerutin and vitamin derivatives. *J. Dermatol. Treatment* 13: 133–141, 2002
- [87] S. Kim, M. Lim, I. Chun und Y. Won. Effects of flavonoids of *Ginkgo biloba* on proliferation of human skin fibroblasts. *Skin Pharmacol.* 10: 200–205, 1997
- [88] G. Kindl. *Licht und Haut: Bräunung, Lichtschutz, Pflege. Ein Leitfaden für die Beratung in der Praxis*. Govi, Eschborn, 1998
- [89] U. Kindl. Vitamin E, Wirkstoff oder Placebo? *Pharm. Ztg., Suppl. Dermopharmazie* 141 (03/97): 4–7, 1997
- [90] W. Kleppmann. *Taschenbuch Versuchsplanung. Produkte und Prozesse optimieren*. Hanser, München, 1998
- [91] U. Koetter und C. Theurer. Occurrence of fagopyrin, a naphthodianthrone from fagopyrum species, in the dried leaves of buckwheat and its transition into different preparations. *Phytomedicine Suppl.* 1: 225, 1996
- [92] I. Koleva, T. van Beek, J. Linssen, A. de Groot und L. Evstatieva. Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal.* 13: 8–17, 2002
- [93] A. Kootstra. Protection from UV-B-induced DNA-damage by flavonoids. *Plant Mol. Biol.* 26: 771–774, 1994

- [94] V. Kostyuk, A. Potapovich, E. Vladykovskaya, L. Korkina und I. Afanas'ev. Influence of metal ions on flavonoid protection against asbestos-induced cell injury. *Arch. Biochem. Biophys.* 385: 129–137, 2001
- [95] D. Köszegi, B. Nothhelfer und R. Leimbeck. Der HET-CAM-Test (Hühner-Ei-Test-Chorioallantoismembran). *Euro Cosmetics* 6: 29–33, 1999
- [96] M. Kreilgaard. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv. Drug Delivery Reviews* 54 Suppl. 1: S77–S98, 2002
- [97] E. Kurul und S. Hekimoglu. Skin permeation of two different benzophenone derivatives from various vehicles. *Int. J. Cosmet. Sci.* 23: 211–218, 2001
- [98] J. Labuda, M. Bučová, L. Heilerová, S. Šilhár und I. Štěpánek. Evaluation of the redox properties and anti/pro-oxidant effects of selected flavonoids by means of a DNA-based electrochemical biosensor. *Anal. Bioanal. Chem.* 376: 168–173, 2003
- [99] D. Laval-Martin. Spectrophotometric method of controlled pheophytinization for the determination of both chlorophylls and pheophytins in plant extracts. *Anal. Biochem.* 149: 121–129, 1985
- [100] B. Li und D. Birt. In vivo and in vitro percutaneous absorption of cancer preventive flavonoid apigenin in different vehicles in mouse skin. *Pharmaceut. Res.* 13: 1710–1715, 1996
- [101] H. Lim und J. Epstein. Photosensitivity diseases. *J. Am. Acad. Dermatol.* 36: 84–90, 1997
- [102] J. Lin, M. Selim, C. Shea, J. Grichnik, M. Omar, N. Monteiro-Riviere und S. Pinnell. UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E. *J. Am. Acad. Dermatol.* 48: 866–874, 2003
- [103] B. Lippold. *Biopharmazie. Eine Einführung zu den wichtigsten Arzneiformen.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1984
- [104] H. Maier, G. Schauburger, K. Brunnhofer und H. Hönigsmann. Change of ultraviolet absorbance of sunscreens by exposure to solar-simulated radiation. *J. Invest. Dermatol.* 117: 256–262, 2001
- [105] D. Makris und J. Rossiter. Heat-induced, metal-catalyzed oxidative degradation of quercetin and rutin (quercetin-3-O-rhamnosylglucoside) in aqueous model systems. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3830–3838, 2000
- [106] D. Makris und J. Rossiter. Quercetin and rutin (quercetin-3-o-rhamnoglucoside) thermal degradation in aqueous media under alkaline conditions. In J. Buttriss und M. Saltmarsh, Hg., *Functional foods 99 – Claims and evidence*, S. 216–238. Royal Society of Chemistry Press, London, 2000

