Herstellung und Bewertung kosmetischer Emulsionen mit pflanzlichen Polyphenolen. Studien zur Freisetzung, Stabilität und Wirksamkeit

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Chemie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Olesya Zillich

Hamburg, 2015

Tag der Disputation: 24.07.2015

Folgende Gutachter empfehlen die Annahme der Dissertation:

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Martina Kerscher
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Horst-Christian Langowski

Die praktischen Arbeiten zu dieser Dissertation wurden am Fraunhofer-Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung (IVV) in Freising, Abteilung Verfahrensentwicklung Pflanzliche Rohstoffe/ Verfahrensentwicklung Lebensmittel (VP/VL) in dem Zeitraum vom Juni 2009 bis August 2013 durchgeführt.

Liste der eigenen Publikationen

Zillich, O. V., U. Schweiggert-Weisz, P. Eisner and M. Kerscher (2015). "Polyphenols as active ingredients for cosmetic products." *International Journal of Cosmetic Science*, published online, doi: 10.1111/ics.12218.

Zillich, O. V., U. Schweiggert-Weisz, K. Hasenkopf, P. Eisner and M. Kerscher (2013). "Antioxidant activity, lipophilicity and extractability of polyphenols from pig skin – development of analytical methods for skin permeation studies." *Biomedical Chromatography* **27**(11): 1444-1451.

Zillich, O. V., U. Schweiggert-Weisz, K. Hasenkopf, P. Eisner and M. Kerscher (2013). "Release and *in vitro* skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsions." *International Journal of Cosmetic Science* **35**: 491-501.

Zardin, E., O. Zillich and A. Buettner (2013). "Monitoring volatile organic compounds at the epidermal surface: a fast, in-vivo & non-invasive tool for physiology and cosmetics testing". *42. Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Braunschweig.

Zillich, O. V., U. Schweiggert, K. Hasenkopf, P. Eisner and M. Kerscher (2011). "Development of a method for the analysis of polyphenols in pig skin using organic solvent extraction and HPLC." *Skin Forum 2011*, Frankfurt am Main.

Inhaltsverzeichnis

Abkür	Abkürzungsverzeichnis		
Zusam	nmenf	assung	4
Summ	nary		7
1.	Einleit	ung	10
2.	Aktue	ller Kenntnisstand	13
2.1.	. н	aut und Hautalterung	13
2	.1.1.	Aufbau der Haut	13
2	.1.2.	Hautalterung: Faktoren und klinisches Bild	14
2	.1.3.	Oxidativer Stress	16
2	.1.4.	Topische Prävention der Hautalterung	17
2.2.	. KI	linische Methoden in der Evaluierung der Hautalterung	19
2	.2.1.	Hauttopographie	19
2	.2.2.	Rauheitsparameter	22
2	.2.3.	Mechanische Eigenschaften der Haut	24
2	2.4.	Elastizitätsparameter	25
2	.2.5.	Feuchtigkeit und Barriereeigenschaften der Haut	28
2.3.	. Po	olyphenole als aktive Inhaltsstoffe für kosmetische Produkte	30
2	.3.1.	Chemische Zusammensetzung wichtiger Polyphenolklassen	30
2	.3.2.	Quellen und Funktion der Polyphenole	32
2	.3.3.	Bioaktive Eigenschaften von Polyphenolen	34
2.4.	. Ko	osmetische Emulsionen	
2	.4.1.	Emulsionstypen	36

	2.4.2.	Emulsionsinhaltsstoffe	37
	2.4.3.	Stabilität von Emulsionen	
	2.4.4.	Rheologie von Emulsionen	40
	2.4.5.	Sensorische Eigenschaften	41
	2.5. W	/irkstofffreisetzung und dermale Permeation	42
	2.5.1.	In-vitro Testsysteme	42
	2.5.2.	Rezeptorflüssigkeit	43
	2.5.3.	Hautmembranen	44
	2.5.4.	Analyse von Freisetzungs- und Permeationskinetiken	45
3.	Aufga	benstellung der Arbeit und Vorgehensweise	48
4.	Chara	kterisierung der Polyphenole	50
	4.1. H	PLC-Analyse	50
	4.2. A	ntioxidative Eigenschaften der Polyphenole	53
	4.3. O	ktanol-Wasser Verteilung	55
5.	Perme	eation und Freisetzung	57
	5.1. V	orbereitung der in-vitro Untersuchungen	57
	5.1.1.	Auswahl der Rezeptorflüssigkeit	57
	5.1.2.	Extraktion von Polyphenolen aus der Schweinehaut	59
	5.2. W	/irkstofffreisetzung	63
	5.3. H	autpermeation von Polyphenolen	71
	5.3.1.	In-vitro Hautpermeation	71
	5.3.2.	<i>In vivo</i> – Hautpenetration	75
	5.4. D	iskussion	76
	5.4.1.	Extraktion der Polyphenole aus der Schweinehaut	76

5.4.2. Freisetzung polyphenolischer Verbindungen aus Emulsionen
5.4.3. Hautpermeation81
6. Auswirkung von Emulsionskomponenten auf die Emulsionseigenschaften und
Wirkstofffreisetzung85
6.1. Freisetzung von Polyphenolen aus den Emulsionen mit unterschiedlichem
Ölgehalt und Emulgator86
6.2. Physikalische Eigenschaften der Emulsionen88
6.3. Lagerstabilität von Polyphenolen in Emulsionen95
6.4. Diskussion97
7. Humanuntersuchung zur Evaluierung der Wirksamkeit einer Polyphenol-haltigen
Formulierung105
7.1. Durchführung der Untersuchung105
7.1.1. Design105
7.1.2. Probanden
7.1.3. Testemulsionen108
7.2. Sensorische Bewertung109
7.3. Auswirkung der Testformulierungen auf die biophysikalischen
Hauteigenschaften110
7.3.1. Hauttopographie110
7.3.2. Mechanische Hauteigenschaften112
7.3.3. Hautfeuchtigkeit und transepidermaler Wasserverlust118
7.4. Diskussion119
8. Experimenteller Teil124
8.1. Charakterisierung der Wirkstoffe124
8.1.1. HPLC-Analyse124

	8.1.2.	ABTS Assay	124
	8.1.3.	Rancimat-Test	125
	8.1.4.	Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizient	126
	8.1.5.	Löslichkeit	127
8.	.2. H	erstellung und Charakterisierung der Emulsionen	127
	8.2.1.	Herstellung der Emulsionen	127
	8.2.2.	Polyphenolanalyse in Emulsionen	128
	8.2.3.	Partikelgrößenverteilung	128
	8.2.4.	Rheologische Messungen	129
	8.2.5.	Zentrifugenstabilität	129
	8.2.6.	Lagerversuche	129
8.	.3. In	n-vitro Permeation und Wirkstofffreisetzung	129
	8.3.1.	Membranen, Präparation der Schweinehaut	130
	8.3.2.	Durchführung der Permeations- und Freisetzungsuntersuchung	130
	8.3.3.	Extraktion der Polyphenole aus der Schweinehaut	131
	8.3.4.	Auswertung	131
8.	.4. In	n-vivo Wirksamkeitsnachweis	132
	8.4.1.	Hautelastizität	132
	8.4.2.	Hauttopographie	132
	8.4.3.	Hautfeuchtigkeit und Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)	133
	8.4.4.	Statistische Auswertung	133
9.	Verwe	endete Chemikalien und Rohstoffe (H-und P-Sätze)	135
10.	Literat	turverzeichnis	137
Anh	ang		148

A1.	Korrelationen bei den rheologischen Messungen	148
A2.	Lagerstabilität von Polyphenolen	149
A3.	Muster Einverständniserklärung für Humanuntersuchung	152
A4.	Beiblatt "Probandeninformation"	153
A5.	Verlauf der Rauheitsparameters im Laufe der Studie	154
Danksagung		
Eidesstattliche Versicherung		

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AI	antioxidativer Index
ANOVA	Varianzanalyse, Analysis of variance
AP-1	Aktivatorprotein 1
BMI	Body-Mass-Index
<i>C</i> ₀	Ausgangskonzentration des Wirkstoffes in der Vehikel
C_D und C_R	die Wirkstoffkonzentrationen in der Donor- und Rezeptorkammern, μ g/ml
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
Ds	Diffusionskoeffizienten innerhalb der Haut, cm ² /h
D_{v}	Diffusionskoeffizient innerhalb der Vehikel, cm ² /h
δ	Phasenwinkelverschiebung
E ₀	Extintkion der Blindprobe
E _m	Extinkton der Messlösung
ECG	Epicatechingallat
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechingallat
FRP	Flächenrauheitsparameter
Gʻ	Speichermodul, Pa
G"	Verlustmodul, Pa
GAE	Gallussäure-Äquivalente (gallic acid equivalent)
h	Dicke der Haut, cm
HLB	hydrophilic-lipophilic balance
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
<i>IC</i> ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration, mM
IL	Interleukin
J _{ss}	steady-state Flux, μg·cm ⁻² ·h ⁻¹
<i>К</i> _н ,	Higuchi's Koeffizient
К _к ,	Korsmeyer Koeffizient
K _P	Permeabilitätskoeffizient, cm/h
K _r	Freisetzungskoeffizient, cm/h

LOD	Nachweisgrenze
LOQ	Bestimmungsgrenze
LRP	Linienrauheitsparameter
LVE	linearer viskos-elastischer Bereich
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MW	Molekulargewicht (Molarmasse), g/mol
MWCO	molecular weight cut-off
n	Exponent in der Korsmeyer-Gleichung
η	dynamische Viskosität, Pa·s
NF	Nuklearfaktor
PBS	phosphate buffered saline
PIT	Phaseninversionstemperatur
P _{S/V}	Haut/Vehikel Verteilungskoeffizient
Ra	Arithmetischer Mittenrauwert
RF	Relative Feuchte
RI	Inhibition der Radikalkonzentration, %
Rmax	maximale Rauhtiefe
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Rp, Rv	die Höhe der größten Spitze und die Tiefe des größten Tals
rpm	Umdrehungen pro Minute
Rpm	mittlere Glättungstiefe
Rq	Quadratischer Mittelrauwert
Rt	Gesamthöhe des Profils
Rvm	mittlere Riefentiefe
Rz	gemittelte Rauhtiefe
R3z	Grundrauhtiefe
Sa	arithmetischer Mittelrauwert (Flächenrauheit)
SD	Standardabweichung
SPF	Sun Protection Factor
Sq	quadratischer Mittelrauwert (Flächenrauheit)
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TEWL	Transepidermaler Wasserverlust
t _L	Verzögerungszeit (Lag time), h

ТМ	Trockenmasse
TNF	Tumornekrosefaktor
τ	Schubspannung, Pa
Ue	elastische Deformation der Haut
Uf	Festigkeit der Haut
Uv	Viskoelastizität der Haut
Wt	Wellentiefe
-	

 ${\it Q}$ kumulative permeierte Menge durch eine Flächeneinheit der Haut- bzw. Membranoberfläche, $\mu g/cm^2$

γ Deformation

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel eines Modellgemisches aus verschiedenen Polyphenolklassen, die in Traubentrester erhalten sind, deren möglichen Einsatz in kosmetischen Emulsionen gezeigt. Die phenolischen Verbindungen wurden charakterisiert und unter Beachtung von Emulsionseigenschaften, Stabilität, Polyphenolfreisetzung, Hautpermeation und Wirkung auf die Haut in die Emulsionen eingearbeitet.

Die untersuchten Polyphenole zeigten hoch potente, antioxidative Eigenschaften. Dabei wurden mögliche potenzielle Schutzmechanismen für die Haut gezeigt: hohe Radikalfängeraktivität (TEAC von 1,2 bis 6 µM Trolox/µM) deuten auf die Fähigkeit der Polyphenole hin, die destruktiven Reaktionen freier Radikale in der Hautgewebe zu hemmen. Die Hemmung der Lipidoxidation (Verlängerung der Induktionsperiode in 1,2 bis 2,4 Mal) konnte als Indiz für eine mögliche Schutzwirkung von phenolischen Substanzen auf die hauteigene Lipide wie beispielsweise Ceramide und Fettsäuren in der Epidermis gewertet werden und zeigte zudem eine protektive Wirkung auf ölhaltige kosmetische Formulierungen während der Lagerung.

Für die Hautpermeationsuntersuchungen wurde eine Methode zur Analyse von Polyphenolen in Schweinehaut entwickelt, die eine Wiederfindungsrate von über 90 % für Quercetin, Protocatechusäure und Rutin gewährleistete. Unabhängig vom angewandten Extraktionsprotokoll konnte eine keine vollständige Extraktion von EGCG und Catechin erreicht werden. Möglicherweise sind die hochreaktiven Polyphenole anfällig für Oxidation und können stark mit hauteigenen Proteinen bzw. Enzymen interagieren, was allerdings eine Minderung der antioxidativen Aktivität zur Folge hätte. Außerdem wurde mit einer wässrigethanolischen Lösung (50/50, v/v) von Tween 20 (5 g/L) eine optimale Zusammensetzung der Rezeptorflüssigkeit ausgewählt, bei der keine Limitierung von Freisetzungs- bzw. Permeationsraten auftreten sollten.

Die Untersuchung von Hautpermeation und Wirkstofffreisetzung erfolgte in den Diffusionszellen nach *Franz*, wobei für die *in-vitro* Permeation exzidierte Schweinehaut, und für die Freisetzung eine Cellulosemembran eingesetzt wurden. Bei der Untersuchung der Freisetzungskinetik wurde gezeigt, dass Higuchis Modell am besten für die Beschreibung der Diffusionsvorgänge von Polyphenolen in kosmetischen Emulsionen geeignet ist. Anhand dieses Modells können Prognosen hinsichtlich der Freisetzungs- bzw. Diffusionsgeschwindigkeit in Emulsionen vorgenommen werden. Der Einfluss von Lipophilität und Molekülgröße auf die Freisetzungs- und Permeationskinetik wurde ebenfalls ermittelt. Es wurde gezeigt, dass kleinere hydrophilere Polyphenole schneller freigesetzt werden und die Haut besser durchdringen, als größere und mehr lipophile Moleküle. In Emulsionen mit niedrigeren Lipidgehalten konnten höhere Freisetzungs- und Permeationsraten für fast alle untersuchten Polyphenole ermittelt werden. Nach dem 24-stündigen Permeationsversuch wurden alle Substanzen in der Epidermis und Dermis lokalisiert, die als Zielschichten für die "Anti-Aging"-Wirkung von Polyphenolen angesehen werden können. Im Rahmen eines vereinfachten *in-vitro*-Daten hergestellt werden, wobei in diesem Versuch allerdings lediglich die Polyphenolkonzentration im äußerem Stratum Corneum nach einer 30-minütiger Exposition bestimmt werden konnte.

Da eine gute Korrelation zwischen den Freisetzungs- und Hautpermeationsraten *in vitro* festgestellt werden konnte, wurde bei weiteren Untersuchungen lediglich die Wirkstofffreisetzung bestimmt, so dass auf den Einsatz von Schweinehaut unter anderem aus ethischen Gründen verzichtet werden konnte.

Um die Auswirkungen des Ölphasengehaltes, des Emulgators und des Polyphenolgehaltes auf die Emulsionseigenschaften zu ermitteln, wurden diese Parameter bei der Emulsionsherstellung variiert und die Emulsionsstabilität, Rheologie, Freisetzungsraten und Lagerstabilität der Polyphenole untersucht.

Die Polyphenole zeigten einen deutlichen Einfluss auf die Rheologie und Stabilität der Emulsionen. Dieser war ganz erheblich vom eingesetzten Emulgator abhängig, so dass die Zugabe der Polyphenole entweder zu einem instabileren (wenn als Emulgator eine Mischung aus Tween 40, Span 40, Cetylalkohol eingesetzt wurde) oder zu einem stabileren Produkt führte, wenn als Emulgator eine Mischung aus Glycerylstearatcitrat, Cetearyl Alcohol, Glyceryl Caprylate eingesetzt wurde. Mögliche Wechselwirkungen zwischen phenolischen Verbinungen und Emulgatoren wurden diskutiert. Möglicherweise lokalisieren die Polyphenole mit ihren OH-Gruppen an den gequollenen Polyoxyethylen Ketten von Tween 40, was seine Emulgierkapazität negativ beeinträchtigt. Allerdings konnte diese Theorie noch nicht abschließend experimentell bestätigt werden. Weiterhin zeigte sich, dass aus stabileren Emulsionen höhere Freisetzungsraten erzielt werden können, so dass eine bessere Verfügbarkeit der Polyphenole für die Permeation in die Haut gewährleistet ist.

Abschließend wurde eine Humanuntersuchung durchgeführt, in der die Wirkung einer Resveratrol-haltigen Emulsion auf biophysikalische Hautparameter geprüft wurde. Nach 8 Wochen Anwendung wurde eine signifikante Zunahme der Hautelastizität und der Hautfestigkeit festgestellt, allerdings zeigte sich dies sowohl für die Resveratrol-haltige als auch für die Vehikel-Formulierung. Nach der Applikation der Resveratrol-haltigen Formulierung an den Unterarmen wurde eine signifikante Abnahme des mittleren Flächenrauwertes beobachtet. Da alle anderen Rauheitsparameter unverändert blieben, sollten Aussagen über eine "glättende" Wirkung des Resveratrols nur mit großer Vorsicht getroffen werden. Eine Reduktion der Faltenvolumina wurde nicht festgestellt. Die abschließende Befragung der Probanden ergab keine merklichen sensorischen Unterschiede zwischen beiden Formulierungen. Allerdings betrug die Untersuchungszeit lediglich 8 Wochen, so dass eine mögliche längerfristige Wirkung nicht erfasst werden konnte.

Summary

In this work, the potential use of polyphenols from grape pomace in cosmetic products was investigated using a model mixture of different classes of polyphenols. The phenolic compounds were characterized and incorporated into cosmetic emulsions. The emulsion's properties, such as stability, release and skin permeation of polyphenols and their effect on the skin were analyzed.

The investigated polyphenols showed highly potent antioxidant properties. Two possible protection mechanisms on the skin were shown. On the one hand, their high radical scavenger activities (TEAC of 1.2 to 6 μ M Trolox / μ M) indicate the ability of the polyphenols to inhibit destructive reactions of free radicals in the skin tissue. On the other hand, the inhibition of the lipid oxidation (1.2 to 2.4 times extension of the induction period of the oil) shows a possible protective effect of phenolic compounds on skin lipids, such as ceramides and fatty acids in the epidermis, as well as a protective effect of polyphenols on the oil containing cosmetic formulations during the storage.

Prior to skin permeation experiments, a method for the analysis of polyphenols in pig skin was developed, so that recovery rates of over 90% were guaranteed for quercetin, rutin and protocatechuic acid. Independent of the extraction protocol, a complete extraction of EGCG and catechin could not be achieved. Probably, these highly reactive polyphenols are susceptible to oxidation and can interact with the skin's proteins or enzymes. Furthermore, an optimum composition of the receptor fluid (water-ethanol mixture (50/50, v/v), containing 5 g/L Tween 20) was determined, what does not limit the release or permeation rates of phenolics.

The examination of skin permeation and release of polyphenols was carried out in *Franz* diffusion cells. For the *in-vitro* permeation, excised pig skin was used; for the release, a cellulose membrane was applied. The investigation of the release kinetics showed that Higuchi's model is the most suitable for the description of diffusion processes of polyphenols in cosmetic emulsions. This model allows predictions regarding the release and diffusion rates in the emulsions. The influence of the lipophilicity and molecular size on the release and per-

meation kinetics was also determined. It was shown that smaller hydrophilic polyphenols are released faster and their penetration through the skin is more effective than the one of larger or more lipophilic polyphenols. In emulsions with lower lipid content, higher release and permeation rates were determined for almost all the investigated polyphenols. After the permeation experiments, which were performed for 24 h, all the substances were localized in the epidermis and dermis. These are the layers, which are considered as targets for the "anti-aging" activity of polyphenols. In a simplified permeation experiment *in-vivo*, a direct correlation with the *in-vitro* data could not be achieved. However, in this experiment, the concentrations of polyphenols after 30 min application could be determined only in the upper stratum corneum.

Since a good correlation of the release and *in-vitro* skin permeation could be ascertained, only the drug release was tested in the further experiments, and the usage of the pig skin was abdicated (among others, for ethical reasons).

To determine the effects of the oil phase content, of the emulsifier and of the polyphenols on the emulsion properties, these parameters were varied during the emulsion production. The emulsion stability, rheology, shelf stability and release rates of the polyphenols were studied.

The polyphenols influenced the rheology and stability of emulsions considerably. This influence depended on the used emulsifiers. The addition of the polyphenols either led to unstable products, if a mixture of Tween 40, Span 40 and cetyl alcohol was used as an emulsifier, or to more stable products, if a mixture of glyceryl stearate citrate, cetearyl alcohol and glyceryl caprylate was used. Possible interactions between phenolic compounds and emulsifiers were discussed. Probably, the polyphenols are located with their OH-groups on the swollen polyoxyethylene chains of Tween 40, what adversely affects its emulsifying capacity. However, this theory has not been confirmed experimentally yet. It was also discovered that higher release rates can be achieved from the more stable emulsions. Thus, a better availability of polyphenols for permeation into the skin can be provided.

Finally, a human investigation was carried out, in which the effect of a resveratrolcontaining emulsion on the biophysical parameters of the skin was assayed. After 8 weeks of use, a significant increase in skin elasticity and firmness was observed; however, this effect was indicated for both, the resveratrol-containing and the placebo formulations. After the application of the resveratrol-containing formulation on the forearms, a significant decrease of mean surface roughness was observed. Since all other roughness parameters remained unchanged, any statements about a "smoothing" effect of resveratrol should be regarded very carefully. A reduction of the wrinkle volume was not observed. The final interview with the volunteers showed no significant sensory differences between the two formulations. However, the period of the investigation included only 8 weeks, so that possible longer-term effects could not be observed.

1. Einleitung

Viele extrinsische Faktoren wie UV-Strahlung, Umweltverschmutzung und Rauchen führen zu einer vorzeitigen Hautalterung. Dabei spielt die Bildung freier Radikale eine wesentliche Rolle, da diese oxidative Kettenreaktionen in der Haut auslösen, die wiederum zur Änderung der Struktur und Funktion von Proteinen und zu DNS-Mutationen führen. Die Haut wird dünner, unelastischer und es bilden sich Falten und Pigmentflecken. In extremen Fällen können Hauttumore entstehen [1-3]. Die extrinsische Hautalterung zeigt sich unter anderem in Veränderungen des dermalen Bindegewebes, die hauptsächlich durch Degeneration und Desorganisation von Kollagen und der Anreicherung von pathologischem Elastin hervorgerufen werden [2]. Zur Prävention der extrinsischen Hautalterung können antioxidative Substanzen aus verschiedenen Quellen topisch appliziert werden.

Traubentrester sind Pressrückstände der Weinherstellung, die bislang meist als Düngemittel Verwendung finden. Jedoch beinhalten diese hohe Mengen an antioxidativ wirkende Polyphenole, die in Kosmetika eingesetzt werden können. Somit wird die Wertigkeit der Rohstoffe erhöht und ein Beitrag zu einer nachhaltigen Kosmetikproduktion geleistet.

Polyphenole besitzen eine Reihe von bioaktiven Eigenschaften, wie beispielsweise die Aktivität als Radikalfänger und Metallchelatbildner sowie antimikrobielle, immunstimulierende, wundheilende und chemopreventive Wirkungen [4-7]. Außerdem wurden für polyphenolische Extrakte Anti-Kollagenase, Anti-Elastase und Anti-Hyaluronidase-Aktivitäten nachgewiesen. Sie besitzen somit die Fähigkeit, die Enzyme zu inaktivieren bzw. zu hemmen, die die Hydrolyse von Kollagen- und Elastinfasern sowie von Hyaluronsäure in der Dermis katalysieren [8, 9]. Deswegen kann die topische Applikation von Polyphenolen wirksam sein, um die menschliche Haut vor oxidativem Stress, vor vorzeitigem Altern und vor Hauterkrankungen zu schützen.

Um die gewünschte Wirkung entfalten zu können, müssen topisch applizierte Stoffe aus der Formulierung freigesetzt werden, in die Haut zu gelangen, die Hornschicht (Stratum Corneum) überwinden und in die Epidermis und Dermis eindringen. Die Wirkstoffpermeation durch die Haut ist ein komplexer Prozess, seine wichtigsten Phasen sind die Diffusion der Substanz in der topischen Formulierung und die Freisetzung daraus, das Eindringen (Penetration) in die Haut und die Diffusion durch diese (Permeation) [10]. Aufgrund des komplexen Aufbaus und der Hautinhomogenitäten sind die Beschreibung und die Modellierung der Wirkstoffpermeation nicht einfach. Die Wirkstofffreisetzung und die Hautpermeation sind von den Eigenschaften der Moleküle wie Molmasse und Lipophilität, aber auch von der Vehikelformulierung und Hautbeschaffenheit abhängig [11, 12].

Die Hautpermeation wird in der Regel *in-vitro* in sog. Diffusionszellen untersucht [13]. Dabei wird entweder Humanhaut oder Tierhaut eingesetzt, wobei die Nutzung von beidem ethisch limitiert ist. Schweinehaut wird sehr häufig als Modell verwendet, da sie eine ähnliche Struktur wie die menschliche Haut hat, aber besser verfügbar und kostengünstiger ist [14]. Anstelle teurer Untersuchungen zur Hautpermeation wird oft die Wirkstofffreisetzung aus der Formulierung unter Einsatz künstlicher Membranen getestet, was beispielsweise einen Vergleich von Formulierungen oder deren Qualitätskontrolle ermöglicht [15].

Emulsionen sind die gebräuchlichste Art von topischen Formulierungen aufgrund ihrer Solubilisierungskapazität für sowohl lipophile, als auch hydrophile Inhaltsstoffe. Die guten sensorischen Eigenschaften auf der Haut tragen ebenso zu einer hohen Anwenderakzeptanz bei. Die Konsistenz von Emulsionen hängt stark von der Zusammensetzung und dem Gehalt der Lipidphase und des Tensides ab, so dass sie von flüssigen (Lotionen) bis halbfesten Formulierungen (Cremes) variieren können [16]. Die Einarbeitung von Polyphenolen in Emulsionen können deren rheologische Eigenschaften und deren Stabilität beeinflussen [17].

Die meisten veröffentlichen Studien beschreiben bioaktive Eigenschaften von phenolischen Verbindungen [4-7]. Es gibt bislang nur wenige Hinweise auf die physikalischchemische Eigenschaften von Polyphenolen und auf deren Einfluss auf die Emulsionseigenschaften [18-20]. Deshalb ist es wichtig zu ermitteln, inwieweit diese Substanzen die Rheologie und die Stabilität von Emulsionen beeinflussen und auf welche Weise diese Veränderungen die Freisetzung und Hautpermeation der Polyphenole beeinflussen, da dies ein wichtiges Merkmal für die biologische Wirkung auf die Haut ist.

Wenn die eingesetzten Verbindungen ein hohes antioxidatives Potential aufweisen und die Hautbarriere gut durchdringen können, ist dies ein erstes Anzeichen dafür, dass sie die menschliche Haut vor UV-bedingten Schäden schützen können. Allerding sind Erkenntnisse aus *in-vitro* Studien nicht immer auf *in-vivo* Systeme übertragbar. Daher sind kontrollierte Humanstudien notwendig, um die Wirksamkeit von topischen Präparaten zu bestätigen. Dabei wird in der Regel ein Vorher-nachher Vergleich von biophysikalischen Hautparametern nach einer definierten Applikationsdauer der untersuchten Formulierung vorgenommen. Je nach dem Ziel der Studie können diese Parameter variieren. Da die Hautalterung primär mit dem Elastizitätsverlust, Trockenheit und Faltenentstehung assoziiert wird [21], werden diese Parameter häufig bei der Ermittlung der Wirksamkeit von sog. Anti-Aging Wirkstoffen untersucht.

2. Aktueller Kenntnisstand

2.1. Haut und Hautalterung

Die Haut ist die äußere Grenze des menschlichen Körpers, die ihn vor zahlreichen äußeren Einflüssen schützt und u.a. an der Temperaturregulierung und am Stoffwechsel beteiligt ist. Die Haut ist das rezeptive Feld für die Wahrnehmung der Sinnesempfindungen (Schmerzen, Druck, Temperatur etc.). Darüber hinaus bildet die Haut eine physikalische, chemische, biologische und immunobiologische Barriere.

2.1.1. Aufbau der Haut

Die menschliche Haut, wie die Haut von Säugetieren, besteht aus drei Hauptschichten: Epidermis, Dermis und Subkutis. Die ständig regenerierte Epidermis besteht zu mehr als 95% aus ziegelartig geschichteten Keratinozyten, die im *Stratum basale* gebildet werden und anschließend durch *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum* zur Hautobefläche in Apoptose wandern. Dabei findet die Differenzierung statt, die Korneozyten verlieren ihre Organellen, so dass die äußere Hornschicht, das *Stratum corneum* (SC), aus flachen verhornten kernlosen Korneozyten besteht [2]. Das 10-20 µm dicke SC stellt die größte Barriere für die Aufnahme von bioaktiven Kosmetika dar. Während der Zelldifferenzierung werden Phospholipide abgebaut und Ceramide synthetisiert, die zusammen mit Cholesterol, Cholesterolsulfat und freien Fettsäuren den Intrazellulärraum des SC bilden [22].

In der Basalschicht befinden sich zudem die Melanozyten, die für die Produktion und den Transfer des Pigmentes Melanin verantwortlich sind. Melanin schützt die Haut vor UV-Strahlung und verleiht ihr die natürliche Farbe. Die Epidermis ist durch die dermoepidermale Juktionszone mit der Dermis verbunden. Diese besteht aus den in eine gelartige extrazelluläre Matrix eingebetteten Bindegewebszellen (Fibrozyten und Fibroblasten) und Bindegewebfasern (Kollagen und Elastin). Diese Fasern verleihen der Haut ihre Elastizität und Reißfestigkeit. Außerdem befinden sich in der Dermis die Blut- und Lymphgefäße, Nerven und Hautanhangsgebilde wie Haare und Talgdrüsen. Der Zustand der Dermis für das Erscheinungsbild der Haut von großer Bedeutung, insbesondere weil hier während des Alterungsprozesses entscheidende Veränderungen stattfinden. Die tiefste Hautschicht, die Subkutis, stellt das Unterhautfettgewebe dar, das sowohl ein mechanisches Polster als auch eine Energiereserve des Körpers ist [2].



Abb. 2.1. Schematischer Aufbau der Epidermis [2]

2.1.2. Hautalterung: Faktoren und klinisches Bild

Alterung ist ein unvermeidbarer Prozess, bei dem zahlreiche innere und äußere Faktoren fortschreitend zu einem Verlust der strukturellen Integrität und physiologischer Funktionen der Haut führen. Es wird zwischen intrinsischer und extrinsischer Hautalterung unterschieden. Zu den wichtigsten intrinsischen Alterungsfaktoren zählen Ethnizität und Geschlecht, anatomische Variationen, hormonelle Veränderungen wie z. B. der Abfall von Östrogen in der Menopause. Die intrinsische Alterung ist genetisch determiniert und nahezu unbeeinflussbar. Die extrinsischen Alterungsfaktoren sind dagegen kontrollierbar. Hier spielen beispielsweise Umwelteinflüsse wie UV-Strahlung, Verschmutzung, Nikotinkonsum, Ernährung und Lebensweise eine bedeutende Rolle [3]. Bei beiden Alterungstypen ist der Verlust der Elastizität und Faltenbildung zu beobachten. Jedoch unterscheidet sich das Hautbild deutlich. Eine schematische Darstellung der Veränderungen der Haut durch Alterung ist in Abb. 2.2 dargestellt.



Abb. 2.2. Schematische Darstellung charakteristischer Merkmale in der jungen, intrinsisch gealterten und extrinsisch gealterten (photoaged) Haut [23]. H: Hornschicht, E: Epidermis, BM: Basalmembran, D: Dermis

Junge Haut zeigt eine ausgewogene Zusammensetzung und Verteilung verschiedener Zelltypen in der Epidermis und Dermis, eingeordnete Kollagen und Elastinfasern in der extrazellulären Matrix. Intrinsisch gealterte Haut (z.B. sonnengeschützte Hautareale) zeigt eine Atrophie, die vor allem durch eine Abnahme der Dicke der Epidermis und der Dermis gekennzeichnet wird. Strukturelle Komponenten der extrazellulären Matrix, wie interstitieller Kollagen, werden abgebaut, Kollagenfasern werden vernetzt. Gesamtanzahl an Fibroblasten nimmt ab, deren morphologischer und funktioneller Phänotyp ändert sich, was mit einer erhöhten Freisetzung von Matrix-abbauenden Metalloproteinasen verbunden ist. Extrinsische Alterung (Photoaging) äußert sich in einer hyperplastischen Haut, die Dicke der Hornschicht, der Epidermis und der Dermis nimmt zu. Die Epidermis wird rau und trocken und zeichnet sich durch eine Hyperpigmentierung und eine milde Hyperkeratose aus. Bei schweren Sonnenschäden entstehen in der Hornschicht atypische Keratinozyten, was zu einem klinischen Bild der aktinischen Keratose führt. Die Verteilung der Melanozyten wird inhomogen, was zu verschiedenen Pigmentveränderungen führt, von pigmentierten Maculae (Solarlentigines) bis zu Bereichen mit einer Hypopigmentierung (Hypomelanose). Die Anzahl der Verankerungsfibrillen, die die Epidermis mit der Dermis binden, sinkt. Das interstitielle Kollagen wird reduziert und beschädigt. Die Zunahme von elastischen Fasern und mikrofibrillaren Komponenten führt zu einer nicht-funktionellen und schwer gestörten supramolekularen Struktur. Eine langfristige Sonneneinstrahlung resultiert in einer Entzündung (Heliodermatitis) mit einer erhöhten Anzahl an mononukleären Zellen und Mastzellen [2, 23, 24].

2.1.3. Oxidativer Stress

Als Hauptursache der extrinsischen (vorzeitigen) Alterung gilt heutzutage der oxidative Stress, der durch endogene reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ausgelöst wird. Zu ROS gehören Superoxid-Radikal (Hyperoxid-Anion O_2^{\bullet}), Hydroxyl-Radikal (OH[•]) sowie andere Formen von aktiven Sauerstoff wie Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oder Singulett-Sauerstoff (¹O₂). ROS sind an normalen Signalprozessen beteiligt, ihre Produktion ist für den Organismus von einer essenziellen Bedeutung, u. a., um die Homöostase und zelluläre Reaktivität aufrechtzuerhalten [1]. Primäre Orte der ROS-Produktion sind Mitochondrien, wo sie in die Energiegewinnung involviert sind. Unter normalen Bedingungen wird der oxidative Schaden in der Zelle auf ein Minimum reduziert. Wenn der Organismus äußerlichen Belastungen ausgesetzt wird, entsteht ein Überschuss an ROS, der für den oxidativen Stress verantwortlich ist [1, 25].

In den Zellmembranen werden durch ROS Kettenreaktionen der Lipidoxidation initiiert (Abb. 2.3). Infolgedessen kann die Fluidität der Membranen beeinflusst werden, außerdem können die Membranproteine, insbesondere Rezeptoren, in die Radikalreaktionen involviert werden, was ihre Funktion beeinträchtigt. Letztlich kann die Membran brechen [26].



Abb. 2.3. Kettenreaktion einer Lipidperoxidation [26]. Das Hydroxyl-Radikal entzieht ein Wasserstoffatom von einem ungesättigten Lipidmolekül. Nach der Umgruppierung zu einer konjugierten Struktur reagiert das neu gebildete Radikal mit Sauerstoff, dabei entsteht ein Peroxidradikal, das wiederum eine Kettenreaktion initiieren kann.

Der Effekt von Sonnenlicht macht rund 90 % der sichtbaren Hautalterung aus, besonders bei heller Haut. UVA und UVB Strahlung sind unter anderem an der Entstehung von Hautkrebs beteiligt [2, 3]. ROS sind nicht nur direkt an Gewebeoxidation und -abbau beteiligt, sondern sie greifen in die Signaltransduktionswege ein, die in die Expression von Genen, welche den Kollagenmetabolismus regulieren, involviert sind. Bereits nach 15 Minuten UV-Bestrahlung werden die Rezeptoren für den epidermalen Wachstumsfaktor (Interleukin (IL)-1 und Tumornekrosefaktor (TNF)- α) in Keratinozyten und Fibroblasten aktiviert. Die Protein-Tyrosin-Phosphatasen, deren Funktion die Herunterregulierung dieser Rezeptoren ist, werden aber durch ROS oxidiert und inhibiert. Diese dadurch noch höhere Rezeptoraktivierung führt zur Aktivierung von Signalisierungs-Kinasen sowie vom nuklearen Transkriptionsfaktor (Aktivatorprotein 1 (AP-1)), welcher die Steuerung der Transkription von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) kontrolliert. Zu MMPs gehören MMP-1 (Kollagenase), MMP-3 (Stromelysin) und MMP-9 (Gelatinase). Diese Enzyme katalysieren den Abbau von entsprechenden Proteinen [24]. Die MMP-Expression findet sowohl in den epidermalen Keratinozyten sowie in dermalen Fibroblasten statt, deswegen sind diese beiden Hautschichten besonders den Sonnenschaden ausgesetzt.

Die Kollagenproduktion in den Fibroblasten in der UV-beschädigten Haut ist ebenso vermindert. Ferner kann das beschädigte Kollagen wiederum die Synthese des neuen Kollagens herunterregulieren [24]. Das genetische Material wird unter der Einwirkung von UV-Licht beschädigt. Da DNS UVB-Strahlung direkt absorbiert, kommt es zu einer Dimerisierung von Pirimidinbasen, was eventuell eine Mutation infolge von Fehlern bei der DNS-Replikation auslösen kann. UVA kann außerdem die DNS-Reparatur inhibieren [25]. Dies zusammen mit der oben beschriebenen Aktivierung der MMP und der Lipidoxidation kann Hautkrebs auslösen und führt zu einer vorzeitigen Hautalterung.

2.1.4. Topische Prävention der Hautalterung

Die Haut verfügt über ein eigenes System an Antioxidantien (enzymatisch und nichtenzymatisch), das sie unter normalen Bedingungen vor oxidativem Stress schützen kann. Enzyme funktionieren überwiegend in den Zellen. Glutathionperoxidase, Glutathionreduktase und Katalase reduzieren Wasserstoffperoxid und Lipidhydroperoxide. Superoxiddismutasen schützen die Zellen und den extrazellulären Raum vor Superoxid. Enzymaktivitäten in der menschlichen Haut sind in der Epidermis höher als in der Dermis. Nichtenzymatische hauteigene Antioxidantien sind beispielsweise L-Ascorbinsäure in der wässrigen Phase, Glutathion im zellulären Kompartiment, Vitamin E (α -Tocopherol) in Membranen und Ubichinol in Mitochondrien [25]. Die niedermolekularen Antioxidantien funktionieren in Geweben als koordinierte interaktive Chemikaliengruppe (Abb. 2.4), diese Interaktionen basieren auf deren chemischen Struktur, Position im Gewebe und dem relativen Redoxpotential.



Abb. 2.4. Interaktion von nichtenzymatischen Antioxidantien [27]. Eine im lipophilen Bereich der Zelle gebildete ROS (RO•) wird durch das Tocopherol, das in Membranen lokalisiert ist, reduziert. Dabei entsteht das Tocopheroxyl-Radikal, das entweder durch Ubiquinol (lipophil) oder durch die Ascorbinsäure (hydrophil) wieder reduziert werden kann. Das oxidierte Dehydroaskorbat kann durch Glutathion (GSH) reduziert werden, das oxidierte Glutathiondisulfid (GSSG) bringt das NADPH wieder zum aktiven Zustand. (NAD(P)⁺, Nicotinamidadenindinucleotidphosphat-oxidierte Form; NAD(P)H, NAD(P)-reduzierte Form).

Wenn der Organismus oxidativem Stress ausgesetzt wird, lässt die Effektivität des hauteigenen Antioxidantsystems nach. Beispielsweise, nach einer Bestrahlung der Hautfibroblasten mit UVA geht die Aktivität von Katalase und Superoxiddismutase zurück [25]. Somit ist es wichtig, das Antioxidantsystem der Haut zu unterstützen, indem weitere Antioxidantien entweder mit der Ernährung eingenommen, oder direkt auf die Haut appliziert werden, wobei das letzte als eine gezielte Applikation von Vorteil ist.

Die Behandlungsterapien der Hautalterung werden in drei Gruppen unterteilt. Zur primären Prävention gehört in erster Linie der UV-Schutz. Hierzu gehören kosmetische Produkte mit SPF (Sun Protection Factor), die UVB und UVA Filter beinhalten. Sommerbekleidung bietet beispielsweise einen UV-Schutz, der dem SPF von 30 äquivalent ist [24].