- [107] D. Malenčić, O. Gašić, M. Popović und P. Boža. Screening for antioxidant properties of *salvia reflexa* hornem. *Phytother. Res.* 14: 546–548, 2000
- [108] Christian Mendl. *Untersuchungen zur Lichtschutzwirkung von pflanzlichen Polyphenolextrakten*. Diplomarbeit, TU Dresden, Institut für Lebensmittelchemie, 1999
- [109] L. Mensor, F. Menezes, G. Leitao, A. Reis, T. Dos Santos, C. Coube und S. Leitao. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.* 15: 127–130, 2001
- [110] I. Merfort, J. Heilmann, U. Hagedorn-Leweke und B. Lippold. In vivo skin penetration studies of camomile flavones. *Pharmazie* 49: 509–511, 1994
- [111] A. Mirossay, H. Onderkova, L. Mirossay, M. Sarissky und J. Mojzis. The effect of quercetin on light-induced cytotoxicity of hypericin. *Physiol. Res.* 50: 635–637, 2001
- [112] Y. Miura, I. Tomita, T. Watanabe, T. Hirayama und S. Fukui. Active oxygen generation by flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.* 21: 93–96, 1998
- [113] M. Monici, N. Mulinacci, P. Baglioni und F. Vincieri. Flavone photoreactivity: UV-induced reactions in organic solvents and micellar systems. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 20: 167–172, 1993
- [114] I. Morel, G. Lescoat, P. Cogrel, O. Sergent, N. Padeloup, P. Brissot, P. Cillard und J. Cillard. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.* 45: 13–19, 1993
- [115] A. Müller und G. Schiebel-Schlosser, Hg. *Buchweizen. Botanik-Inhaltsstoff-Analytik-Pharmakologie, Toxikologie, Klinik*. Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 1998
- [116] O. Müller, S. Gruner, T. Grune und W. Siems. Bildung des zytotoxischen Lipidperoxidationsproduktes 4-Hydroxynonenal durch UV-B-Bestrahlung im Zellmodell. *Z. Dermatol.* 182: 176–178, 1996
- [117] G. Murphy. Diseases associated with photosensitivity. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 64: 93–98, 2001
- [118] G. Murphy. An update on photoprotection. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 18: 1–4, 2002
- [119] R. Neubert, C. Bendas, W. Wohlrab, B. Gienau und W. Fürst. A multilayer membrane system for modelling drug penetration into skin. *Int. J. Pharm.* 75: 89–94, 1991
- [120] R. Neubert und W. Wohlrab. In vitro methods for the biopharmaceutical evaluation of topical formulations. *Acta Pharm. Technol.* 36: 197–206, 1990

- [121] N. Neumann, E. Hölzle, P. Lehmann, M. Rosenbruch, A. Klaućic und G. Plewig. Photo hen's egg test: a model for phototoxicity. *Br. J. Dermatol.* 136: 326–330, 1997
- [122] N. Neumann, E. Hölzle, M. Wallerand, S. Vierbaum, T. Ruzicka und P. Lehmann. The photoprotective effect of ascorbic acid, acetylsalicylic acid, and indomethacin evaluated by the photo hen's egg test. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 15: 166–170, 1999
- [123] Q. Nguyen, M. Metche und E. Urion. Les produits intermédiaires dans l'autoxydation de la quercétine. *C. R. Acad. Sc. Hebd. Seances Acad. Sci. D* 260: 7047–7049, 1965
- [124] A. Nickel. *Untersuchungen zum zytotoxischen und zytoprotektiven Potential ausgewählter Radikalfänger an humanen Keratinozyten*. Dissertation, Fachbereich Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2001
- [125] S. Niesel. *Untersuchungen zum Freisetzungsverhalten und zur Stabilität ausgewählter wertbestimmender Pflanzeninhaltsstoffe unter besonderer Berücksichtigung moderner phytochemischer Analysenverfahren*. Dissertation, Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin, 1992
- [126] L. Norlén, I. Nicander, B. Rozell, S. Ollmar und B. Forslind. Inter- and intra-individual differences in human stratum corneum lipid content related to physical parameters of skin barrier function in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 112: 72–77, 1999
- [127] H. Öhman und A. Vahlquist. In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. *Acta Derm. Venereol.* 74: 375–379, 1994
- [128] M. Ohnishi, H. Morishita, H. Iwahashi, S. Toda, Y. Shirataki, M. Kimura und R. Kido. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. *Phytochemistry* 36: 579–583, 1994
- [129] M. Ozkur, M. Bozkurt, B. Balabanli, A. Aricioglu, N. Ilter, M. Gürer und H. Inalöz. The effects of EGb 761 on lipid peroxide levels and superoxide dismutase activity in sunburn. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 18: 117–120, 2002
- [130] Produktinformation Pelemol BIP. Firmenbroschüre Phoenix Chemical Inc.
- [131] E. Pelle, N. Muizzuddin, T. Mammone, K. Marenus und D. Maes. Protection against endogenous and UVB-induced oxidative damage in stratum corneum lipids by an antioxidant-containing cosmetic formulation. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 15: 115–119, 1999
- [132] A. Petersen, R. Gniadecki, J. Vicanova, T. Thorn und H. Wulf. Hydrogen peroxide is responsible for UVA-induced DNA damage measured by alkaline comet assay in HaCaT keratinocytes. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 59: 123–131, 2000