Zu sekundären Maßnahmen gehören kosmetische Wirkstoffe, die sowohl präventiv, als auch reparativ wirken können. Basierend auf dem Wirkmechanismus deren Wirkung werden sie in zwei Kategorien unterteilt:

- Antioxidantien, wie Vitamine, Coenzyme und Pflanzenstoffe, die die freie Radikale abfangen und MMPs inaktivieren können, was wiederum zu einer Normalisierung der Kollagenproduktion führt.
- Zellregulatoren wie Retinol, Peptide und Wachstumsfaktoren, die direkt den Metabolismus der Fibroblasten beeinflussen [28].

Tertiäre Maßnahmen umfassen minimalinvasive (Botulinumtoxin A, oberflächliches chemisches Peeling u.a.) und invasive Therapien (chirurgisches Face-Lifting, tiefes chemisches Peeling, Laser-Skin-Resurfacing u.a.) [2].

2.2. Klinische Methoden in der Evaluierung der Hautalterung

Um eine Anti-Aging-Therapie bewerten zu können, ist es wichtig, ihre Wirksamkeit zu quantifizieren. Dabei ist es wichtig, dass die Messmethoden nicht-invasiv und aussagekräftig sind. Aus diesen Gründen sind in den letzten Jahren viele klinische Methoden zur Messung und Quantifizierung der Hautalterung entwickelt und validiert worden. Im Folgenden sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewandten sowie andere in der Forschung relevante biophysikalische Messmethoden beschrieben.

2.2.1. Hauttopographie

Das äußere Erscheinungsbild der Haut ist das wichtigste Merkmal, woran die Hautalterung erkennbar wird. Sowohl chronologische Alterung, als auch das Photoaging ist mit einer Ausbildung von Falten verbunden (Kap. 2.1.2). Häufig wird das Hautrelief zur Validierung in Klassen eingeteilt, z. B. von klaren Falten und Furchen (> 100 μ m) bis zu Hautlinien, die einzelnen Hornzellen zuzuordnen sind (0,5 μ m) [29]. Hierzu werden in der Literatur unterschiedliche Validierungsskalen angeboten. Das sind vier- bis neun-Punkt Skalen, die auf einer standardisierten fotografischen Dokumentation basieren (Abb. 2.5). Bewertet werden verschiedene Gesichtsstellen, wie Stirn, Augenbereich, Mundbereich [21, 30-32].

Allerdings sind diese Skalen trotz Objektivierungsversuchen ziemlich subjektiv, da es sich bei der Bewertung immer noch um persönliche Wahrnehmung handelt. Daher war es wichtig, eine instrumentelle Analyse der Hauttopographie zu entwickeln, was in der letzten Zeit gut gelungen ist. Im Wesentlichen können die Messmethoden in zwei Gruppen unterteilt werden: Analyse von Replikas (Silikonabdruck der Haut) oder direkte Hautmessung, wobei das Letztere heutzutage immer mehr an Bedeutung gewinnt. Die dazugehörige Software ermöglicht in der Regel eine Darstellung dreidimensionaler Topographien sowie die Ermittlung standardisierter Rauheitswerte, die in Kap. 2.2.2 näher beschrieben werden.



Abb. 2.5. Photoagingskala nach Glogau: (a) wenige Falten, keine Keratose; (b) frühe Falten; (c) ausgeprägte Falten und Hautentfärbung; (d) tiefe Falten, Hautschaden [21].

Analyse von Replikas

Hierzu wird erst durch Auftragen einer selbsthärtenden Silikonmasse auf die Haut der Silikonabdruck (Replika) angefertigt, der anschließend Mittels diverser Techniken bildquantitativ analysiert wird. Bei einer *mechanischen Profilometrie* und *Laserprofilometrie* wird die Replikaoberfläche mit einer Diamantennadel bzw. mit einer Laserdiode "abgetastet" und ein Oberflächenprofil erstellt [33, 34]. Beim *quantitativen Image Analysis* werden die Schatten, die Replikas unter einem bestimmten Winkel werfen, aufgenommen und digitalisiert [34]. Das Prinzip der *Transparenz-Profilometrie* basiert auf dem Durchleuchten von Replikas aus dünnem blauem Silikon mit parallelem Licht [33, 35]. Der Nachteil von Replika-Methoden ist, dass die Vorbereitung der Silikonabdrücke mit einem hohen Aufwand sowie mit einer hohen Fehlerwahrscheinlichkeit verbunden ist. Z. B. kann die Haut, während die Silikonmasse hart wird, unter dem Silikon schwitzen, was zu einer Verzerrung des Hautbildes führt.

In-vivo Messung der Hauttopographie

Eine direkte optische Erfassung der Hautoberfläche hat den Vorteil, dass die Replikavorbereitung entfällt und die Messung kontaktfrei verläuft. Allerdings müssen die Messgeräte eine hohe Messgenauigkeit und Auflösung haben und gleichzeitig robust gegenüber Störungen sein, da es überaus schwierig ist, *in-vivo* Haut zu fixieren. Da aber die Technik besonders in der letzten Jahren enorme Fortschritte macht, existieren gegenwärtig einige Systeme, die diesen Anforderungen entsprechen.

Ein berührungsloses Verfahren zur Erfassung der Hautoberflächenprofile ist die *Streifenprojektion*, ein Verfahren, bei dem ein phasenverschobene Streifenmuster durch eine Mikrospiegelvorrichtung erstellt und auf die Haut projiziert wird (Abb. 2.6). Eine Digitalkamera, die unter einem anderen Winkel, als das Projektionssystem, positioniert wird, erfasst drei verschobene Bilder, aus den ein 3-D-Oberflächenkontur der Haut berechnet wird [21].



Abb. 2.6. Prinzip des optischen 3D-Sensors (PRIMOS) [36]

Eine weitere Methode ist die *Videomikroskopie*. Das Visioscan (Courage & Khazaka, Köln) besteht aus einer Kamera, die mit einem hochauflösenden schwarz-weiß-Videosensor und

einer UVA-Lichtquelle ausgerüstet ist. Das Höhenprofil des erhaltenen Bildes wird in Graustufen kodiert, was die Auflösung ziemlich begrenzt [37, 38]. Durch eine Kombination des Streifenprojektionsverfahrens mit der Grau-Code-Methode ist die Auflösung bei *FOITS* (fast optical in vivo topometrie of human skin) deutlich höher [39, 40].

In dieser Arbeit wurde das Messsystem *PRIMOS* (phase shift rapid in-vivo measurement of the skin, GFMesstechnik, Teltow) für die Evaluierung der Hauttopographie verwendet (Abb. 2.6). Das System findet eine breite Anwendung in der Hautforschung, für eine Objektivierung der Bewertung des Hautzustandes, besonders der Hautalterung [41, 42], und für eine quantitative Bewertung der Anti-Aging-Therapie [43].

2.2.2. Rauheitsparameter

Im Folgenden die Rauheitskenngrößen beschrieben, die mittels der Software Primos 5.7 berechnet werden, wobei die Kenngrößen auf ISO-Normen basieren und unabhängig von der verwendeten Messsystem sind. Der Ablauf stellt sich wie folgt dar: nachdem ein Höhenbild der Hautoberfläche erstellt ist (Beispiel: Abb. 2.7), kann durch das Bild eine Sekante (Linie 1) gezogen werden, für die das Höhenprofil (Abb. 2.8) ermittelt wird und die unten beschriebenen *Linienrauheitsparameter* (LRP) berechnet werden können.



Abb. 2.7. Höhenbild der Stirn eines 44-jährigen Probanden, aufgenommen mit PRIMOS Pico.

Die Software erlaubt auch die Berechnung der sog. *Sternrauheit*, wobei die Linien unter unterschiedlichen Winkeln sternförmig angeordnet sind (Abb. 2.7). Die Rauheitsparameter werden dabei für jede Linie separat ermittelt und die Mittelwerte berechnet. Die *Flächenrauheitsparameter* (FRP) enthalten Informationen über die gesamte Oberfläche und sind somit aussagekräftiger, als die sehr stark von der Linienposition abhängigen LRP. Die FRP sind allerdings bis dato noch nicht standardisiert [36].

Linienrauheitsparameter (LRP)

Eine der ältesten Rauheitskenngrößen, die oft benutzt wird, um die Veränderungen in der Oberfläche zu erkennen, ist der *arithmetische Mittelrauwert Ra* (Formel (1), [36]). Allerdings kann über *Ra* weder zwischen Spitzen und Riefen unterschieden werden noch sind verschiedene Profilformen erkennbar [44].

$$Ra = \frac{1}{lr} \int_0^{lr} |R(x)| dx,$$
(1)

Ir ist die Länge der Mittellinie, und die *R*(*x*) sind die Beträge der Profilwerte in jedem Punkt *x*.

Der *quadratische Mittelrauwert Rq* ist der quadratische Mittelwert der Profilabweichungen von der mittleren Linie (Formel (2), [36]). *Rq* ist empfindlicher auf einzelne Spitzen und Riefen als *Ra*. Bei einer statistischen Auswertung des Oberflächenprofils hat *Rq* eine große Bedeutung, da der Wert gleich der Standardabweichung der Profilhöhenverteilung ist [44].



Abb. 2.8. Der Linie 1 (Abb. 2.7) entsprechendes Rauheitsprofil

Flächenrauheitsparameter (FRP)

Diese Parameter werden analog zu oben beschriebenen LRP definiert, die Berechnung erfolgt beim Integrieren der Gesamtfläche.

Sa und **Sa** sind arithmetischer und quadratischer Mittelrauwerte, die analog zu Ra und Rz für die gesamte Messfläche bestimmt werden:

$$Sa = \frac{1}{nx \cdot ny} \cdot \sum_{i=1}^{nx} \sum_{j=1}^{ny} R(x_i, y_j), \tag{3}$$

$$Sq = \sqrt{\frac{1}{nx \cdot ny} \cdot \sum_{i=1}^{nx} \sum_{j=1}^{ny} R(x_i, y_j)^2},$$
(4)

nx und *ny* sind die Anzahl der Punkte des Auswerterechteckes in x- und y-Richtung, $R(x_i, y_j)$ sind die Profilwerte an den entsprechenden Koordinaten [36].

2.2.3. Mechanische Eigenschaften der Haut

Die Haut ist ein viskoelastisches System. Ihre Eigenschaften sind von der Größe und Form der Zellen, dem Zusammenhalt der Schichten und der Organisation der inneren Faserstrukturen abhängig ist und die mit dem Altern ändern. Zu den biomechanischen Eigenschaften der Haut gehören Dehnbarkeit, Zugbelastbarkeit, Viskoelastizität und Fließeigenschaften. *Invivo* Messverfahren basieren auf der Hautreaktion auf Dehnung, Drehung oder Druck.

Saugmethoden (Suktion)

Die Hautoberfläche wird bei dieser Methode durch Unterdruck in eine Sonde gezogen. In der Sonde ist ein optisches Messsystem eingebaut, das die Eindringtiefe der Haut in die Sonde erfasst. Die gängigen Geräte, denen die Elongation zu Grunde liegt, sind z. B. Cutometer (Courage-Khazaka, Köln) oder Dermalab Elasticity module (Cortex Technology, Dänemark), wobei die Sonden unterschiedliche Form und Größe haben. Beim Cutometer ist ein Unterdruck von 20 bis 500 mbar einstellbar. Der Widerstand der Haut gegen das Einsaugen (Festigkeit) und ihre Fähigkeit, die Ausgangsposition wieder einzunehmen (Elastizität) werden als Kurven dargestellt. Diverse Messmodi sind verfügbar, z. B. Dehnungs-Zeit-Modus, bei dem die Deformation der Haut als Funktion über die Zeit angezeigt wird. Die Software ermöglicht es, die Deformationsparameter wie sofortige elastische Deformation, verzögerte Deformation, unmittelbare elastische Erholung der Haut und das viskoelastische Verhältnis u. a. zu berechnen [45]. Im Dermalab Elasticity module wird eine bestimmte Ausdehnung der Haut vorgegeben. Nach Ermittlung des hierfür benötigten Unterdrucks werden das Young's Modul sowie andere viskoelastische Parameter berechnet [46].

Da im Rahmen dieser Arbeit zur Messung der mechanischen Hauteigenschaft das Cutometer verwendet wurde, wird auf diese Messung im Weiteren näher eingegangen (Kap. 2.2.4, Abb. 2.9). Die Methode ist in der Hautforschung weit verbreitet. Häufig wird sie angewandt, um Hautalterungserscheinungen sichtbar zu machen [47, 48] und um die Wirkung einer kosmetischer Behandlung oder einer Verjüngungstherapie nachzuweisen [49-51].

Andere Methoden

Torsionsmethoden basieren auf der Verdrehbarkeit der Haut, die von ihrer Festigkeit (dem Turgor) abhängig ist. Junge Haut leistet einen großen Widerstand und kehrt sofort nach der Beendigung des Verdrehungsvorgangs zurück in die Ausgangslage. Der Messkopf wird mit einer Klebefolie auf der Hautoberfläche fixiert und zu kleinen Drehbewegungen veranlasst. Mittels des Dermal Torque Meters (DiaStron Limited, UK) können anhand von Widerstand, Drehwinkel und der Zeit der Verdrehungs- und Rückstellphase elastische und plastische Anteile definiert werden. Der Frictiometer (Courage-Khazaka, Köln) misst die Verdrillung der Haut bei einer konstanten Drehgeschwindigkeit des Friktionskopfs [46].

Bei der Indentometrie (Eindrucksmethode) drückt ein Stempel mit einer definierten Kraft auf die Hautoberfläche. Die Eindringstiefe wird mit über die Zeit aufgenommen. Mit dieser Methode können die Widerstandkräfte gegen den Druck sowie die Rückprallelastizität der Haut definiert werden. Bei der *Lewarometrie* (Ziehmethode) wird die Messsonde mit einem doppelseitigen Klebeband auf der Haut befestigt und eine rechtwinkelige Zugkraft auf die Haut ausgeübt [46].

2.2.4. Elastizitätsparameter

In der Abb. 2.9 ist eine typische Deformationskurve nach einer Messung mit Cutometer dargestellt. Diese Kurve besteht aus drei Zyklen, die jeweils eine Einsaugungsphase und eine Relaxationsphase beinhalten. Die Software *Cutometer MPA Q* ermittelt sog. *R*- und *F-Parameter*, die sowohl absolute, als auch relative Elastizitätsparameter darstellen [45].

Uf (R0) ist die Amplitude (maximale Hautdeformation) des ersten Saugzyklus. Der Parameter spiegelt die *Festigkeit* der Haut wider und zwar, je niedriger Uf, desto fester ist die Haut [45]. Die Gesamtauslenkung umfasst elastische und viskoelastische Hauteigenschaften:

Uf = Ue + Uv.

Ue ist die sofortige *elastische Deformation* der Haut während des ersten Ansaugens. *Ue* stellt den linear ansteigenden Kurvenanteil dar und wird nach ca. 0,1 s gemessen [45]. In der Phase der elastischen Hautverformung dehnen sich alle Fasern (Kollagen, Elastin) und Faserbündel in der Dermis aus. Je großer die "reine" Elastizität ist, desto reversibler ist die Hautverformung [46]. *Uv*, die *Viskoelastizität*, wird aus dem zweiten Teil der ersten Messkurve ermittelt. Der Parameter stellt die verzögerte Deformation bzw. plastische Verformung der Haut dar [45]. Die viskosen Eigenschaften der Haut werden durch innere Reibung einiger Hautkomponente, z. B. gedehnter Kollagenfasern, hervorgerufen [46].



Abb. 2.9. Deformationskurve einer Elastizitätsmessung mit dem Cutometer

Die R- und F-Parameter, die das Einsaugungsverhalten beschreiben, sind:

RO = *Uf,* Gesamtdeformation, Dehnbarkeit der Haut, der Wert ist umgekehrt proportional der Hautfestigkeit;

R6 = *Uv/Ue*, Verhältnis der verzögerten (viskosen) Deformation zur sofortigen elastischen Deformation. Je kleiner dieser Wert ist, desto elastischer ist die Haut.

FO – Fläche über der ersten Kurve (Abb. 2.9), normiert auf die Fläche des gesamten Rechtecks (*Uf* multipliziert mit Einsaugungszeit). Der Parameter ist somit von der Amplitude unabhängig. Je steiler die Kurve ist, desto kleiner ist die Fläche und umso elastischer ist die Haut [45, 49].

Wenn das Vakuum aufgelöst wird, kehrt die Haut nah zur Ausgangsposition zurück, diese wird allerdings nicht erreicht. Die gesamte Rückbildung wird durch den Parameter *Ua (R8)* ausgedrückt. Je näher *Ua zu Uf* ist, desto elastischer ist die Haut. In der Relaxationsphase sind ebenso zwei Kurventeile zu beobachten, *Ur* ist das sofortige elastische Rückstellvermögen, es wird ca. nach 0,1 s nach dem Brechen des Vakuums gemessen. Dabei ziehen sich die Elastin- und Kollagenfasern wieder zusammen. Da die Hautbewegung wiederum durch die innere Reibung erschwert wird, zeichnet sich die Relaxationskurve auch durch den plastischen Anteil (*Ua – Ur*) aus [45]. Die verbleibende Deformation bzw. Dehnung der Haut am Ende des ersten Saugzyklus (*Uf – Ua*) stellt eine quasi-plastische Verformung dar, die sich nur sehr langsam zurückbildet. Diese ist ein direktes Maß dafür, wie irreversibel der Dehnungs-prozess war [46].

Die Parameter, die die Relaxationsphase beschreiben, sind somit:

R8 = Ua, Gesamtrückbildung;

R1 = Uf - Ua, tiefster Punkt der ersten Kurve, die verbleibende Deformation;

R2 = Ua/Uf, Rückbildungsfähigkeit oder Bruttoelastizität. Je näher dieser Wert an 1 ist, desto elastischer ist die Haut;

R5 = *Ur/Ue*, Nettoelastizität, d. h., ohne die viskose Deformation. Verhältnis der sofortigen (elastischen) Rückbildung zur sofortigen elastischen Ausdehnung. Für ein ideal elastisches System beträgt der *R5*-Wert 1.

R7 = Ur/Uf, Verhältnis der sofortigen (elastischen) Rückbildung zur maximalen Ausdehnung. Einem ideal elastischen System entspricht ein *R7*-Wert von 1.
F1 – Fläche unter der Relaxationskurve (Abb. 2.9), normiert auf die Fläche des gesamten Rechtecks (Uf multipliziert mit Relaxationszeit). Dieser Flächenparameter ist ebenso von der Amplitude unabhängig. Je näher der F1-Wert an 0 ist, desto elastischer ist die Haut [45],[49].

Wenn der Unterdruck mehrmals an der gleichen Stelle angelegt wird, ohne dass die Haut Zeit hat, sich davon zu erholen, können die Ermüdungserscheinungen messbar gemacht werden. Die entsprechenden Parameter sind:

R3, die Amplitude der letzten Kurve; R4, der tiefster Punkt der letzten Kurve;

R9 = R3 - R0, die Differenz zwischen der letzten und der ersten Amplituden. Je kleiner dieser Wert ist, desto weniger ermüdet die Haut [45].

2.2.5. Feuchtigkeit und Barriereeigenschaften der Haut

Eine ausreichende Hautfeuchtigkeit ist eine Voraussetzung für einen gesunden Hautzustand. Wenn die Haut altert, mindert ihre Barriereintegrität, was zu einem erhöhten Wasserverlust führt, als Folge wird die Haut trockener und rauer. Die Messung der Hautfeuchtigkeit kann mittels mehreren Methoden durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hauthydratation mittels Corneometrie ermittelt.

Die Leitfähigkeit sowie die elektrische Kapazität eines Gewebes sind von dessen Wassergehalt abhängig. Auf einer Leitfähigkeitsmessung basieren z. B. Skicon 200 EX (I.B.S. Co., Japan), DermaLab Moisture Module (Cortex Technology, Dänemark). Corneometer CM 825 (Courage-Khazaka, Köln) und MoistureMeter (Delfin Technologies Ltd., Finnland) basieren auf der Messung der elektrischen Kapazität, Nova DPM 9003 und dem Messprinzip von Nova Penquin (Nova Technology Corporation, USA) liegt eine Impedanzmessung zugrunde [52-55]. Am meisten verbreitet in der Hautforschung ist die *Corneometrie*. Weitere Methoden wie NMR Tomographie oder Infrarotspektroskopie sind sehr aufwendig und finden daher kaum Anwendung. Eine relativ neue Methode ist die *in vivo* konfokale Raman-Spektroskopie. Sie ermöglicht, exakte Konzentration von Wasser oder anderen Raman-aktiven Stoffen (z. B. Karotinoiden) in den oberen Hautschichten sowie deren Tiefenprofil zu ermitteln [56].