- [133] Monographieentwurf Buckwheat herb. *Pharmeuropa* 15: 686–688, 2003
- [134] P. Pietta. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63: 1035–1042, 2000
- [135] S. Pinnell. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J. Am. Acad. Dermatol.* 48: 1–19, 2003
- [136] Produktinformation Plantacare 2000 UP. Firmenbroschüre Cognis
- [137] H. Podhaisky, C. Huschka und W. Wohlrab. In vitro models for optimizing topical therapy. *Pharmazie* 54: 871–874, 1999
- [138] H. Podhaisky, S. Riemschneider und W. Wohlrab. UV light and oxidative damage of the skin. *Pharmazie* 57: 30–33, 2002
- [139] M. Price und L. Butler. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *J. Agr. Food Chem.* 25: 1268–1273, 1977
- [140] P. Pugliese. The skin's antioxidant systems. *Dermatol. Nurs.* 10: 401–416, 1998
- [141] A. Radschuweit, H.-H. Rüttinger und P. Nuhn. Capillary zone electrophoresis with electrochemical detection – a simple and effective method to analyze oxygen-consuming and peroxide-forming processes. *J. Chromatogr. A* 937: 127–134, 2001
- [142] A. Radschuweit, H.-H. Rüttinger, P. Nuhn, W. Wohlrab und C. Huschka. UV-induced formation of hydrogen peroxide based on the photochemistry of ketoprofen. *Photochem. Photobiol.* 73: 119–127, 2001
- [143] G. Rhie, M. Shin, J. Seo, W. Choi, K. Cho, K. Kim, K. Park, H. Eun und J. Chung. Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 117: 1212–1217, 2001
- [144] C. Rice-Evans und N. Miller. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem. Soc. T.* 24: 790–795, 1996
- [145] C. Rice-Evans, N. Miller und G. Paganga. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 20: 933–956, 1996
- [146] T. Rode. *Stabilität und Penetrationsfähigkeit von pflanzlichen Stoffen in topischen Formulierungen*. Dissertation, Pharmazeutisches Institut, Universität Kiel, 2001
- [147] G. Rücker, M. Neugebauer und G. Willems. *Instrumentelle pharmazeutische Analytik: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen und elektrochemischen Analysemethoden*. Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 1988