Veränderungen in der Integrität der Hautbarriere können durch die Ermittlung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) erfasst werden. Der TEWL wird als die Wassermenge, das in die umgebende Atmosphäre durch die Epidermis diffundiert bzw. abgedampft wird, definiert. Das vegetative Nervensystem, die Körpertemperatur und die Durchblutung der Haut steuern das Maß des TEWLs [21]. Die Messung des TEWLs erfolgt mittels Evaporimetrie. Der Wasserdampfpartialdruck und die Temperatur werden in zwei Abständen von der Hautoberfläche gemessen und der Wasserdampfgradient (g/cm²/h) ermittelt. Gängig sind zwei Systemtypen, mit einer offenen Sonde (Tewameter TM 300 (Courage-Khazaka, Köln), Evaporimeter EP1 (ServoMed, Sweden)), wobei das Mikroklima unmittelbar über der Haut während der Messung nur minimal beeinflusst wird, und das System mit einer geschlossener Sonde (Vapometer SWL-3 (Delfin Technologies Ltd., Finnland)). Die Vergleichsuntersuchungen zeigten, dass Tewameter geringere TEWL-Änderungen signifikant ermitteln kann, als Vapometer [57]. Tewameter wurde in dieser Arbeit angewandt.

2.3. Polyphenole als aktive Inhaltsstoffe für kosmetische Produkte

Wie im Kap. 2.1.4 erwähnt, gehört eine Behandlung mit kosmetischen Wirkstoffen, die präventiv oder reparativ wirken, zu den sekundären Maßnahmen der Anti-Aging Therapie. Eine Möglichkeit dabei ist die topische Anwendung von Antioxidantien, die freie Radikale abfangen und MMPs inaktivieren können, was zu einer Normalisierung der Kollagenproduktion und zu einem Anti-Aging-Effekt führen kann [28]. Beispielsweise, Polyphenole sind natürliche Pflanzenstoffe, die in der Literatur als sehr potente Antioxidantien beschrieben werden [4, 58], was sie zu sehr attraktiven kosmetischen Inhaltsstoffen macht [59].

2.3.1. Chemische Zusammensetzung wichtiger Polyphenolklassen

Der Begriff "Polyphenole" umfasst eine komplexe Gruppe von chemischen Verbindungen, die in ihrer Struktur mehr als eine phenolische Hydroxylgruppe enthalten, die an einem oder mehreren Benzolringen gebunden sind. Phenolsäuren und Zimtsäuren sind einfache Phenole, die in der Regel Vorläufer für die Biosynthese von komplexeren Molekülaggregaten sind. In Abb. 2.10 sind die Strukturformeln typischer Repräsentanten von Phenolsäuren (*p*-Hydroxybenzoesäure, Protocatechusäure) und Zimtsäuren (Zimt- und Kaffesäure) dargestellt [26].



Abb. 2.10. Strukturformeln typischer Phenol- und Zimtsäuren

Flavonoide bilden die größte Gruppe von Polyphenolen, bei denen zwei Benzolringe (A, B) mittels eines sechs-atomaren Heterozyklus gebunden sind (z.B. Naringenin, Abb. 2.11). Der A-Ring stammt aus der Kondensation von drei Malonyl-Coenzym-A-Molekülen. Der Ring B stammt aus *p*-Cumaryl-CoA, daher ist der A-Ring der meisten Flavonoide entweder meta-dioder meta-trihydroxyliert [26]. Der B-Ring der *Isoflavone* ist an einer anderen Position des

Sauerstoffhaltigen Heterozyklus gebunden (Abb. 2.11). Der Heterozyklus von *Flavanonen* enthält ebenso eine Ketongruppe, aber keine ungesättigten C-C Bindungen (z.B. Naringenin).



Abb. 2.11. Strukturformeln von Vertretern der Flavanone (Naringenin), Isoflavone und Leucoanthocyanidine

Flavane besitzen einen komplett gesättigten Heterozyklus. Sie werden in Leucoanthocyanidine (Abb. 2.11) und *Flavan-3-ole* (Flavanole oder Catechine, Abb. 2.12) unterteilt. *Catechine* werden oft mit einem Gallussäurerest bei der OH-Gruppe in der Position 3 esterifiziert (Catechingallat, Abb. 2.12)



Abb. 2.12. Strukturformeln typischer Catechine

Der Heterocyclus von *Flavonen* enthält eine Ketongruppe und hat eine ungesättigte C-C-Bindung (Abb. 2.13, Quercetin). Die OH-Gruppe in der Position 3 ist oft glykosiliert. Zur großen Gruppe der *Anthocyane* gehören rote-blau-schwarze Pigmente, die in Blumen und Früchten vorkommen. Der Heterocyclus der Anthocyanidine (Aglykone) stellt ein Pyriliumkation dar (Abb. 2.13, Pelargonidin). Anthocyanine sind die Glykoside von Anthocyanidinen. Durch die Verknüpfung von Flavonoiden mit Zucker oder Säuren entstehen über 4.000 verschiedene Verbindungen, die in Pflanzen natürlich vorkommen [26].



Abb. 2.13. Strukturformeln von Vertretern der Flavone (Quercetin), Anthocyaninide (Pelargonidin), Xanthone und Stilbene (Resveratrol)

Xanthone haben eine $C_6-C_1-C_6$ -Struktur (Abb. 2.13) und kommen u. a. in Blumen und tropischen Früchten als gelbe Pigmente vor. *Stilbene* besitzen eine $C_6-C_2-C_6$ -Struktur. Ein Repräsentant der Stilbene, Resveratrol (Abb. 2.13), wird als "magisches Polyphenol" aus Rotwein bezeichnet [26].

2.3.2. Quellen und Funktion der Polyphenole

Polyphenole gehören zu den sekundären Pflanzenstoffen, denn sie werden nicht im primären Energierstoffwechsel von Pflanze gebildet und dienen z. B. zum Schutz der Pflanze gegen UV-Strahlung oder Schädlinge. Sie sind für die Pflanze nicht lebensnotwendig und werden nur in geringen Mengen gebildet. Wichtige natürliche Quellen von Polyphenolen sind Früchte, Tee, Gewürze oder Ölsaaten. Auch die nach der Verarbeitung der Rohstoffe anfallenden landwirtschaftlichen Nebenprodukte, wie beispielsweise Äpfel- oder Traubentrester, Kaffeerückstände etc. sind reich an Polyphenolen. In Tabelle 2.1 sind einige Polyphenolquellen aufgeführt. Tabelle 2.1. Quellen pflanzlicher Polyphenole (nach [60])

QuelleMeist enthaltene phenolische SubstanzenFrüchteBeerenFlavanole, Hydroxyzimtsäuren, Hydroxy- benzoesäuren, AnthocyanineKirschenHydroxyzimtsäuren, Anthocyanineschwarze TraubenAnthocyanine, FlavonoleZitrusfrüchteFlavanone, Flavonole, PhenolsäurenPflaumen, Äpfel, Birnen, KiwiHydroxyzimtsäuren, CatechineGemüseAubergineAnthocyanine, HydroxyzimtsäurenGemüseChicorée, ArtischockenHydroxyzimtsäurenBeberAnthocyanineSüßkartoffelblätterBohnenFlavonoleFlavonoleSuigkartoffelblätterFlavonoleFlavonoleBohnenFlavonoleFlavonoleMehlHafer, Weizen, ReisKaffeesäure, FerulasäureTeeschwarzer Tee, grüner TeeFlavanole, FlavonoleGetränkeRotweinFlavanolKaffeeHydroxyzimtsäurenKaffeeHydroxyzimtsäurenGiderRosmarin, SalbeiCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolOreganoRosmarinsäure, Flavonoide, Itavonoide, Luteolin					
FrüchteBeerenFlavanole, Hydroxyzimtsäuren, Hydroxy- benzoesäuren, AnthocyanineKirschenHydroxyzimtsäuren, Anthocyanineschwarze TraubenAnthocyanine, FlavonoleZitrusfrüchteFlavanone, Flavonole, PhenolsäurenPflaumen, Äpfel, Birnen, KiwiHydroxyzimtsäuren, CatechineGemüseAubergineAnthocyanine, HydroxyzimtsäurenChicorée, ArtischockenHydroxyzimtsäurenPetersilieFlavoneRhabarberAnthocyanineSüßkartoffelblätterFlavonole, FlavonoleGelbe ZwiebelFlavonoleBohnenFlavanoleSpinatFlavonole, PerulasäureTeeschwarzer Tee, grüner TeeGetränkeRotweinKräuter und GewürzeRosmarin, SalbeiCiderHydroxyzimtsäurenKräuter und GewürzeRosmarin, SalbeiCoreganoRosmarinsäure, Phenolsäuren, Flavonoide, Luteolin		Quelle	Meist enthaltene phenolische Substanzen		
kirschenbenzoesäuren, Anthocyanineschwarze TraubenAnthocyanine, FlavonoleZitrusfrüchteFlavanone, Flavonole, PhenolsäurenPflaumen, Äpfel, Birnen, KiwiHydroxyzimtsäuren, CatechineGemüseAubergineAnthocyanine, HydroxyzimtsäurenChicorée, ArtischockenHydroxyzimtsäurenPetersilieFlavoneRhabarberAnthocyanineSüßkartoffelblätterFlavonole, FlavoneGelbe ZwiebelFlavonole, FlavoneBohnenFlavonole, FlavoneSignatFlavonole, PocumarinsäureTeeschwarzer Tee, grüner TeeGetränkeRotweinKräuter und GewürzeRosmarin, SalbeiKräuter und GewürzeRosmarin, SalbeiOreganoRosmarinsäure, Flavonoide, Phenolsäuren, Flavonoide, Plavonole, Rosmarinsäure, Rosmarin, SalbeiKräuter und flavinoleCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolKräuter und flavinoleCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolKräuter und flavinoleCarnosolsäure, Phenolsäuren, Flavonoide, Phenolsäuren, Flavonoide, Phenolsäuren, FlavonoideKräuter und flavinoleCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolKräuter und flavinoleCarnosolsäure, Phenolsäuren, Flavonoide, Luteolin	Früchte	Beeren	Flavanole, Hydroxyzimtsäuren, Hydroxy-		
KirschenHydroxyzimtsäuren, Anthocyanineschwarze TraubenAnthocyanine, FlavonoleZitrusfrüchteFlavanone, Flavonole, PhenolsäurenPflaumen, Äpfel, Birnen, KiwiHydroxyzimtsäuren, CatechineAubergineAnthocyanine, HydroxyzimtsäurenChicorée, ArtischockenHydroxyzimtsäurenPetersilieFlavoneRhabarberAnthocyanineSüßkartoffelblätterFlavonole, FlavonoleGelbe ZwiebelFlavonoleBohnenFlavanoleSpinatFlavonole, P-CumarinsäureTeeschwarzer Tee, grüner TeeGetränkeRotweinCiderHydroxyzimtsäurenOrangensaftFlavanole, Flavonole, AnthocyanineKräuter undRosmarin, SalbeiGewürzeOreganoOreganoRosmarinsäure, Phenolsäuren, Flavonoide, Luteolin			benzoesäuren, Anthocyanine		
schwarze TraubenAnthocyanine, FlavonoleZitrusfrüchteFlavanone, Flavonole, PhenolsäurenPflaumen, Äpfel, Birnen, KiwiHydroxyzimtsäuren, CatechineAubergineAnthocyanine, HydroxyzimtsäurenChicorée, ArtischockenHydroxyzimtsäurenPetersilieFlavoneRhabarberAnthocyanineSüßkartoffelblätterFlavonole, FlavonoleGelbe ZwiebelFlavonoleBohnenFlavonoleSpinatFlavonole, p-CumarinsäureMehlHafer, Weizen, ReisKaffeesäure, FerulasäureGetränkeRotweinFlavanole, Flavonole, AnthocyanineCiderHydroxyzimtsäurenOrangensaftFlavanole, Flavonole, AnthocyanineKräuter und GewürzeRosmarin, SalbeiCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolKräuter und FlavinanOreganoRosmarinsäure, Phenolsäuren, Flavonoide, Luteolin		Kirschen	Hydroxyzimtsäuren, Anthocyanine		
ZitrusfrüchteFlavanone, Flavonole, PhenolsäurenPflaumen, Äpfel, Birnen, KiwiHydroxyzimtsäuren, CatechineAubergineAnthocyanine, HydroxyzimtsäurenChicorée, ArtischockenHydroxyzimtsäurenPetersilieFlavoneRhabarberAnthocyanineSüßkartoffelblätterFlavonole, FlavoneGelbe ZwiebelFlavonoleBohnenFlavanoleSpinatFlavonole, p-CumarinsäureMehlHafer, Weizen, ReisKaffeesäure, FerulasäureTeeschwarzer Tee, grüner TeeFlavanole, Flavonole, AnthocyanineGiderHydroxyzimtsäurenOrangensaftFlavanolsKaffeeHydroxyzimtsäurenKräuter undRosmarin, SalbeiCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolGewürzeOreganoRosmarinsäure, Phenolsäuren, Flavonoide, Luteolin		schwarze Trauben	Anthocyanine, Flavonole		
Pflaumen, Äpfel, Birnen, KiwiHydroxyzimtsäuren, CatechineGemüseAubergineAnthocyanine, HydroxyzimtsäurenChicorée, ArtischockenHydroxyzimtsäurenPetersilieFlavoneRhabarberAnthocyanineSüßkartoffelblätterFlavonole, FlavoneGelbe ZwiebelFlavonoleBohnenFlavanoleSpinatFlavonole, p-CumarinsäureMehlHafer, Weizen, ReisKaffeesäure, FerulasäureTeeschwarzer Tee, grüner TeeFlavanole, Flavonole, AnthocyanineGiderHydroxyzimtsäurenCiderOrangensaftFlavanolsKaffeeHydroxyzimtsäurenSchokoladeFlavanolsKräuter undRosmarin, SalbeiCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolGewürzeOreganoRosmarinsäure, Phenolsäuren, FlavonoideThymianThymol, Carvacrol, Flavonoide, Luteolin		Zitrusfrüchte	Flavanone, Flavonole, Phenolsäuren		
GemüseAubergineAnthocyanine, HydroxyzimtsäurenChicorée, ArtischockenHydroxyzimtsäurenPetersilieFlavoneRhabarberAnthocyanineSüßkartoffelblätterFlavonole, FlavoneGelbe ZwiebelFlavonoleBohnenFlavanoleSpinatFlavonoide, p-CumarinsäureMehlHafer, Weizen, ReisKaffeesäure, FerulasäureTeeschwarzer Tee, grüner TeeFlavanole, Flavonole, AnthocyanineGetränkeRotweinFlavanole, Flavonole, AnthocyanineCiderHydroxyzimtsäurenOrangensaftFlavanolsKräuter undRosmarin, SalbeiCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolGewürzeOreganoRosmarinsäure, Phenolsäuren, Flavonoide, Luteolin		Pflaumen, Äpfel, Birnen, Kiwi	Hydroxyzimtsäuren, Catechine		
Chicorée, ArtischockenHydroxyzimtsäurenPetersilieFlavoneRhabarberAnthocyanineSüßkartoffelblätterFlavonole, FlavoneGelbe ZwiebelFlavonoleBohnenFlavanoleSpinatFlavonoide, p-CumarinsäureMehlHafer, Weizen, ReisKaffeesäure, FerulasäureTeeschwarzer Tee, grüner TeeFlavanole, FlavonoleGetränkeRotweinFlavanole, Flavonole, AnthocyanineCiderHydroxyzimtsäurenOrangensaftFlavanolsKaffeeHydroxyzimtsäurenSchokoladeFlavanolsKräuter undRosmarin, SalbeiCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolOreganoRosmarinsäure, Phenolsäuren, FlavonoideThymianThymol, Carvacrol, Flavonoide, Luteolin	Gemüse	Aubergine	Anthocyanine, Hydroxyzimtsäuren		
PetersilieFlavoneRhabarberAnthocyanineSüßkartoffelblätterFlavonole, FlavoneGelbe ZwiebelFlavonoleBohnenFlavanoleSpinatFlavonoide, p-CumarinsäureMehlHafer, Weizen, ReisKaffeesäure, FerulasäureGetränkeRotweinFlavanole, Flavonole, AnthocyanineCiderHydroxyzimtsäurenOrangensaftFlavanolsKaffeeHydroxyzimtsäurenSchokoladeFlavanolsKräuter undRosmarin, SalbeiCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolOreganoRosmarinsäure, Phenolsäuren, Flavonoide, Luteolin		Chicorée, Artischocken	Hydroxyzimtsäuren		
RhabarberAnthocyanineSüßkartoffelblätterFlavonole, FlavoneGelbe ZwiebelFlavonoleBohnenFlavanoleSpinatFlavonoide, p-CumarinsäureMehlHafer, Weizen, ReisKaffeesäure, FerulasäureTeeschwarzer Tee, grüner TeeFlavanole, Flavonole, AnthocyanineGetränkeRotweinFlavanole, Flavonole, AnthocyanineCiderHydroxyzimtsäurenOrangensaftFlavanolsKaffeeHydroxyzimtsäurenSchokoladeFlavanolsKräuter undRosmarin, SalbeiCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolOreganoRosmarinsäure, Phenolsäuren, Flavonoide, Luteolin		Petersilie	Flavone		
SüßkartoffelblätterFlavonole, FlavoneGelbe ZwiebelFlavonoleBohnenFlavanoleSpinatFlavonoide, p-CumarinsäureMehlHafer, Weizen, ReisKaffeesäure, FerulasäureTeeschwarzer Tee, grüner TeeFlavanole, FlavonoleGetränkeRotweinFlavanole, Flavonole, AnthocyanineCiderHydroxyzimtsäurenOrangensaftFlavanolsKaffeeHydroxyzimtsäurenSchokoladeFlavanolsKräuter undRosmarin, SalbeiCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolOreganoRosmarinsäure, Phenolsäuren, Flavonoide, Luteolin		Rhabarber	Anthocyanine		
Gelbe ZwiebelFlavonoleBohnenFlavanoleSpinatFlavonoide, p-CumarinsäureMehlHafer, Weizen, ReisKaffeesäure, FerulasäureTeeschwarzer Tee, grüner TeeFlavanole, FlavonoleGetränkeRotweinFlavanole, Flavonole, AnthocyanineCiderHydroxyzimtsäurenOrangensaftFlavanolsKaffeeHydroxyzimtsäurenSchokoladeFlavanolsKräuter undRosmarin, SalbeiCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolOreganoRosmarinsäure, Phenolsäuren, Flavonoide ThymianThymol, Carvacrol, Flavonoide, Luteolin		Süßkartoffelblätter	Flavonole, Flavone		
BohnenFlavanoleSpinatFlavonoide, p-CumarinsäureMehlHafer, Weizen, ReisKaffeesäure, FerulasäureTeeschwarzer Tee, grüner TeeFlavanole, FlavonoleGetränkeRotweinFlavanole, Flavonole, AnthocyanineCiderHydroxyzimtsäurenOrangensaftFlavanolsKaffeeHydroxyzimtsäurenSchokoladeFlavanolsKräuter undRosmarin, SalbeiCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolOreganoRosmarinsäure, Phenolsäuren, Flavonoide, Luteolin		Gelbe Zwiebel	Flavonole		
SpinatFlavonoide, p-CumarinsäureMehlHafer, Weizen, ReisKaffeesäure, FerulasäureTeeschwarzer Tee, grüner TeeFlavanole, FlavonoleGetränkeRotweinFlavanole, Flavonole, AnthocyanineCiderHydroxyzimtsäurenOrangensaftFlavanolsKaffeeHydroxyzimtsäurenSchokoladeFlavanolsKräuter undRosmarin, SalbeiCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolOreganoRosmarinsäure, ThymianRosmarinsäure, Flavonoide, Luteolin		Bohnen	Flavanole		
MehlHafer, Weizen, ReisKaffeesäure, FerulasäureTeeschwarzer Tee, grüner TeeFlavanole, FlavonoleGetränkeRotweinFlavanole, Flavonole, AnthocyanineCiderHydroxyzimtsäurenOrangensaftFlavanolsKaffeeHydroxyzimtsäurenSchokoladeFlavanolsKräuter undRosmarin, SalbeiCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolOregano ThymianRosmarinsäure, Thymol, Carvacrol, Flavonoide, Luteolin		Spinat	Flavonoide, p-Cumarinsäure		
Teeschwarzer Tee, grüner TeeFlavanole, FlavonoleGetränkeRotweinFlavanole, Flavonole, AnthocyanineCiderHydroxyzimtsäurenOrangensaftFlavanolsKaffeeHydroxyzimtsäurenSchokoladeFlavanolsKräuter undRosmarin, SalbeiCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolOreganoThymianRosmarinsäure, Flavonoide, Luteolin	Mehl	Hafer, Weizen, Reis	Kaffeesäure, Ferulasäure		
GetränkeRotweinFlavanole, Flavonole, AnthocyanineCiderHydroxyzimtsäurenOrangensaftFlavanolsKaffeeHydroxyzimtsäurenSchokoladeFlavanolsKräuter undRosmarin, SalbeiCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolOreganoRosmarinsäure, ThymianRosmarinsäure, Flavonoide, Luteolin	Тее	schwarzer Tee, grüner Tee	Flavanole, Flavonole		
CiderHydroxyzimtsäurenOrangensaftFlavanolsKaffeeHydroxyzimtsäurenSchokoladeFlavanolsKräuter undRosmarin, SalbeiCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolOreganoRosmarinsäure, ThymianRosmarinsäure, Flavonoide, Luteolin	Getränke	Rotwein	Flavanole, Flavonole, Anthocyanine		
OrangensaftFlavanolsKaffeeHydroxyzimtsäurenSchokoladeFlavanolsKräuter undRosmarin, SalbeiCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolGewürzeOreganoRosmarinsäure, Phenolsäuren, Flavonoide Thymian		Cider	Hydroxyzimtsäuren		
KaffeeHydroxyzimtsäurenSchokoladeFlavanolsKräuter undRosmarin, SalbeiCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolGewürzeRosmarin, SalbeiRosmarinsäure, Phenolsäuren, Flavonoide Thymian		Orangensaft	Flavanols		
SchokoladeFlavanolsKräuter undRosmarin, SalbeiCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolGewürzeOregano ThymianRosmarinsäure, Phenolsäuren, Flavonoide Thymol, Carvacrol, Flavonoide, Luteolin		Kaffee	Hydroxyzimtsäuren		
Kräuter und GewürzeRosmarin, SalbeiCarnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure, RosmanolOregano ThymianRosmarinsäure, Phenolsäuren, Flavonoide Thymol, Carvacrol, Flavonoide, Luteolin		Schokolade	Flavanols		
GewürzeRosmanolOreganoRosmarinsäure, Phenolsäuren, FlavonoideThymianThymol, Carvacrol, Flavonoide, Luteolin	Kräuter und	Rosmarin, Salbei	Carnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure,		
Oregano Rosmarinsäure, Phenolsäuren, Flavonoide Thymian Thymol, Carvacrol, Flavonoide, Luteolin	Gewürze		Rosmanol		
Thymian Thymol, Carvacrol, Flavonoide, Luteolin		Oregano	Rosmarinsäure, Phenolsäuren, Flavonoide		
		Thymian	Thymol, Carvacrol, Flavonoide, Luteolin		