- [148] A. Saija, M. Scalese, M. Lanza, D. Marzullo, F. Bonina und F. Castelli. Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. *Free Rad. Biol. Med.* 19: 481–486, 1995
- [149] A. Saija, A. Tomaino, R. Lo Cascio, D. Trombetta, A. Proteggente, A. De Pasquale, N. Uccella und F. Bonina. Ferulic acid and caffeic acid as potential protective agents against photooxidative skin damage. *J. Sci. Food. Agr.* 79: 476–480, 1999
- [150] A. Saija, A. Tomaino, D. Trombetta, A. De Pasquale, N. Uccella, T. Barbuzzi, D. Paolino und F. Bonina. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *Int. J. Pharm.* 199: 39–47, 2000
- [151] D. Samel, A. Donella-Deana und P. de Witte. The effect of purified extract of *Fagopyrum esculentum* (buckwheat) on protein kinases involved in signal transduction pathways. *Planta Med.* 62: 106–110, 1996
- [152] K. Scharffetter, P. Brenneisen, J. Wenk, G. Herrmann, W. Ma, L. Kuhr, M. Meeuwes und M. Wlaschek. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp. Gerontol.* 35: 307–316, 2000
- [153] C. Schempp, E. Schöpf und J. Simon. Durch Pflanzen ausgelöste toxische und allergische Dermatitis (Phyto dermatitis). *Hautarzt* 53: 93–97, 2002
- [154] W. Schwack und T. Rudolph. Photochemistry of dibenzoyl methane UVA filters. Part 1. *J. Photochem. Photobiol. B: Photobiol.* 28: 229–234, 1995
- [155] F. Silva, F. Borges, C. Guimarães, J. Lima, C. Matos und S. Reis. Phenolic acids and derivatives: Studies on the relationship among structure, radical scavenging activity and physicochemical parameters. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2122–2126, 2000
- [156] V. Singleton, R. Orthofer und R. Lamuela-Raventós. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In L. Packer, Hg., *Methods Enzymol., Oxidants and Antioxidants, Part A*, Bd. 299, S. 152–178. Academic Press, New York, 1999
- [157] C. Soler-Rivas, J. Espin und H. Wichers. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuff. *Phytochem. Anal.* 11: 330–338, 2000
- [158] H. Spielmann, M. Liebsch, S. Kalweit, F. Moldenhauer, T. Wirnsberger, H. Holzhütter, B. Schneider, S. Glaser, I. Gerner, W. Pape, R. Kreiling, K. Krauser, H. Miltenburger, W. Steiling, N. Luepke, N. Müller, H. Kreuzer, P. Mürmann, J. Spengler, E. Bertram-Neis, B. Siegemund und F. Wiebel. Results of a validation study in germany on two in vitro alternatives to the draize eye irritation test, the HET-CAM test and the 3T3 NRU cytotoxicity test. *ATLA* 24: 741–858, 1996

- [159] E. Straface, P. Giacomoni und W. Malorni. Cultured cells as a model system for the study of UV-induced cytotoxicity. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 63: 52–60, 2001
- [160] Y. Surh, H. Na, J. Lee und Y. Keum. Molecular mechanisms underlying anti-tumor promoting activities of heat-processed *Panax ginseng* C. A. Meyer. *J. Korean Med. Sci.* 16 (Suppl.): S38–41, 2001
- [161] U. Takahama. O_2^- -dependent and -independent photooxidation of quercetin in the presence and absence of riboflavin and effects of ascorbate on the photooxidation. *Photochem. Photobiol.* 42: 89–91, 1985
- [162] C. Theurer, K. Gruetzner, S. Freeman und U. Koetter. In vitro phototoxicity of hypericin, fagopyrin rich, and fagopyrin free buckwheat herb extracts. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 7: 113–115, 1997
- [163] C. Thomas, R. MacGill, G. Miller und R. Pardini. Photoactivation of hypericin generates singlet oxygen in mitochondria and inhibits succinoxidase. *Photochem. Photobiol.* 55: 47–53, 1992
- [164] C. Tournaire, S. Croux und M. Maurette. Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen quenching. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 19: 205–215, 1993
- [165] F. Trautinger. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clin. Dermatol.* 26: 573–577, 2001
- [166] Uvinul grades and z-COTE. Technische Information, BASF AG, Ludwigshafen, 2002
- [167] C. Valenta, E. Nowack und A. Bernkop-Schnürch. Deoxycholate-hydrogels: Novel drug carrier systems for topical use. *Int. J. Pharm.* 185: 103–111, 1999
- [168] S. van Acker, G. Plemper van Balen, D. van Den Berg, A. Bast und W. van der Vijgh. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* 56: 935–943, 1998
- [169] S. van Acker, D. van Den Berg, M. Tromp, D. Griffioen, W. van Bennekom, W. van der Vijgh und A. Bast. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* 20: 331–342, 1996
- [170] B. Vennat, A. Arvouet-Grand und A. Pourrat. Skin healing preparations: Compared in vitro diffusion of the active ingredients. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 24: 253–260, 1998
- [171] D. Vessey. The cutaneous antioxidant system. In J. Fuchs und L. Packer, Hg., *Oxidative Stress in Dermatology*, S. 81–103. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong, 1993

- [172] A. von Gadow, E. Joubert und C. Hansmann. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), alpha-tocopherol, BHT and BHA. *J. Agric. Food Chem.* 45: 632–638, 1997
- [173] K. Wilhelm, S. Biel und C. Siegers. Role of flavonoids in controlling the phototoxicity of hypericum perforatum extracts. *Phytomedicine* 8: 306–309, 2001
- [174] K Wilhelm, B. Bottjer und C Siegers. Quantitative assessment of primary skin irritants in vitro in a cytotoxicity model: comparison with in vivo human irritation tests. *Br. J. Dermatol.* 145: 709–715, 2001
- [175] M. Wlaschek, I. Tantcheva-Poor, L. Naderi, W. Ma, L. Schneider, Z. Razi-Wolf, J. Schüller und K. Scharffetter-Kochanek. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 63: 41–51, 2001
- [176] J. Wohrab. *Der Einfluß von L-Arginin auf die Regulation der epidermalen Arginase*. Shaker Verlag, Aachen, 2001. Habilitationsschrift, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät
- [177] J. Wojcicki, B. Barcew-Wiszniewska, L. Samochowiec und L. Rozewicka. Extractum fagopyri reduces atherosclerosis in high-fat diet fed rabbits. *Pharmazie* 50: 560–562, 1995
- [178] J. Wojcicki, B. Samochowiec, B. Gonet, S. Juzwiak, E. Dabrowska-Zamojcin, M. Katdonska und S. Tustanowski. Effect of buckwheat extract on free radical generation in rabbits administered high-fat diet. *Phytother. Res.* 9: 323–326, 1995
- [179] H. Wokalek. Die Haut. In R. Niedner und J. Ziegenmeyer, Hg., *Dermatika. Therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie*, Kap. 1, S. 1–28. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1992
- [180] T. Yamaguchi, H. Takamura, T. Matoba und J. Terao. HPLC-method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 1201–1204, 1998
- [181] Y. Yamamoto. Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. *J. Dermatol. Sci.* 27 Suppl. 1: S1–S4, 2001

A Anhang

Tabelle A.1: Signifikanzbeurteilung der Effekte der Faktoren und der Wechselwirkungen. Angegeben ist jeweils der p-Wert.

	Konz.	Dauer	Temp.	KxD ^a	DxT ^b	KxT ^c	3FWW ^d
Trockenrückstand	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,01	< 0,001	> 0,05	< 0,05
Phenole	< 0,01	> 0,05	< 0,001	> 0,05	< 0,01	< 0,01	> 0,05
Grünfärbung	< 0,001	> 0,05	< 0,001	> 0,05	< 0,01	< 0,01	< 0,001
Antioxidative Aktivität	< 0,001	> 0,05	< 0,001	< 0,01	< 0,05	< 0,001	< 0,01
Fagopyrin	< 0,001	> 0,05	< 0,001	> 0,05	> 0,05	< 0,001	> 0,05
Rutin	< 0,001	> 0,05	< 0,001	< 0,05	> 0,05	< 0,001	> 0,05
Chlorogensäure	< 0,01	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Hyperosid	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Quercitrin	< 0,001	< 0,05	< 0,001	< 0,01	> 0,05	< 0,001	< 0,01

^aWechselwirkung von Konzentration und Dauer

^bWechselwirkung von Dauer und Temperatur

^cWechselwirkung von Konzentration und Temperatur

^d3fach-Wechselwirkung

Tabelle A.2: Güte der Korrelation zwischen den einzelnen Extraktionszielgrößen

	Phenole	Chlorophyll	Antioxidative Aktivität	Fagopyrin	Rutin	Chlorogen- säure	Hyperosid	Quercitrin
Trocken- rückstand	0,7578	0,6034	0,5109	0,5027	0,7154	0,5516	0,6643	0,6236
Phenole		0,4719	0,6065	0,2752	0,7579	0,2665	0,8470	0,7911
Grünfärbung			0,3275	0,9192	0,3205	0,8486	0,3767	0,4466
Antioxidative Aktivität				0,1670	0,8682	0,1522	0,4926	0,9532
Fagopyrin					0,1630	0,8694	0,1917	0,2405
Rutin						0,2245	0,7587	0,9113
Chlorogen- säure							0,3090	0,2382
Hyperosid								0,6838