Eine wichtige Quelle von Polyphenolen sind Weintrauben (*Vitis Vinifera*). Das Polyphenolspektrum ist sehr breit und umfasst sowohl Flavonoide als auch andere Verbindungen wie Phenolsäuren oder Stilbene. Der Gesamtpolyphenolgehalt in roten Trauben variiert je nach Sorte 4 bis 5 g GAE/100 g TM (g Gallussäure-Äquivalente pro 100 g Trockenmasse) in der Haut und von 5 bis 8 g GAE/100 g TM in den Kernen. Die Wichtigsten Vertreter sind Catechin und Epicatechin (Kerne), Quercetin, Rutin und Resveratrol (Haut) [61]. Während der Weinproduktion wird ein großer Teil der phenolischen Verbindungen mitextrahiert, so dass der Polyphenolgehalt in Wein je nach Sorte bis 3,2 g GAE/L betragen kann [62]. Traubentrester weisen nach dem Pressen aber auch einen relativ hohen Polyphenolgehalt auf; ca. 0,8 bis 2,9 g GAE/100 g TM konnten aus weißem bzw. rotem Traubentrester extrahiert werden [4], [63], [64] was diese zu einer wesentlichen Polyphenolquelle macht. Tee ist ebenso eine der wichtigsten Quellen der Polyphenole. Zu Teepolyphenolen gehören hauptsächlich Flavanole (Catechine); der Polyphenolgehalt und somit das antioxidative Potential des grünen Tees ist viel höher im Vergleich zu schwarzem, weißem oder Oolongtee. Epigallocatechingallat (EGCG), Epigallocatechin (EGC) und Epicatechingallat (ECG) sind in grünem Tee in vergleichsweise hohen Konzentrationen enthalten [65]. Extrakte aus Eiche, Kiefer und Zimt weisen ein sehr hohes antioxidatives Potential auf, diese Pflanzen enthalten 300-400 mg GAE/g Polyphenole [66]. Oliven und Olivenöl, Sesam und diverse Ölsaaten wie Sonnenblumen sowie kaltgepresste Öle enthalten polyphenolische Verbindungen wie Flavonoide und Phenolsäure [60]. Die Reste nach der Saftherstellung aus Acerolakirsche, Ananas und Passionsfrüchte enthalten jeweils 0,7; 0,28 und 0,1 g GAE/100 g TM [67]. Andere tropische Früchte, wie zum Bespiel Mangostane, enthalten bis zu 4,8 g GAE/100 g TM, wobei die Hauptsubstanzen Xanthone sind [68]. Tabakpflanzen enthalten Flavonoide Apigenin, Quercetin und Rutin [69], Blumen wie Orchideen sind ebenso reich an Flavonoiden [70].

2.3.3. Bioaktive Eigenschaften von Polyphenolen

In der Literatur werden zahlreiche positive Wirkungen von Polyphenolen auf die Haut beschrieben, wie beispielsweise die Hemmung von UV-induzierten Hautschäden [71], entzündungshemmende Eigenschaften [72] oder Wirkung gegen Melanoma [73, 74].

Die am meisten untersuchte Eigenschaft der Polyphenole ist die Radikalfängeraktivität [67, 75]. Wie oben beschrieben, spielen ROS eine wichtige Rolle bei pathophysiologischen Prozessen sowohl in der Haut, als auch in anderen Organen. Bei einer Untersuchung von wässrigen Extrakten aus 30 Pflanzen wurde eine Korrelation zwischen dem Polyphenolgehalt der Extrakte und deren antioxidativer Kapazität festgestellt [66]. Pflanzliche Polyphenole dienen nicht nur als ROS-Fänger, Metallchelatoren und Enzymmodulatoren, ihre antimikrobielle, immunostimulierende, chemopreventive und Wundheilaktivität werden ebenso in der Literatur beschrieben [4-7].

Epigallocatechingallat (EGCG) ist ein sehr potentes Polyphenol, das natürlich im grünen Tee (*Camellia sinensis* L. Kuntze) vorkommt. Studien in Tiermodellen zeigen, dass antioxidativ und entzündungshemmend wirkende Grünteeextrakte schädliche Auswirkungen der UV-Exposition reduzieren können [76]. Sevin et al. [71] berichtet über einen protektiven Effekt des EGCG auf die Rattenhaut, wenn EGCG vor UV-Bestrahlung topisch appliziert wurde. Im Rahmen einer Humanstudie von Katiyar et al. konnte ein protektiver Effekt von EGCG gegenüber dem durch die UV-Strahlung ausgelösten oxidativen Stress nachgewiesen werden [77]. Einige Studien am Menschen lassen ein chemopräventives Potential des EGCG vermuten, allerdings wird diese Wirkung derzeit noch diskutiert, da in anderen Studien keine signifikanten Ergebnisse gezeigt werden konnten [76].

Bekannt ist das sogenannte "französisches Paradox", wobei die epidemiologische Daten aus Frankreich auf eine schützende Wirkung von Rotwein trotz einer fettreichen Ernährung hinwiesen [78]. Weitere Studien geben Hinweise darauf, dass positive Effekte auf das kardiovaskuläre System auf die Polyphenole, insbesondere Resveratrol, zurückzuführen sein kann [79]. Neben den kardioprotektiven Wirkungen wurde eine antikanzerogene Wirkung des Resveratrols beschrieben, die vermutlich an der Fähigkeit liegt, die Proliferation einer Vielzahl von Tumorzellen zu unterdrücken. Hierzu gehören lymphatische und myeloische Krebsarten, multiples Myelom, Brusttumoren, Prostata-, Magen-, Darm-, Pankreas- und Schilddrüsenkrebs; Melanom, Plattenepithelkarzinom; Ovarialkarzinom und Zervixkarzinom [80].

Für einige Flavonoide (Luteolin, Quercetin, Galangin) sowie für Stilben Resveratrol wurde eine protektive Wirkung in Zelllinien gegenüber dem von H₂O₂ induziertem oxidativen Stress nachgewiesen. Allerdings kam es bei zu hohen Konzentrationen zu zytotoxischen Effekten und Zellapoptosis, es wurden Überschneidungen von protektiven und toxischen Effekten der Polyphenole beobachtet [81].

Unter den berichteten positiven Auswirkungen der Polyphenole auf den menschlichen Organismus und insbesondere auf die Haut, ist auch eine inhibierende Wirkung auf die Matrix-Metalloproteinasen beschrieben, z. B. auf MMP-1 (Collagenase), die unter oxidativem Stress aktiviert werden (Kap. 2.1.3). *In-vitro* Studien belegen eine hemmende Wirkung polyphenolischer Extrakte bzw. einzelner phenolischer Verbindungen auf die Enzyme der extrazellulären Matrix Collagenase, Elastase, Hyaluronidase, die den Abbau von Collagen, Elasin bzw. Hyaluronsäure in der Dermis verursachen und zu einer vorzeitigen Alterung beitragen [8, 9, 82]. Die beschriebenen Wirkungen lassen ein hohes Potential pflanzlicher Polyphenole als aktive Inhaltsstoffe für kosmetische Zubereitungen erwarten, das nach einer topischen Applikation einen Anti-Aging-Effekt in der Haut erzielen könnte.

2.4. Kosmetische Emulsionen

Emulsionen sind die meist verbreiteten Systeme topischer Formulierungen nicht nur aufgrund ihres Solubilisierungsvermögens für sowohl lipophile als auch hydrophile Bestandteile, sondern auch wegen einer hohen Akzeptanz bei der Anwendung auf der Haut aufgrund ansprechender sensorischen Eigenschaften. Emulsionen sind heterogene Systeme, die aus zwei nicht mischbaren Phasen (Wasserphase und Ölphase) bestehen, wobei die eine Phase in der anderen dispergiert und mit einem Emulgator stabilisiert wird [83]. Die Konsistenz von Emulsionen hängt stark von der Zusammensetzung und Gehalt der Lipidphase und der verwendeten Tenside ab, so dass sie von flüssigen (Lotionen) zu halbfesten Formulierungen (Cremes) variieren können [16].

2.4.1. Emulsionstypen

Zwei wesentliche Emulsionstypen sind Öl-in-Wasser (O/W) und Wasser-in-Öl (W/O)-Emulsionen. Bei den O/W-Emulsionen handelt es sich um ein zweiphasiges System, in dem die Ölphase (disperse Phase) in der Wasserphase (Dispergiermittel, äußere, kontinuierliche Phase) dispergiert ist. In W/O-Emulsionen bildet das Öl die kontinuierliche Phase. Welcher Emulsionstyp entsteht, wird durch den Emulgator bestimmt. Die Phase, in der der Emulgator besser löslich ist, wird zur kontinuierlichen Phase (Regel von *Bancroft*) [29]. Bei *multiplen* Emulsionen liegt die innere Phase als Emulsion vor (z. B. W/O/W- oder O/W/O-Emulsionen).

Mikroemulsionen sind thermodynamisch stabile transparente Systeme, die spontan durch den hohen Emulgatoranteil entstehen. *Nanoemulsionen* sind kinetisch stabilisiert, d. h. sie entstehen durch z. B. Hochdruckhomogenisierung mit oder ohne Emulgatoren. Die Teilchengröße beträgt bei den beiden Typen 10-100 nm. *PIT*-Emulsionen entstehen durch die Erwärmung einer O/W-Emulsion bis zur Phaseninversionstemperatur (PIT), wobei eine W/O-Emulsion entsteht. Durch die anschließende Abkühlung zur Raumtemperatur entsteht eine fein verteilte O/W-Emulsion (Tröpfchendurchmesser 100-400 nm). *Pickering*-Emulsionen enthalten feinstverteilte Feststoffteilchen, die an der Phasengrenze angereichert werden und die Emulsion durch Verhinderung des Zusammenfließens disperser Phase stabilisieren [29].

2.4.2. Emulsionsinhaltsstoffe

Da im Rahmen dieser Arbeit einige Komponenten variiert wurden, wird im Folgenden auf die wesentlichen Emulsionsinhaltsstoffe eingegangen.

<u>Emulgatoren</u> sind oberflächenaktive Stoffe (Tenside), die die Grenzflächenspannung reduzieren und somit die Emulsionsstabilität positiv beeinflussen [84]. In Hautpflegemitteln werden in der Regel nicht-ionische Emulgatoren eingesetzt. Deren hydrophiler Molekülteil besteht z. B. aus Glycerin, Polyglycerin, Sorbitanen, Kohlenhydraten oder Polyoxyethylenglykolen. Der hydrophobe Teil besteht beispielsweise aus Fettalkoholen oder Fettsäuren. Die Zusammensetzung der dieser Emulgatoren lässt sich durch die Kettenlängen stark variieren. Übliche Repräsentanten sind selbst-emulgierende Glycerinmono-/distearate sowie deren Ethoxylate, Mono-, Di-, Trifettsäureester der Sorbitane und deren ethoxylierten Derivate. Phospholipide stellen natürliche Emulgierwachse dar [16]. *Coemulgatoren* (z. B. Cetylalkohol) tragen der zusätzlichen Stabilisierung der Emulsion bei.

Eine wichtige Charakteristik für Emulgatoren ist der HLB-Wert (hydrophilic-lipophilic balance), der ein Maß für die Wasser- bzw. Öllöslichkeit darstellt. Der HLB-Wert kann nach der Formel (5) berechnet werden und somit von 1 bis 20 variieren [84]. Substanzen mit einem HLB-Wert < 10 sind W/O-Emulgatoren, mit höherem – O/W-Emulgatoren. Der HLB-Wert ist temperaturabhängig, deswegen erfolgt bei der PIT eine Inversion der Phasen [85].

 $HLB = 20 \cdot x / MW$,

wobei x der hydrophile Teil der Molekül und MW die Molmasse ist.

Lipophile Bestandteile bestimmen Konsistenz und Hautgefühl der Emulsion. Beispielsweise hängt das Fettigkeitsgefühl von der Spreitfähigkeit (Verteilbarkeit) der Ölkomponente ab. Hierzu gehören feste, halbfeste und flüssige Kohlenwasserstoffe (Parafinöl, Vaseline), natürliche Öle und Wachse (Weizenkeimöl, Bienenwachs), modifizierte Triacylglyceride (z. B. partiell hydriertes Kokosfett, Caprylcaprinsäuretriglycerid), Fettsäureester, Silicone bzw. Polyorganosiloxane (Dimethicone) u. a [29].

(5)

Zu <u>hydrophilen Komponenten</u> gehören Feuchthaltemittel - Wasser bindende Substanzen wie Polyole (Glycerin, Sorbit), ethoxylierte Polyole und hydrolysierte Proteine, Komponenten des natürlichen Feuchthaltefaktors der Haut wie Harnstoff oder einige Aminosäuren [29]. Zur Viskositätsregelung der Wasserphase werden Polymere (Verdickungsmittel) eingesetzt, die durch gebildete Netzwerke auch die Koagulation der Emulsion verhindern [86]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Glycerin als Feuchtemittel und Hydrokolloid Xanthan als Verdickungsmittel eingesetzt.

<u>*Wirksubstanzen*</u> dienen zur Beeinflussung von Physiologie und Funktion der Haut oder zu ihrem Schutz. Der Auswahl der Wirksubstanz hängt von der gedachten Anwendung ab. Für eine Anti-Aging Therapie bzw. Prävention (Kap. 2.1.4) werden beispielsweise *Antioxidantien* eingesetzt, die die Einflüsse von ROS auf die Haut mildern können [28]. Wie im Kap. 2.3.3 beschrieben, sind pflanzliche Polyphenole sehr potente Wirksubstanzen für eine topische Anwendung.

2.4.3. Stabilität von Emulsionen

Kosmetische Emulsionen sollen über einen viel längeren Haltbarkeitszeitraum verfügen als z. B. Lebensmittelemulsionen, die relativ schnell verzehrt werden. Von der Kosmetikindustrie wird eine Stabilität von über drei Jahren angestrebt. Die komplexe Stabilität umfasst dabei physikalische, chemische und mikrobielle Stabilität. Mit physikalischer Stabilität wird die Emulsionsstabilität bezeichnet, so dass kein Aufrahmen, Koagulieren oder Koaleszens während der Lagerung stattfindet. Unter chemischer Stabilität wird die Stabilität der Wirksubstanzen sowie anderer Emulsionskomponenten verstanden, deren Abbau beispielsweise durch Oxidation verursacht wird. Die Oxidationsvorgänge können durch Antioxidationsmittel oder/und durch Herstellung/Verpackung unter einer sauerstoffarmen Atmosphäre (z.B. unter Stickstoff) verhindert werden. Zur Gewährleistung einer mikrobiellen Stabilität werden häufig Konservierungsmittel eingesetzt [28, 29].

Physikalische Stabilität von Emulsionen

Emulsionen sind themodynamisch instabile Systeme, deren Stabilität das Aufrahmen bzw. die Sedimentation, Aggregation und Koaleszens der dispersen Phase entgegenwirken (Abb. 2.14). Diese Prozesse führen zur Emulsionstrennung [85, 87].



Abb. 2.14. Stufen der Emulsionsdestabilisierung

Mehrere Faktoren spielen bei der Emulsionsstabilität eine wichtige Rolle. Die Grenzflächenspannung ist in dispersen Systemen aufgrund einer großen Phasengrenzfläche sehr hoch. Durch eine Aggregation der dispersen Phase nimmt die Spannung ab. Tenside bzw. Emulgatoren reduzieren die Grenzflächenspannung infolge ihres amphiphilen Charakters und stabilisieren somit die Emulsion. Eine geeignete Kombination der Emulgatoren, die eine stabile Grenzschicht bilden können, sowie die geometrische Anordnung der Emulgatormoleküle an der Grenzfläche bei der Emulsionsstabilisierung, spielen entscheidende Rolle. Die elektrostatische Abstoßung von gleich geladenen Tröpfchen wirkt ebenso einer Aggregation entgegen. Das Oberflächenpotential der emulgierten Tröpfchen (Zeta-Potential) wird oft zur Beurteilung der Emulsionsstabilität herangezogen. Höhere Viskosität der externen Phase trägt zu einer erhöhten Emulsionsstabilität bei. In vielen Formulierungen ist ein stark hydratisiertes Gelgerüst vorhanden, das zu einer verbesserten Stabilität beiträgt. Tröpfchengrößenverteilung sowie die Dichtedifferenz zwischen den Phasen sind ebenso wichtige Faktoren der Emulsionsstabilität. Größere Tröpfchen sind thermodynamisch stabiler als kleine. Bei einer Oswald-Reifung wachsen die größeren Tröpfchen auf Kosten der kleineren, daher bewirkt eine enge Tröpfchengrößenverteilung eine bessere Stabilität [29, 84].

Prüfmethoden zur Emulsionstabilität

Durch einen Zentrifugentest kann die Entmischungsgeschwindigkeit und die Emulsionsstabilität beurteilt werden. Mithilfe einer analytischen Zentrifuge können Veränderungen in der Emulsion bereits während der Messung bewertet werden [88].

Die Emulsionsstabilität kann in *Lagertests* geprüft werden. Die Proben werden bei Raumtemperatur und bei 40 °C, bzw. abwechselnd bei -10 und +20 °C oder 40 °C) gelagert und die Stabilität nach einer der geeigneten Methode beurteilt, z. B. mittels einer *mikroskopischen* *Betrachtung* im Licht-mikroskop oder Rasterelektronenmikroskop oder *Laserbeugungsspektroskopie* können die Tröpfchengrößen und deren Verteilung ermittelt werden [84]. Messung der *elektrischen Leitfähigkeit* ermöglicht die Bestimmung des Wasseranteils in Emulsionen. Da das Öl nicht leitend ist, nimmt die Leitfähigkeit an der Oberfläche beim Aufrahmen der O/W-Emulsion ab. Bei einer Phaseninversion ist ein Sprung in der Leitfähigkeit zu beobachten [34]. Die unten beschriebenen *rheologischen* Messungen, durchgeführt vor und nach der Lagerung, ermöglichen ebenso Aussagen über die Emulsionsstabilität.

2.4.4. Rheologie von Emulsionen

Die Rheologie beschreibt das Fließ- und Verformungsverhalten von Stoffen. Die Anlagen und Pumpen für den Herstellungsprozess werden anhand der rheologischen Daten projektiert. Rheologische Eigenschaften bestimmen zudem die Entnahmefähigkeit, die Verteilbarkeit und das Hautgefühl beim Auftragen kosmetischer Produkte.