Publikationsliste

- I. Hinneburg, Y. Mrestani, R. H. H. Neubert
Development and application of a CE method for quantification of phenolic compounds in extracts from buckwheat herb and in semi-solid formulations containing the extracts
Chromatographia 59, 2004, 591-594
- I. Hinneburg, R. H. H. Neubert
Influence of extraction parameters on the phytochemical characteristics of extracts from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) herb
Journal of Agricultural and Food Chemistry (eingereicht)
- I. Hinneburg, S. Heuschkel, R. H. H. Neubert
Studies on preformulation, stability and biopharmaceutical characteristics of buckwheat extract and its topical formulations
Manuskript in Vorbereitung
- I. Hinneburg, H.-H. Rüttinger, S. Kempe, R. H. H. Neubert
In-vitro evaluation of the photoprotective properties of an extract from buckwheat herb
Manuskript in Vorbereitung

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt haben. Prof. Dr. R. Neubert danke ich für die interessante Aufgabenstellung im Rahmen des Rephyna-Projektes „Entwicklung von Cosmeceuticals sowie Phytopharmaka mit radikalprotektiver Wirkung auf der Basis ausgewählter einheimischer Pflanzen“ sowie die gewährte Unterstützung und Freiheit bei der Bearbeitung des Themas. Dr. Roland Rietz schulde ich Dank für die ausgezeichnete, wenn auch im letzten Teil externe Betreuung sowie für zahlreiche Diskussionen und die Korrektur des Manuskriptes. Ich danke ebenfalls Frau. Prof. Dr. Dräger für die kritischen und hilfreichen Kommentare.

Ohne Herrn Dr. Rüttinger wären große Teile der Ergebnisse nicht zustande gekommen – ihm danke ich für die Möglichkeit, in seinem Labor zu arbeiten und die zahlreichen Diskussionen und Anregungen. Mein Dank gilt auch Sabine Kempe, die in vielen Versuchsreihen den Extrakt hat mitlaufen lassen. Es war eine große Freude, mit Frau Peters zusammenzuarbeiten, die die Versuche sorgfältig vorbereitet und durchgeführt hat und für gute Laune sorgte.

In der Hautklinik hat Dr. Wohlrab mir ermöglicht, die HET-CAM-Versuche durchzuführen. Andre Weinandy hat mir dankenswerterweise bei der widerlichen Arbeit der Eierpräparation zur Seite gestanden. Frau Hölsken danke ich für die Durchführung der Penetrationsversuche, deren Analytik in der Pharmazie ohne den Einsatz von Frau Woigk nicht möglich gewesen wäre. Ute Kürschner vom Institut für Pharmazeutische Chemie war so liebenswürdig, die Untersuchungen an der HaCaT-Zelllinie durchzuführen.

Aus der Arbeitsgruppe Biopharmazie möchte ich weiterhin besonders Dr. Yahya Mrestani für die Unterstützung bei den CE-Versuchen und Sandra Heuschkel für die vielen anregenden Diskussionen zu Mikroemulsionen und dem MSMM danken. Mit Heidi Pöttsch durfte ich das Labor teilen, und sie unterstützte mich in vielen kleinen und großen praktischen Dingen. Danke dafür! Frau Todte war eine große Hilfe bei den HPLC-Messungen, und Frau Rudolf hatte häufig Ideen, wo man bestimmte Dinge herbekommen könnte. Andrea Kühn und Johanna Müller waren immer bereit, sich bei einem Glas Wein die neuesten Probleme anzuhören, aber auch alle anderen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe inkl. Herr Reese und seine Mitarbeiter haben mit ihrer Hilfsbereitschaft für eine gute Arbeitsatmosphäre gesorgt.

Vor allem danke ich meinem Mann und meinen Hausgenossen für ihre Anteilnahme und Unterstützung.

Lebenslauf

Name	Iris Hinneburg
Geburtsdatum	27.05.1975
Geburtsort	Limburg (Lahn)
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1981-1985	Grundschule Elz-Süd
1985-1994	Fürst-Johann-Ludwig-Schule Hadamar
06/1994	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Berufsausbildung

10/1994-10/1998	Pharmaziestudium an der Philipps-Universität Marburg
09/1996	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
10/1998	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
11/1998-04/1999	Pharmaziepraktikum in der Linden-Apotheke, Hadamar
05/1999-11/1999	Pharmaziepraktikum bei der Mundipharma GmbH, Limburg
11/1999	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
	Approbation als Apothekerin
01-09/2000	Diplomarbeit am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
09/2000-03/2004	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
November 2003	Fachapothekerin für Pharmazeutische Technologie

Halle (Saale), den

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Universität zur Begutachtung vorgelegt. Desweiteren erkläre ich, daß ich mich nicht früher um den Doktorgrad beworben habe.

Halle (Saale), den