Die Viskosität eines Fluids kann als Widerstand gegen die Reibung, die infolge der Bewegung des Fluids entsteht, bezeichnet werden. Die dynamische Viskosität (η , Pa·s) wird als Quotient der Schubspannung (τ , Pa) und Schergeschwindigkeit ($\dot{\gamma}$, 1/s) definiert [89].

 $\eta = \tau / \dot{\gamma}. \tag{6}$

Emulsionen gehören zu nicht-newtonschen Fluiden, d. h. deren Viskosität hängt von der Scherrate ab. Mit steigenden Scherraten sinkt die Viskosität, da die Beweglichkeit der Tröpfchen mit zunehmender Schubspannung ansteigt. Dieses scherverdünnende Verhalten ist charakteristisch für strukturviskose Fluide [90].

Zur Messung von rheologischen Eigenschaften existieren verschiedene Messgeräte. Aufgrund ihrer hohen Reproduzierbarkeit und einfachen Temperierbarkeit werden häufig Schubspannung- oder Schrerraten-gesteuerte *Rotationsrheometer* eingesetzt. Diese haben unterschiedliche Messgeometrien (z. B. Platte-Platte, Kegel-Platte, koaxialer Zylinder), wobei die Probe zwischen dem rotierenden bzw. oszillierenden und dem ruhenden Element geschert wird. Die Geräte haben in der Regel eine Temperatursteuerung und sind programmierbar. Es können nicht nur Viskositätskurven, Fließgrenzen, sondern auch das viskoelastisches Verhalten stukturviskoser Fluide ermittelt werden [89, 91].

40

<u>Oszillationsmessungen</u> liefern Informationen über die strukturellen Eigenschaften von Materialien. Die Schubspannung τ wird sinusförmig vorgegeben (mit der Frequenz ω). Die Antwortkurven (Deformation γ) weisen je nach der Substanzart verschiedene Phasenwinkelverschiebung (δ) auf: bei idealelastischen Körpern sind τ -und γ -Kurve "in Phase" ($\delta = 0$); bei einer idealviskosen Flüssigkeit $\delta = 90^{\circ}$. Bei einem viskoelastischen Material verschiebt sich die γ -Kurve um $0 < \delta < 90^{\circ}$. Dabei wird die Schubspannung wie folgt dargestellt [91]:

$$\tau = \hat{\gamma}[G'(\omega)\sin(\omega t) + G''(\omega)\cos(\omega t)], \tag{7}$$

$$\tau = \hat{\gamma} [G^*(\omega)] \sin[(\omega t) + \delta(\omega)]. \tag{8}$$

G* ist ein komplexes Schubmodul (Pa), dessen realer Teil das Speichermodul G', und dessen imaginärer Teil das Verlustmodul G' ist:

$$G^* = G' + i^* G''. \tag{9}$$

 $\delta = \arctan \left(G''/G' \right) \tag{10}$

Das Speichermodul G' (Elastizitätsmodul) stellt die während eines Schwingungszyklus gespeicherte Verformungsenergie dar, die für die Rückdeformation erforderlich ist. G' repräsentiert das elastische Verhalten der Probe und ermöglicht somit Aussagen über die Gelstärke. Der Verlustmodul G'' (viskoser Modul) präsentiert die verlorene Deformationsenergie, die zum viskosen Fließen benötigt wird und die als Scherwärme verloren wird. *tan* δ wird als Verlustfaktor bezeichnet und liefert Aussagen zum Gel-/Solcharakter [89].

2.4.5. Sensorische Eigenschaften

Die Akzeptanz eines kosmetischen Mittels beim Verbraucher ergibt sich unter anderem aus taktilen Eigenschaften [92]. Geprüft wird sie beispielsweise durch die die Herstellung eines sensorisches Profils für jeweilige Formulierung mit einem Experten-Panel. Bewertet werden z. B. Verteilbarkeit, Einziehvermögen, Öligkeit, Klebrigkeit, Entnehmbarkeit, Konsistenz usw. [93].

Sensorische Prüfmethoden werden in deskriptive Prüfungen und Unterschiedsprüfungen unterteilt. Bei deskriptiven Prüfungen können die Probanden Proben mit Begriffen beschreiben, die anschließend besprochen und als Attribute festgelegt werden. Bei Unterschiedsprüfungen werden zwei oder mehrere Produkte miteinander verglichen. Dazu gehören beispielsweise Dreiecksprüfungen (zwei Proben sind gleich, eine Probe weicht ab), paarweise Vergleichsprüfungen (zwei unterschiedliche Proben) und Rangordnungsprüfungen (mehr als zwei Proben, die Ausprägung der Attribute wird nach der Intensität sortiert) [94].

2.5. Wirkstofffreisetzung und dermale Permeation

Bei einer topischen Applikation von aktiven Wirkstoffen ist es wichtig, dass die Wirkstoffe in die Zielhautschichten penetrieren, in denen sie ihre Wirkung ausüben können. Es wird zwischen der Stratum Corneum (SC)-Absorption, dermaler Absorption und perkutaner Penetration unterschieden. Die SC-Absorption charakterisiert die Menge der topisch applizierten Substanz, die in dem SC verbleibt. Diese gilt als nicht systemisch verfügbar. Dermale Absorption beschreibt die Substanzmenge, die in die Epidermis und Dermis (exklusive SC) diffundiert. Die perkutane Penetration bedeutet, dass die Substanzen die Dermis durchdrungen haben. In den beiden letzten Fällen gelten die entsprechenden Substanzen als systemisch verfügbar [14].

Bei dermaler Permeation spielt der Hautzustand eine wichtige Rolle. Beispielsweise Verletzungen führen zu deformierten Barriereeigenschaften, was wiederum zu höheren Permeationsraten führt. Die Hornschichtbarriere verschiedener Hautareale unterscheidet sich stark, was zu regionalen Differenzen bei der Permeation von Wirkstoffen führt. Das Alter der Haut, der Hydratationszustand der Hornschicht, ihre Durchblutung und die Temperatur der Haut sowie der Metabolismus von Mikroorganismen auf der Hautoberfläche weisen ebenso einen großen Einfluss auf die Permeabilität der Haut auf. Des Weiteren sind die Vehikeleigenschaften für die Hautpermeation von essentieller Bedeutung. Spreitfähigkeit, Viskosität, Abdeckvermögen, pH-Wert u. a. gehören zu Formulierungsattributen, die sich entweder verstärkend oder vermindernd auf die Hautpermeation auswirken können. Wirkstoffqualitäten wie Löslichkeit in der Formulierung, Polarität, Diffusions- und Verteilungskoeffizienten, Konzentration sowie Applikationsart, -dauer, -häufigkeit, -menge, -fläche sind weiter wichtige Faktoren, die bei der dermaler Permeation berücksichtigt werden müssen [92, 95].

2.5.1. In-vitro Testsysteme

Die Prüfung der dermalen Permeation *in-vitro* erfolgt in der Regel in sog. Diffusionszellen. Diese bestehen aus einer Donor- und einer Akzeptor-Kammer, die durch eine Hautmembran getrennt sind. Die Haut wird so fixiert, dass sie mit der dermalen Seite in Kontakt zur Rezeptorphase (Blutimitat) gebracht wird, die temperiert und gut vermischt werden muss. Die Zellen werden aus einem inerten Material (z. B. Glass) hergestellt. Während des Tests erfolgt eine Probenentnahme. Eine gängige Apparatur sind Diffusionszellen nach *Franz* [13, 14] (Abb. 2.15).



Abb. 2.15. Diffusionszelle nach Franz. 1 – obere Permeationszelle (Donorkammer), 2 – topisch applizierte Formulierung, 3 – Membran oder Hautbiobsie, 4 – untere Permeationszelle (Akzeptorkammer), 5 – temperierte Flüssigkeit, 6 – Doppelwand, 7 – Probenentnahmerohr, 8 – Rezeptorflüssigkeit, 9 – Magnetrührer

Neben den stationären sind Durchflussdiffusionszellen (*flow-through*) anwendbar, die eine automatisierte Probenentnahme ermöglichen [14]. Diese Zellen sind näher zur *in-vivo*-Situation, da durch den ständigen Austausch der Rezeptorflüssigkeit die penetrierende Substanz aus der Haut schneller ausgewaschen wird. Beim Saarbrücker Penetrationsmodell dient die Haut selbst als Akzeptor, sie wird zur Untersuchung der Wirkstoffpenetration in die Haut verwendet, wobei die Inkubationszeit hier eingeschränkt ist [96].

2.5.2. Rezeptorflüssigkeit

Die Zusammensetzung der Rezeptorflüssigkeit darf die Penetration des Wirkstoffes nicht limitieren. Integrität sowie Permeationseigenschaften der Haut dürfen nicht beeinflusst werden. Der Wirkstoff soll unter den Testbedingungen in der Rezeptorphase löslich sein. Somit wird das Rezeptorkammervolumen so ausgewählt, dass die Menge an Penetrant nicht höher als 10% der Sättigungskonzentration ansteigen kann, aber noch analysierbar ist [14].

Für hydrophile Moleküle wird eine Salzlösung bzw. eine Pufferlösung verwendet. Für die Solubilisierung lipophiler Komponenten werden Serumalbumin sowie andere nichtionische Emulgatoren zugesetzt. Bei Bedarf kann zur mikrobiologischen Stabilisierung auch ein Antibiotikum zugesetzt werden (z. B. bei längerer Versuchsdauer). Bei Frauen et al. wird beispielsweise ein Blutimitat aus Wasser, Natriumchlorid, Gentamycin und Albumin beschrieben [97]. Riedel et al. verwendeten ein Natriumphosphatpuffer [96]. Ein Einsatz eines Kaliumphosphatpuffers mit Penicillin und Streptomycin oder Zugabe von bis zu 50% Ethanol ist ebenso in der Literatur beschrieben [14].

2.5.3. Hautmembranen

Die Auswahl eines Hautmodells wird durch die Ziele der Untersuchung sowie durch die Verfügbarkeit der Hautproben determiniert. Empfohlen wird in der Regel die Humanhaut, da sie am meisten realistischste Ergebnisse liefert, allerdings, aufgrund deren beschränkten Verfügbarkeit werden häufig Hautmodelle tierischen Ursprungs (z. B. vom Schwein oder Maus) sowie synthetische Membranen verwendet [14].

<u>Ex-vivo Haut</u> muss sehr vorsichtig behandelt werden. Unmittelbar nach der Entnahme müssen der Kühltransport, die Aufbereitung (Waschen, Entfernen der Fettgewebe, Schneiden) und das Einfrieren auf -20 °C erfolgen. Eine Hautmembran kann "ganze" Haut, Spalthaut, Epidermis oder Dermis sein. Für Permeationsuntersuchungen, insbesondere bei lipophilen Komponenten werden normalerweise dünnere (≤ 1mm) Hautmembranen (Spalthaut) verwendet, es sei denn, Ziel der Studie ist es, Penetrationsprofil in Hautschichten zu ermitteln. Hierzu wird die ganze Haut untersucht. Die Lagerungszeit bei -20 °C beträgt 3 bis 6 Monate [14].

<u>Künstliche Haut</u>

Es ist auch möglich, menschliche Haut aus Hautzellen zu rekonstruieren. Auf dem Markt sind Vollhautäquivalente (*Episkin™*, *Epiderm™*, *Testskin™* u. a.) verfügbar. Deren Barriereeigenschaften sind meistens mit menschlicher Haut vergleichbar, die Funktionalität ist jedoch abweichend. Bis heute ergab sich keine Korrelation mit *in-vitro* und *in-vivo* Permeationsstudien [98].

Synthetische Membranen

Schwierigkeiten bei der Aufbereitung und die Notwendigkeit der Konservierung von Human- oder tierischer Haut sind die Hauptgründe für die Nutzung von synthetischen Membranen. Die Ergebnisse sind dabei reproduzierbarer, die Aufbereitung ist einfach und die Lagerbedingungen sind anspruchslos im Vergleich zu biologischen Membranen. Deswegen sind synthetische Membranen gut anwendbar für die Anfangsuntersuchungen der Permeation bzw. Wirksofffreisetzung, z. B. beim Screening der Wirkstoffe oder des UV-Filters. Die Penetrationsprofile sind jedoch nicht definierbar. Es werden Cellulose-Memranen (Acethylcellulose, Mischung aus Acethyl- und Nitratcellulose), Polydimethylsiloxane-Membranen u. a. in diversen Studien angewandt [98].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde exzidierte Schweinehaut für die in-vitro Permeationsuntesuchung von Polyphenolen verwendet. Zur Untersuchung der Polyphenolfreisetzung aus den Emulsionen wurde eine Cellulose-Membran eingesetzt.

2.5.4. Analyse von Freisetzungs- und Permeationskinetiken

Zur Beschreibung der Hautpermeation werden in der Regel zwei Arten von Tests angewandt: "close-to-real" Bedingungen, wenn nur die Wirkstoffmengen bestimmt werden, die in die Haut penetrieren bzw. durch die Haut permeieren, bestimmt werden, und "infinitedose"-Bedingungen (unendliche Dosis), unter denen die Bestimmung kinetischer Koeffizienten möglich ist [13, 14]. Letzteres wird in der Regel auch für Freisetzungsversuche verwendet [15].

Bestimmung der Hautpermeationsparameter

Wenn für ein Experiment "infinite dose"-Bedingungen ausgewählt werden, verläuft der Permeationsprozess innerhalb der stationären Periode ("steady-state"-Periode) in einer Übereinstimmung mit dem ersten Fick'schen Gesetz (Formel (11)) [10, 13, 99] :

$$dQ/dt = K_{\rho}(C_D - C_R), \tag{11}$$

Q (μ g/cm²) ist die kumulative permeierte Menge durch eine Flächeneinheit der Haut- bzw. Membranoberfläche, K_P (cm/h) ist der Permeabilitätskoeffizient und C_D und C_R (μ g/ml) sind die Wirkstoffkonzentrationen in den Donor- und Rezeptorkammern. Wenn $C_R \ll C_D$ ("unendliche Dosis"), entspricht C_D der Ausgangskonzentration des Wirkstoffes in dem Vehikel C_0 . Durch die Integration der Formel (11) kann die kumulative permeierte Menge zum Zeitpunkt *t* wie folgt ausgedrückt werden:

$$Q = K_{\rho}C_{0}(t - t_{L}), \tag{12}$$

 t_L ist die Verzögerungszeit (Lag time), die für eine Diffusion durch die Haut (Membran) erforderlich ist. Innerhalb der steady-state-Periode ist der Stoffflux ($J_{ss} = dQ/dt$, $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$) konstant und kann als Steigung der linearen Regression bestimmt werden, wenn die kumulativ permeierte (bzw. freigesetzte) Menge als Funktion der Zeit aufgetragen ist; t_L ist dabei der Schnittpunkt der J_{ss} mit der Zeitachse. Folglich gilt:

$$K_p = J_{ss} / C_0. \tag{13}$$

Die Permeationsrate durch die Haut hängt sehr stark von der Dicke ab. Während des *in-vitro*-Versuches in den *Franz*-Zellen kann das Hautstück mit einer bestimmten Fläche *A* (cm²) und Dicke *h* (cm) als ein Reservoir mit einem bestimmten Volumen angesehen werden, innerhalb dessen die Diffusion des Wirkstoffs hauptsächlich in die Richtung des Konzentrationsgradienten abläuft, im Fall der Franz-Zellen von oben nach unten (oder vom SC zur Dermis). Die entsprechenden Diffusionskoeffizienten innerhalb der Haut (D_s , cm²/h) können unter Verwendung der *Lag-time*-Methode bestimmt werden [99, 100]:

$$D_{\rm S} = h^2 / (6t_L). \tag{14}$$

Zusätzlich zur Formel (13) kann der steady-state-Flux auch wie folgt dargestellt werden [100]:

$$J_{\rm SS} = \left(D_{\rm S} \cdot P_{\rm S/V} C_{\rm D}\right) / h. \tag{15}$$

Aus den beiden Gleichungen (13) und (15) kann der Haut/Vehikel Verteilungskoeffizient kalkuliert werden:

$$P_{\rm S/V} = K_{\rm p} \cdot h \,/D_{\rm S} \,. \tag{16}$$

Wirkstofffreisetzung aus kosmetischen Formulierungen

Der Freisetzungsvorgang über eine künstliche Membran verläuft ähnlich zur Hautpermeation. Die steady-state-Periode kann ebenfalls mit dem ersten Fick'schen Gesetz beschrieben werden (Formeln (11)-(13)), so dass die Freisetzungskoeffizienten K_r (cm/h) analog kalkuliert werden können:

$$K_r = J_{\rm ss} / C_0. \tag{17}$$

Da die bei den Freisetzungsexperimenten verwendete künstliche Membranen in der Regel keine derart signifikante Barrieren wie die Haut darstellen, sind die Verzögerungszeiten t_{L} in der Regel sehr kurz und können vernachlässigt werden. Wenn die Freisetzungsrate zu Beginn des Versuchs sehr hoch ist, ist die scheinbare steady-state Periode ebenso kurz, was die Anwendung der Gleichung (17) entsprechend dem 1. Fick'schen Gesetz begrenzt, so dass die Koeffizienten *K*_r tatsächlich lediglich die anfängliche Freisetzungskoeffizienten sind. Das weitere Profil der Wirkstofffreisetzung aus kosmetischen Formulierungen lässt sich beispielsweise mit der kinetischen Modells von Hiquchi beschreiben [101]:

$$\frac{Q}{C_0} = 2\sqrt{\frac{D_v t}{\pi}},\tag{18}$$

 D_v ist der Diffusionskoeffizient innerhalb der Vehikel (cm²/h).

Beim Auftragen der kumulativen freigesetzten Menge, normalisiert mit der Ausgangskonzentration (Q/C_0) als Funktion der Quadratwurzel der Zeit, wird die Steigung der linearen Regression (K_H) wie folgt bestimmt:

$$K_H = 2\sqrt{\frac{D_v}{\pi}}.$$
(19)

Hieraus kann dann der D_v -Wert berechnet werden. Um die unter Verwendung des Higuchi-Modells berechneten Ergebnisse zu bewerten, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein anderes kinetisches Modell angewandt. Das Modell ist von Korsmeyer und Peppas vorgeschlagen worden [102] und wird beschrieben als anwendbar für verschiedene Systeme und Geometrien [103]:

$$Q/C_0 = K_K t^n.$$
⁽²⁰⁾

Wenn n = 0,5, verläuft der Wirkstofftransport in Übereinstimmung mit dem 1. Fick'schen Gesetz und die Freisetzungsrate ist zeitabhängig. Wenn 0,5 < n < 1, ist der Transport anomal, aber zeitabhängig; wenn n = 1, verläuft die Freisetzung unabhängig von der Zeit (nullter Ordnung) [102].

Durch das Auftragen der experimentellen Daten in den logarithmischen Koordinaten In (Q/C_0) gegen In t (Zeit) können der Koeffizient K_K und der Exponent n unter der Verwendung der linearisierten Gleichung (20) ermittelt werden:

$$\ln \left(Q/C_0 \right) = \ln K_{\mathcal{K}} + n \ln t. \tag{21}$$

3. Aufgabenstellung der Arbeit und Vorgehensweise

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Polyphenole mit einer hohen antioxidativen Aktivität in kosmetische Emulsionen einzuarbeiten, die Stabilität der Emulsionen und Polyphenole über der Zeit zu ermitteln und die Polyphenolfreisetzung, Hautpermeation und bioaktive Wirkung auf die Haut zu untersuchen, als Beitrag zum Verständnis der Freisetzung und Wirkung von natürlichen Antioxidantien in kosmetischen Applikationen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Repräsentanten der Substanzklassen, die in Weintrauben bzw. Traubentrester erhalten sind, untersucht. Diese Substanzen wurden hinsichtlich ihrer antioxidativen Aktivität und Lipophilität charakterisiert. Vor der Untersuchung der Hautpermeation wurde eine Methode zur Analyse der Polyphenole in der Schweinehaut entwickelt, die die Extraktion mit organischen Lösemitteln und eine HPLC-Analyse beinhaltet [104]. Außerdem wurde die geeignete Rezeptorflüssigkeit ausgewählt, in der die Testsubstanzen die maximale Löslichkeit aufweisen.

Die Freisetzung der Polyphenole aus Emulsionen mit unterschiedlichem Ölgehalt und die *in-vitro*-Hautpermeation wurden in Diffusionszellen nach *Franz* untersucht [105]. Zur Untersuchung der Hautpermeation wurde exzidierte Schweinehaut verwendet, für die Freisetzungsversuche kam eine Cellulosemembran zum Einsatz. Um die Freisetzungskinetiken zu beschreiben, wurden Modelle von Higuchi bzw. von Korsmeyer [101, 102] angewendet und miteinander verglichen. Die Hautpermeationsparameter wurden nach dem ersten Fick'schen Gesetz und nach der Lag-Zeit-Methode berechnet.

Die Emulsionsherstellung wurde hinsichtlich des Ölphasengehaltes, des Emulgators und des Polyphenolgehaltes variiert und die Auswirkung dieser Faktoren auf die Emulsionsstabilität, Rheologie (Konsistenz), Freisetzung und Lagerstabilität der Polyphenole untersucht.

Anschließend wurde eine Vehikel-kontrollierte Humanuntersuchung durchgeführt, in der die Auswirkung einer Polyphenol-haltigen Emulsion auf biophysikalische Hautparameter getestet wurde. Um mögliche Wechselwirkungen zu vermeiden, wurde im Rahmen dieser Studie nur eine Substanz, Resveratrol, in die zu testende Creme eingearbeitet, da Resveratrol als hoch potent für topische Anwendungen gilt [106]. Innerhalb von 8 Wochen applizierten 18 Probanden eine Resveratrol-haltige und eine Vehikel-Formulierung stets auf definierte Hautareale. Die Elastizität, Festigkeit, Rauheit und Feuchtigkeit der Haut vor und nach der Anwendung wurden verglichen.

4. Charakterisierung der Polyphenole

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Repräsentanten verschiedener Polyphenolklassen untersucht und in kosmetische Emulsionen eingearbeitet. Zum Einsatz kamen Flavanole (Catechin, Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)), Flavonole (Quercetin, Rutin), Stilbene (*trans*-Resveratrol) und Phenolsäuren (Protocatechusäure (PCA)) (Abb. 4.1). Im folgenden Kapitel ist die Charakterisierung dieser ausgewählten Polyphenole, die natürlich in Weintrauben bzw. Tee vorkommen, beschrieben, und zwar die Quantifizierung mittels HPLC, die antioxidativen Eigenschaften sowie die Lipophilität der Substanzen. Die antioxidativen Eigenschaften werden dabei als Radikalfängeraktivität sowie als Hemmung der Lipidoxidation dargestellt. Aus diesen Daten können Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob und in wieweit die jeweilige Substanz eine positive Wirkung auf die Haut ausüben kann. Die Lipophilität, hier durch den Octanol-Wasser Verteilung Koeffizient bestimmt, ist ein wichtiger Faktor für die Hautpermeation von Wirkstoffen.

4.1. HPLC-Analyse

Abb. 4.1 zeigt die Absorptionsspektren der verwendeten Polyphenole. Alle untersuchten Substanzen zeigen ein Absorptionsmaximum bei 230 nm, das auf die phenolischen Ringe zurück zu führen ist. Flavanole (Catechin und EGCG) weisen ein zweites charakteristisches Maximum zwischen 275 und 280 nm auf, und Flavonole (Quercetin und Rutin) haben Absorptionsmaxima bei 256 und zwischen 355 und 371 nm.



Abb. 4.1. UV-Spektren und chemische Strukturen von der untersuchten phenolischen Verbindungen

Basierend auf den ähnlichen Absorptionsmaxima phenolischer Gruppen, wurden für die Quantifizierung drei Wellenlängen ausgewählt (Tabelle 4.1). Nach Variation von Eluentengradienten wurde die im Kap. 8.1.1 beschriebenes HPLC-Programm ausgewählt (Tabelle 8.1), da dieses eine gute Trennung aller Testsubstanzen und relativ kurze Messdauer gewährleistet (Abb. 4.2).



Abb. 4.2. HPLC-Chromatogramm von untersuchten Polyphenolen bei 279 nm. 1: Protocatechusäure (PCA); 2: Catechin; 3: Epigallocatechingallat (EGCG); 4: Rutin; 5: Resveratrol; 6: Quercetin

Tabelle 4.1 zeigt die Quantifizierungsparameter der einzelnen Polyphenole.

Substanz	Messwellen- länge [nm]	Retentionszeit, [min]	Korrelations- koeffizient* r ²	LOD ^a [µg·mL ⁻¹]	LOQ [♭] [µg·mL ⁻¹]
PCA	254	4,64	0,9994	0,164	0,395
Catechin	279	5,77	0,9974	0,304	0,466
EGCG	279	6,82	0,9921	0,389	0,655
Rutin	254	8,18	0,9987	0,063	0,207
Resveratrol	306	11,45	0,9989	0,108	0,226
Quercetin	254	12,54	0,9964	0,165	0,343

Tabelle 4.1. Validierungsdaten der HPLC-Methode [104]
--	---

* 6-Punkt Kalibrierung, n = 4;

^a Nachweisgrenze (limit of detection), LOD = b + 3s; ^b Bestimmungsgrenze (limit of quantitation), LOQ = b + 10s; b, Blindwert; s, Standardabweichung von Blindwert, n = 4

4.2. Antioxidative Eigenschaften der Polyphenole

Die antioxidativen Eigenschaften der Polyphenole wurden mittels zweier Methoden gemessen, und zwar in einem ABTS-Assay für Radikalfängeraktivität (Kap. 8.1.2) und in einem Rancimat-Test für die Aktivität gegen Lipidoxidation (Kap. 8.1.3). Das erste Assay repräsentiert die Wirkung von Polyphenolen auf reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die in der Haut durch UV-Strahlung entstehen können. Der zweite Test ist ein Maß für eine mögliche schützende Wirkung auf Hautlipide, insbesondere in der SC, sowie eine schützende Wirkung auf die Ölkomponente der Formulierung gegen Oxidation.

Tabelle 4.2 präsentiert die IC_{50} Werte der einzelnen Polyphenole sowie die entsprechenden TEAC-Werte (Trolox equivalent antioxidant capacity), da Trolox, das wasserlösliche Vitamin E-Derivat, in der Literatur als Standard-Antioxidant gilt [107].

Substanz	IC₅₀ [*] [µg/ml]	MW [g/mol]	IC ₅₀ *[μM]	TEAC* [μM Trolox/μM]
EGCG	1,017 ± 0,002	458,4	2,22 ± 0,00	6,05 ± 0,11
Quercetin	1,12 ± 0,08	302,2	3,71 ± 0,28	3,62 ± 0,28
Catechin	1,18 ± 0,01	290,3	4,06 ± 0,04	3,31 ± 0,07
Resveratrol	1,21 ± 0,04	228,2	5,29 ± 0,16	2,54 ± 0,09
PCA	1,75 ± 0,06	154,1	11,37 ± 0,38	$1,18 \pm 0,04$
Rutin	6,69 ± 0,22	610,5	11,40 ± 0,36	1,18 ± 0,04
Trolox	3,362 ± 0,003	250,3	13,43 ± 0,24	1,00

Tabelle 4.2. Radikalfängeraktivität der untersuchten Polyphenole, ermittelt im ABTS-Assay [104] (mod.)

* Mittelwert ± SD, n = 3

Alle untersuchten Verbindungen zeigten im ABTS-Assay höhere Radikalfängeraktivitäten als Trolox. Die höchste Aktivität wurde für EGCG, gefolgt mit Quercetin und Resveratrol ermittelt. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Daten von Medvedovic-Kosanovic et al. [108] und sind als Beleg zu werten, dass die untersuchten Polyphenole hoch potente antioxidativ wirksame Substanzen sind.

Die Radikalfängeraktivität von polyphenolischen Pflanzenextrakten wurde in mehreren Studien untersucht und mit dem Gesamtpolyphenolgehalt korreliert [4, 66, 109]. Einzelne Polyphenole weisen jedoch unterschiedliche Radikalfängeraktivität und Aktivität gegenüber Lipidoxidation auf (Tabelle 4.2, Abb. 4.3). Dies ist an die Strukturunterschiede zurückzuführen und hängt hauptsächlich von der Kapazität der Substanzen ab, als Protondonator zu agieren. Diese Aspekte wurden in der im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Veröffentlichung genauer diskutiert [104].

Die Hemmung von Lipidoxidation wurde im *Rancimat*-Test bei der Messung der Induktionsperiode von Oxidation des Sonnenblumenöls mit der Zugabe von der Testsubstanz (0,1% wt.) im Vergleich zu reinem Öl bestimmt (Kap. 8.1.3). Die entsprechenden antioxidativen Indizes (*AI*) sind in Abb. 4.3 dargestellt. Alle Substanzen zeigten eine Verlängerung der Induktionsperiode von Sonnenblumenöl, besonders Catechin, EGCG und Quercetin. Für Resveratrol und Rutin war diese Verlängerung jedoch nicht signifikant.



Abb. 4.3. Antioxidative Indizes von Polyphenolen, ermittelt im Rancimat-Test, Mittelwerte ± SD, n = 3. * Signififikant unterschiedlich von der Kontrollprobe (reines Öl)

Verschiedene Assays zur Bestimmung der antioxidativen Wirkung von phenolischen Verbindungen korellieren nicht immer unter einander, da sie auf unterschiedlichen Wirkmechanismen basieren. Es konnte beispielsweise keine Korrelation zwischen den Rancimat- und ABTS-Aktivitäten festgestellt werden. Die hohe Temperatur bei dem Rancimat-Test (100 °C) ist kritisch für thermolabile Substanzen. Somit können die Polyphenole bei der Testtemperatur teilweise zerstört werden, was zu einer Aktivitätsabnahme führt.

In der Studie von Schwarz et al. [109] wurde beispielsweise eine negative Korrelation zwischen dem Polyphenolgehalt im Rosmarinextrakt und der Aktivität gegen Lipidoxidation beobachtet, was die thermische Zerstörung bestätigt. Darüber hinaus könnte bei der Inhibition der Lipidoxidation die Lipophilität der Wirksubstanzen eine Schlüsselrolle spielen, da eine bessere Öllöslichkeit zu einer besseren Diffusion zum Wirkungsort beitragen kann [110].

4.3. Oktanol-Wasser Verteilung

Die Lipophilität von Stoffen kann als Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (*log* P_{OW}) angegeben werden. Wenn die untersuchenden Moleküle ionisierbare Gruppen enthalten, werden oft Oktanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten (*log* D_{pH}) in Abhängigkeit vom pH-Wert bestimmt [11, 111, 112]. Verteilungen zwischen Octanol und Pufferlösungen mit verschiedenen pH-Werten, nämlich 7,4 (natürlicher pH-Wert des Blutes), 5,5 (pH an einigen Stellen der Hautoberfläche) wurden mit Octanol-Wasser Verteilungskoeffizienten verglichen (Abb. 4.4). Die höchste Lipophilität weisen Resveratrol und Quercetin auf, die geringste Lipophilität zeigen Rutin und PCA. Letzteres ist bei pH 7,4 besonders ausgeprägt.



Abb. 4.4. Octanol-Wasser und Oktanol-Puffer Verteilungskoeffiziente ($log P_{OW}$, $log D_{pH}$) (MW ± SD, n = 3) von Polyphenolen bei 25 °C. * Signifikant abweichend von den entsprechenden $log P_{OW}$ -Werten (zweiseitiger t-Test, p = 0.95) [104]

Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit anderen Studien [11, 111], in denen Quercetin als mehr lipophil und Rutin als mehr hydrophil im Vergleich zu Catechin beschrieben wurden.

Octanol-Wasser und Octanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten, die in nicht-ionisierten und ionisierten Systemen ermittelt werden, stehen miteinander in Zusammenhang gemäß der Gleichungen (22) für Säuren und (23) für Basen [112]:

$$\log D_{pH} = \log P_{OW} + lg (1/(1+10^{pH-pKa})),$$
(22)

$$\log D_{pH} = \log P_{OW} + lg (1/(1+10^{pKa-pH})).$$
(23)

Polyphenole sind schwache Säuren. PCA ist mit einem pKa-Wert von 4,48 die stärkste von ihnen, die anderen Substanzen liegen in ihren pKa-Werten deutlich darüber (Tabelle 4.3). Dies erklärt die Veränderungen der Verteilungskoeffizienten mit wechselnden pH-Wert. Die hydrophilen leicht sauren Polyphenole sind besser löslich im Puffer mit dem höheren pH-Wert (7,4) als bei pH 5,5. Die Verteilungskoeffizienten von stark lipophilen Quercetin und Resveratrol ändern sich durch die Änderung des pH-Wertes des Puffers nicht signifikant, wahrscheinlich, weil sie in wässrigen Lösungen kaum löslich sind, so dass der pH-Wert des wässrigen Mediums ihre Verteilung nicht wesentlich beeinflusst.

Substanz	рКаı	Quelle
PCA	4,48	[113]
Quercetin	6,74	[113]
Rutin	7,1	[113]
EGCG	7,75	[114]
Catechin	8,64	[113]
Resveratrol	8,8	[115]

Tabelle 4.3. Säurekonstanten (pKa) von untersuchten Polyphenolen

Zwischen den antioxidativen Indizes (*AI*, Abb. 4.3) und der Lipophilität der Moleküle (*log* P_{ow} bzw. *log* D_{pH}) wurde jedoch keine Korrelation beobachtet. Dies steht im Gegensatz zu den Arbeiten von Viskupicova et al. [110]. Dabei wurde, vergleichbar mit unseren Ergebnissen, eine geringe antioxidative Aktivität von Rutin festgestellt. Allerdings bewirkten die Rutinderivate (Fettsäureester C4-C18) eine zunehmende Induktionsperiode von Sonnenblumenöl mit steigender Lipophilität des Moleküls. Da die hier untersuchten phenolischen Verbindungen nicht zu einer homologen Reihe gehören, sind Unterschiede in ihren antioxidativen Eigenschaften durch stärkere Veränderungen der Molekülstrukturen bedingt [104]. Daher ist es nicht überraschend, dass keine Korrelation zwischen der Lipophilität und der antioxidativen Aktivität festgestellt wurde.

5. Permeation und Freisetzung

5.1. Vorbereitung der in-vitro Untersuchungen

Vor der Durchführung von *in-vitro* Untersuchungen zur Wirkstofffreisetzung und Hautpermeation musste ein Rezeptorfluid ausgewählt werden, das für die untersuchten phenolischen Verbindungen geeignet ist. Nach den Hautpermeationsuntersuchungen ist es in der Regel wünschenswert, die Wirkstoffverteilung in den Hautschichten zu bestimmen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur Extraktion der Polyphenole aus der Schweinehaut optimiert.

5.1.1. Auswahl der Rezeptorflüssigkeit

Die Zusammensetzung des Rezeptorfluids sollte die Permeation von Testsubstanzen durch die Membran oder Haut nicht beeinflussen, eine Rückpenetration muss ebenso ausgeschlossen werden [14]. Für hydrophile Stoffe wie Catechine wird häufig eine NaCl-Lösung (evtl. gepuffert bei pH 7,4) verwendet, um den natürlichen pH-Wert von Blut zu simulieren [11, 14, 116]. Aufgrund der sehr geringen Löslichkeit von Quercetin und Resveratrol in Wasserlösungen, waren aber Salzlösungen für unsere Untersuchungen nicht geeignet. Im Fall von lipophilen Substanzen, werden zu Rezeptorflüssigkeit beispielsweise Serumalbumin oder nicht-ionische Tenside zugesetzt, um die Testsubstanzen besser zu solubilisieren [14]. Rezeptormedien, die auf Ethanol-Wasser oder Ethanol-Puffer (pH 7,4)-Mischungen basieren, werden beispielsweise zur Bestimmung der transdermalen Verabreichung von Resveratrol eingesetzt [106]. Phosphat-Puffer (pH 7,6, 0,1 M), mit Zugabe von Tween 20 wurde in der Studie von Casagrande et al. [117] als Rezeptorlösung bei der Untersuchung der Hautpermeation von Quercetin ausgewählt.

Um ein geeignetes Aufnahmemedium zu finden, wurden die Sättigungskonzentrationen von Quercetin und Resveratrol in verschiedenen Lösungen untersucht. Als Emulgatoren wurden Rinderserumalbumin (BSA), Polyoxyethylensorbitan-monolaurat (Tween 20) und Polyoxyethylensorbitan-monopalmitat (Tween 40) verwendet. Als Lösungsmittel wurden Wasser, phosphatgepufferte (0,1 M) NaCl-Lösung (PBS, pH 7,4, 9 g/L NaCl) oder 9 g/L NaCl Wasserlösung, mit und ohne Zugabe von 50 % (v/v) Ethanol eingesetzt (Tabelle 5.1).

Zusammensetzung der Rezeptorflüssigkeit		Löslichkeit ^ª , mg/mL				
		Wasserl	Wasserlösungen		Gemisch mit Ethanol 1:1 (v:v)	
		Quercetin	Resveratrol	Quercetin	Resveratrol	
	ohne Puffer	n.a.	n. a.	0,40 ± 0,04	12,5 ± 0,9	
Ohne	PBS, pH 7,4	(6,5 ± 0,8)·10 ⁻⁵	$(3,1\pm0,8)\cdot10^{-4}$	0,94 ± 0,04	16,1 ± 0,3	
Lindigator	NaCl, 9 g/L	(1,5 ± 0,5)·10 ⁻⁴	$(3,9 \pm 0,0) \cdot 10^{-4}$	0,78 ± 0,01	16,6 ± 0,4	
	ohne Puffer	0,043 ± 0,004	0,04 ± 0,01	n. a.	n. a.	
BSA, 1 σ/Ι	PBS, pH 7,4	0,022 ± 0,007	0,030 ± 0,008	1,21 ± 0,02	18,38 ± 0,05	
1 6/ L	NaCl, 9 g/L	0,059 ± 0,004	0,107 ± 0,006	n. a.	n. a.	
	ohne Puffer	0,028 ± 0,002	0,18 ± 0,01	1,68 ± 0,07*	40,2 ± 0,4*	
Iween 20, 5 g/l	PBS, pH 7,4	0,028 ± 0,002	0,117 ± 0,003	$1,10 \pm 0,01$	14,3 ± 0,3	
58/5	NaCl, 9 g/L	0,009 ± 0,001	0,11 ± 0,01	0,97 ± 0,03	16,4 ± 0,2	
	ohne Puffer	0,019 ± 0,000	0,119 ± 0,008	0,51 ± 0,02	13,7 ± 0,6	
lween 40, 5 م/ا	PBS, pH 7,4	0,012 ± 0,001	0,083 ± 0,003	1,34 ± 0,03	14,8 ± 0,7	
	NaCl, 9 g/L	0,016 ± 0,003	0,119 ± 0,009	0,76 ± 0,01	17,7 ± 0,3	

Tabelle 5.1. Löslichkeit von Quercetin und Resveratrol

^aMittelwert ± SD, n=3; n. a. – nicht analysiert;

*maximale Löslichkeit

In wässrigen Lösungen ist Quercetin ohne Zugabe eines Emulgators unlöslich und Resveratrol nur gering löslich. Der Zusatz von BSA, Tween 20 oder Tween 40 verbessert die Löslichkeit der beiden Substanzen in Wasser-, PBS- und NaCl-Lösungen. Allerdings ist diese Erhöhung nicht ausreichend für eine geeignete Rezeptorflüssigkeit. Unter der Annahme, dass die Wirkstoffkonzentration in der Testformulierung etwa 1 mg/ml ist und die Auftragsmenge zur Bestimmung von Permeationskonstanten ca. 2 ml beträgt, ist mit einer Konzentration von permeierenden Substanzen im Rezeptorkammer mit dem Volumen von 20 ml bis zu 0,1 mg/mL zu rechnen. Da die Konzentration von permeierten Testsubstanzen nicht mehr als 10 % der Sättigungskonzentration betragen sollte, um eine Limitierung durch eine Rückdiffusion zu vermeiden [14], sollte die Löslichkeit der Polyphenole im Rezeptorfluid nicht niedriger als 1 mg/mL sein.

Durch die Zugabe von 50 % (v/v) Ethanol zu den Lösungen wurde die Löslichkeit beider Substanzen deutlich verbessert. In allen ethanolischen Gemischen war die Löslichkeit von Resveratrol höher als 12 mg/mL, die 10-fach über der geforderten Konzentration lag. Die Löslichkeit von Quercetin war in allen Ethanol-PBS-Mischungen mit Emulgatoren sowie in der nicht-gepufferten Wasser-Ethanol-Mischung mit Tween 20 höher 1 mg/mL. Anzumerken ist, dass die Zugabe von Albumin als Emulgator zur Bildung eines unlöslichen Niederschlags führte, offensichtlich aufgrund einer Denaturierung des Proteins unter dem Einfluss der ethanolischen Salzlösung. Da ein Niederschlag die HPLC-Analyse beeinträchtigen könnte, wurde keine BSA-Lösung als Rezeptorflüssigkeit verwandt, trotz der relativ hohen Löslichkeit beider Testsubstanzen in dieser Mischung. Die maximale Löslichkeit sowohl von Quercetin als auch von Resveratrol wurde im nicht-gepufferten Wasser-Ethanol-Gemisch mit Tween 20 beobachtet. In diesem Gemisch betrug die Löslichkeit von Rutin 5,4 \pm 0,1 mg/mL. Die Löslichkeit anderer Substanzen lag bei über 200 mg/mL. Daher wurde dieses Lösungsmittel als Rezeptorflüssigkeit für folgende Permeations- und Freisetzungsexperimenten ausgewählt.

5.1.2. Extraktion von Polyphenolen aus der Schweinehaut

Vor der Bestimmung der Wirkstoffverteilung in den Hautschichten nach *in-vitro* Permeationsexperimenten musste eine analytische Methode angepasst werden. Obwohl in der Literatur einige Methoden der Polyphenolextraktion beschrieben sind, gelang keine einfache Übertragung dieser Methoden, vor allem aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der verwendeten phenolischen Substanzen und deren unterschiedlichen Löslichkeiten. Dal Belo et al. [118] extrahierten beispielsweise Quercetin und EGCG aus der menschlichen Haut mit reinem Methanol. Das Lösungsgemisch, das Frauen et al. [119] für die Extraktion hydrophiler Grüntee-Polyphenole aus Schweinehaut einsetzen, enthielt 40 % Wasser. Somit war für die vorliegende Arbeit zu identifizieren, mit welchem Lösemittel die Polyphenole am besten aus der Haut extrahiert werden können.

In dieser Arbeit wurden die Wiederfindungsraten (WFR) nach einer definierten Zugabe von Polyphenolen in die Schweinehaut untersucht. Dafür wurden methanolische Stammlösungen von Polyphenolen in die Haut injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 2 h wurde die Haut mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert, dabei wurde die Zerkleinerungsmethode und Homogenisierungsintensität variiert (Tabelle 5.2).

Zusammensetzung der Extraktionslösung			Extraktionsparameter		
Nr.	MeOH/ Wasser (v/v)	Ascorbinsäure [g/L]	Zerkleinerungsmethode / Dauer	Ultraschallbad	
			Ultra-Turrax bei 18.000 rpm:		
1	100:0	0	50 s	15 min	
2	90:10	0	50 s	15 min	
3	80:20	0	50 s	15 min	
4	70:30	0	50 s	15 min	
5	90:10	0.2	50 s, N ₂ -Atmosphäre	15 min	
6	90:10	0.2	50 s	15 min	
7	90:10	0.2	20 s	15 min	
8	90:10	0.2	Schneiden mit Skalpell; Schütteln 1 h	15 min	
			Kryo-Mühle / Schütteln		
9	90:10	0.2	2 min / 0.5 h	15 min	
10	90:10	0.2	3 min / 0.5 h	15 min	
11	90:10	0.2	4 min / 0.5 h	15 min	
12	90:10	0.2	5 min / 0.5 h	15 min	

Tabelle 5.2. Variation der Parameter bei der Extraktion der Schweinehaut [104]

Zur Identifikation des geeigneten Lösungsmitteln für die Extraktion von sowohl hydrophober (Quercetin, Resveratrol) als auch hydrophiler Polyphenole, wurde die Polarität des Extraktionslösungsmittel durch Variation des Wasser-Methanol-Verhältnis variiert. Bei einer Erhöhung von Wasserkonzentration im Lösungsmittel ohne Einsatz von Ascorbinsäure von 0 bis 30 % (vol.) (Versuche Nr. 1-4, Abb. 5.1) wurden die höchste Gesamtwiederfindungen sowie die höchsten WFR einzelner Polyphenole bei einem Wassergehalt von 10 und 20 vol. % beobachtet (Versuche Nr. 2 und 3; gesamte WFR von 35%), ohne signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Experimenten. Die einzige Ausnahme war das hydrophobe Quercetin, für das nur eine WFR von max. 31% bei der Extraktion mit absolutem Methanol ermittelt werden konnte. Die Erhöhung des Wassergehalts bis zu 30 vol. % führte zu einem Rückgang von Extraktionsausbeuten, insbesondere für Catechin, Resveratrol, Quercetin und EGCG (Versuche Nr. 4, Abb. 5.1). Daher wurde ein weiterer Anstieg der Wasserkonzentration in der Extraktionslösung nicht untersucht.



Abb. 5.1. Wiederfindungsraten (WFR) der gesamten Phenole und Verteilung einzelner Polyphenole, extrahiert aus Schweinehaut bei der Variation der Zusammensetzung von Lösungsmittel, Mittelwert ± SD, n = 3. Die Versuchsnummern (Nr.) sind der Tabelle 5.2 zu entnehmen; Theor.: theoretische WFR (100%). Die Proben wurden mit Ultraturrax bei 18.000 rpm für 50 sec homogenisiert und im Ultraschallbad für 15 min behandelt [104]

Auffallend sind die geringen Ausbeuten von EGCG (unter 9%), vermutlich aufgrund der hohen oxidativen Instabilität. Aus diesem Grund wurde in weiteren Versuchen L-Ascorbinsäure als Antioxidationsmittel [119] zu dem Methanol-Wasser-Gemisch (90:10, v/v) zugegeben (Versuch Nr. 6, Abb. 5.1). Außerdem wurde ein Versuch unter partiellem Sauerstoffausschluss durchgeführt, mit dem Ziel, die Oxidation der Polyphenole während der Extraktion zu reduzieren. Hierzu wurden die Hautproben während der Inkubation und der folgenden Extraktion mit Stickstoff überschleirt (Versuch Nr. 5).

Die Zugabe von L-Ascorbinsäure erhöhte die WFR erheblich, vor allem für Quercetin (um 31 %) und Resveratrol (um 12 %) sowie EGCG (um 5 %), mit gleichzeitiger Erhöhung der Gesamtwiederfindung um 6 % (Nr. 6 vs. Nr. 2, Abb. 5.1), was auf eine protektive Wirkung von Ascorbinsäure auf Polyphenole hindeutet. Der partielle Ausschluss von Luftsauerstoff durch die Probenvorbereitung unter Stickstoffatmosphäre (Versuch Nr. 5) führte zu einer weiteren Erhöhung von Gesamt-WFR um 10 %, mit einer erheblichen Steigerung der Ausbeuten von Quercetin und PCA, was den Einfluss der Oxidation bestätigte. Gleichzeitig nahm die Ausbeute von Catechin ab. Für Resveratrol und EGCG wurden keine wesentlichen Änderungen bei der Extraktion unter Luftausschluss beobachtet.

Für die weitere Optimierung wurde das mit 0,2 g/L L-Ascorbinsäure versetzte Methanol-Wasser-Gemisch 90:10 (v/v) ausgewählt. Auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse, war zu überprüfen, ob die geringen Wiederfindungsraten auf eine unzureichende Zerkleinerung der Hautproben zurück zu führen waren. Eine ausreichende Zerstörung von Zellen, in denen die Wirkstoffe verteilt sind, ist eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Extraktion von Wirkstoffen aus dem Zellgewebe. Daher wurde im Weiteren die Zerkleinerungsmethode und -dauer variiert (Abb. 5.2).



Abb. 5.2. Wiederfindungsraten (WFR) der gesamten Phenole und Verteilung einzelner Polyphenole, extrahiert aus Schweinehaut bei der Variation der Zusammensetzung von Lösungsmittel, Mittelwert \pm SD, n = 3. Die Versuchsnummern (Nr.) sind der Tabelle 5.2 zu entnehmen; Theor.: theoretische WFR (100%). Die Proben wurden mit Methanol-Wasser Mischung (90:10, v/v) mit 0,2 g/L Askorbinsäure extrahiert. Ultra-Turrax: 18.000 rpm; Kryo-Mühle: 25 1/s. Alle Proben wurden im Ultraschallbad für 15 min behandelt [104]

In den Versuchen Nr. 6 und 7 wurden die Proben nach der Zugabe von Lösungsmittel mit einem Ultra-Turrax bei 18.000 rpm für 50 und 20 s zerkleinert. Beim Versuch Nr. 8 wurden die Hautstücke lediglich mit einem Skalpell geschnitten und nach der Lösungsmittelzugabe 1 h bei 300 rpm geschüttelt (Abb. 5.2). Nach 50 s Homogenisierung wurde eine höhere Polyphenolausbeute beobachtet, allerdings ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchen 6, 7 und 8. Die WFR von Gesamtpolyphenolen lagen für 20 s und 50 s Dispergierungszeit und ohne Dispergierung bei 41,4 \pm 3,0 %; 36,6 \pm 4,8 % und 38,3 \pm 3,5. Überraschenderweise war die Polyphenolausbeute ohne Dispergieren (Versuch Nr. 8) nahezu identisch mit den der anderen zwei Versuche. Dies deutet darauf hin, dass eine ausreichende Zerstörung der Hautzellen durch den Einsatz von Ultra-Turrax nicht erreicht werden konnte und eine alternative Zerkleinerungsmethode bei der Probenvorbereitung erforderlich ist.

Ein solches Verfahren bietet die Kryo-Mühle, bei dem ein sehr weitgehendes Zermahlen der Proben nach Einfrieren bei -196 °C mit flüssigem Stickstoff schonend und effektiv stattfindet. Da der Zerkleinerungsgrad von der Frequenz und Mahldauer abhängt, wurde die Mahldauer zwischen 2 und 5 min bei einer höchstmöglichen Frequenz von 25 s⁻¹ (Abb. 5.2, Nr. 9-12) variiert. Bereits nach 2-minütigem Mahlen stieg die Polyphenolausbeute (WFR der gesamten Polyphenole) auf 51,2 ± 7,5 %, weshalb diese Art von Zermahlen als effektive Alternative zum Ultra-Turrax betrachtet werden kann. Mit zunehmender Mahldauer wurde eine weitere Erhöhung der Polyphenolausbeuten beobachtet. Das Maximum der WFR wurde für die Extraktion nach dem 4-min Mahlen erreicht (76,3 ± 7,8 %, Versuch Nr. 11) und konnte auch durch 5-min Mahlen nicht weiter gesteigert werden. Offensichtlich war mit der Kryo-Mühle nach dieser Zeit kein weiterer Zerkleinerungsgrad mehr möglich. Die Wiederfindung einiger Polyphenole stieg sogar auf Werte von 90 bis 100 % an (PCA, Rutin, Resveratrol, Quercetin). Diese Bedingungen wurden daher für die Analyse der Wirkstoffverteilung in den Hautschichten bei den weiteren Permeationsuntersuchungen ausgewählt.

5.2. Wirkstofffreisetzung

Im Folgenden ist die Untersuchung der Wirkstofffreisetzung aus zwei Emulsionen mit unterschiedlichem Ölgehalt beschrieben. Die Testemulsionen wurden entsprechend Kapitel 8.2.1 (2) nach den Rezepturen aus Tabelle 5.3 hergestellt.
	Formulierung	Anteil, S	% (w/w)
Phase	Komponent	E1 (o/w Verhältnis 50/50)	E2 (o/w Verhältnis 25/75)
А	Wasser	ad 100	ad 100
А	Glycerin	3.0	3.0
А	Dermosoft 1388	2.0	2.0
А	Xanthan gum	0.2	0.2
В	Symbiomuls GC	10.0	5.0
В	Traubenkernöl	13.33	6.67
В	Mittelkettige Triglyceride	13.33	6.67
В	Myristylmyristat	13.33	6.67
С	Polyphenole* (Gesamtgehalt)	0.6	0.6

Tabelle 5.3 Zusammensetzung der untersuchten Emulsionen [105]

* PCA, EGCG, Catechin, Rutin, Resveratrol, Quercetin in gleichen Anteilen.

Die Freisetzungsprofile der Polyphenole aus den Emulsion mit einem Öl-Wasser-Verhältnis von 50:50 und 25:75 (E1 und E2, Tabelle 5.3) sind in Abb. 5.3 bzw. in Abb. 5.4 dargestellt.



Abb. 5.3. Kinetik der Polyphenolfreisetzung aus der Emulsion E1 mit Öl/Wasser-Verhältnis 50/50 (w w). Kumulierte freigesetzte Menge durch eine Flächeneinheit (Q, μ g/cm²), bezogen auf die Ausgangskonzentration (C₀ = 0,96 ± 0,06 μ g/ml), Mittelwerte ± SD, n = 3 [105]



Abb. 5.4. Kinetik der Polyphenolfreisetzung aus der Emulsion E2 mit Öl/Wasser-Verhältnis 25/75 (w w). Kumulierte freigesetzte Menge durch eine Flächeneinheit (Q, μ g/cm²), bezogen auf die Ausgangskonzentration (C₀ = 0,98 ± 0,12 μ g/ml), Mittelwerte ± SD, n = 3

Aus den Abbildungen ist ersichtlich, dass die Freisetzung für jede Substanz und jede Emulsion unterschiedlich schnell verläuft. Die Freisetzung aus der Emulsion E2 mit niedrigerem Ölgehalt erfolgte etwas schneller als aus der Emulsion E1, wobei der Trend der Substanzreihenfolge gleich blieb. Die Grafiken wurden zur Berechnung von anfänglichen Freisetzungskoeffizienten *K*_r nach Gl. (17) verwendet (Tabelle 5.4). Die höchsten Raten der anfänglichen Freisetzung wurden für PCA und Catechin, die niedrigsten - für Quercetin ermittelt.

	K _r ·10 ² [cm·h ⁻¹]*			
	Emulsion E1	Emulsion E2		
PCA	7,19 ± 0,30	11,76 ± 0,05		
Catechin	5,18 ± 0,12	7,53 ± 0,06		
EGCG	3,80 ± 0,12	4,48 ± 0,02		
Resveratrol	3,02 ± 0,10	3,84 ± 0,01		
Rutin	1,65 ± 0,07	2,18 ± 0,02		
Quercetin	0,61 ± 0,04	0,58 ± 0,04		

Tabelle 5.4. Koeffizienten der anfänglichen Freisetzung von Polyphenolen aus Emulsionen mit Öl-Wasser Verhältnis von 50/50 (E1) und 25/75 (E2) [105] (mod.)

* K_r, anfänglicher Freisetzungskoeffizient , Gl. (17), Mittelwerte ± SD, n = 3

Die Koeffizienten *K*_r (Tabelle 5.4) sind ein Maß für den anfänglichen linearen Anstieg der Freisetzungskurven. Der weitere Kurvenverlauf war nicht linear, was damit zu erklären ist, dass die weitere Freisetzung durch die Diffusionsgeschwindigkeit innerhalb der Formulierung limitiert wird. Dies gilt vor allem dann, wenn die Formulierung hoch viskos ist und nicht kontinuierlich gerührt wird [15], wie in unserem Fall. Um das komplette Freisetzungsprofil beschreiben zu können, wurde überprüft, ob die Daten mit den Gleichungen von Higuchi oder Korsmeyer (Gl. (18), (20), [101, 120]) beschrieben werden können. Damit könnte ein kinetisches Modell zur Beschreibung des zeitabhängen Freisetzungsprozesses ermittelt werden.

In Abb. 5.5 sind daher die freigesetzten Mengen an Polyphenolen über der Quadratwurzel der Zeit dargestellt. Diese Darstellung wird für die Ermittlung der Higuchi-Koeffizienten K_H als Steigung der entsprechenden Regrassionsgeraden (Kapitel 2.5.4, Gl. (18)) verwendet. Die dabei erhaltenen Koeffizienten wurden zur Berechnung der Diffusionskoeffizienten D_v der Polyphenole innerhalb der Emulsionen (Gl. (19)) herangezogen.



Abb. 5.5. Anpassung von kumulativ freigesetzten Mengen (Q/C₀) an das kinetische Modell von Higuchi [105]

Abb. 5.6 zeigt die Linearisierung der Korsmeyer-Gleichung (Gl. (21)). Auf Grundlage dieser Graphen konnten die Korsmeyer-Koeffizienten K_{κ} und des Exponenten *n*, durch die eine Bewertung des Transportmechanismus möglich ist, gemäß Kapitel 2.5.4 bestimmt werden.



Abb. 5.6. Anpassung von kumulativ freigesetzten Mengen (Q/C0) an kinetisches Modell von Korsmeyer [105]

Tabelle 5.5 zeigt die kinetischen Parameter, die aus den Kurven in Abb. 5.5 und in Abb. 5.6 für die Emulsionen mit zwei unterschiedlichen Öl-Wasser-Verhältnissen (50/50 und 25/75, E1 und E2, Tabelle 5.3) bestimmt wurden. Die anfänglichen Freisetzungskoeffizienten K_r (Tabelle 5.4) nahmen für die einzelnen Substanzen von PCA zu Quercetin ab. Aus den Koeffizienten K_H und K_K , die nach den kinetischen Modellen von Higuchi und Korsmeyer bestimmt wurden, sind ebenso höhere Freisetzungsraten für PCA und Catechin im Vergleich zu Rutin und Resveratrol ersichtlich.

Die Koeffizienten K_r und K_K beschreiben die anfängliche Freisetzung aus der Emulsion. Dabei ist K_r die Steigung des linearen Teils der kinetischen Kurve und K_K die Steigung der Tangente zur kinetischen Kurve. Daher korrelieren diese beiden Koeffizienten miteinander. Die Koeffizienten von Higuchi K_H beschreiben den weiteren Freisetzungsverlauf und werden für die Berechnung des Diffusionskoeffizienten innerhalb der Formulierung D_v verwendet. Aus einem Vergleich von D_v und K_r ist beispielsweise sichtbar, dass, obwohl PCA zu Anfang viel schneller aus der Formulierung freigesetzt wurde, die Diffusionsrate von Catechin innerhalb der Formulierung nahezu so hoch (Emulsion 1) oder höher (Emulsion 2) war wie die von PCA.

		Korsmeyer-Kinetik**					
	К _н ∙10 ² [cm∙h ^{-0.5}]а	Achsen- abschnitt [h ^{-0.5}]	R ²	$D_V \cdot 10^3 [cm^2 \cdot h^{-1}]$	$K_{\kappa} \cdot 10^2 [cm \cdot h^{-n}]$	n	R ²
Emulsion E							
PCA	8,19 ± 0,03	0,25	0,999	5,27 ± 0,04	5,92 ± 0,11	0,67	0,997
Catechin	8,03 ± 0,02	0,32	0,998	5,07 ± 0,02	5,20 ± 0,07	0,73	0,994
EGCG	7,49 ± 0,03	0,45	0,996	4,41 ± 0,04	3,85 ± 0,13	0,84	0,994
Resveratrol	4,81 ± 0,06	0,51	0,999	1,82 ± 0,05	2,75 ± 0,04	0,81	0,992
Rutin	3,60 ± 0,07	0,37	0,996	1,02 ± 0,04	1,66 ± 0,10	0,90	0,993
Quercetin	1,64 ± 0,07	0,70	0,987	0,21 ± 0,02	0,49 ± 0,04	1,14	0,995
Emulsion E	2						
PCA	10,6 ± 0,2	0,23	0,997	8,83 ± 0,34	7,84 ± 0,08	0,65	0,999
Catechin	10,9 ± 0,2	0,33	0,998	9,42 ± 0,27	6,86 ± 0,02	0,75	0,994
EGCG	10,5 ± 0,2	0,56	0,994	8,69 ± 0,30	4,85 ± 0,02	0,84	0,999
Resveratrol	6,2 ± 0,1	0,55	0,996	3,07 ± 0,11	3,51 ± 0,01	0,83	0,995
Rutin	5,1 ± 0,1	0,37	0,994	2,03 ± 0,10	2,17 ± 0,07	0,93	0,993
Quercetin	1,7 ± 0,1	0,74	0,988	0,23 ± 0,04	0,44 ± 0,00	1,19	0,987

Tabelle 5.5.	Kinetische Parameter für	die Freisetzung der	Polyphenole aus den	Emulsionen mit Öl-Wasser	r Verhältnis von
50/50 (E1) u	nd 25/75 (E2) [105] (mod.))			

* K_H , Koeffizient von Higuchi, D_v , Diffusionskoeffizient innerhalb der Emulsion, Gl. (18),(19), Abb. 5.5;

** K_{κ} , n, Koeffizient und Exponent in Korsmeyers Gleichung (20), Abb. 5.5; Mittelwerte ± SD, n = 3

Für die Emulsion mit dem niedrigeren Ölgehalt waren alle Freisetzungs- und Diffusionskoeffizienten K_r , K_H , K_K und D_v höher für alle untersuchten phenolischen Substanzen mit Ausnahme von Quercetin, für das alle kinetische Parameter unabhängig von der Formulierung waren. Dies bedeutet, dass der Ölgehalt das Freisetzungsverhalten der Polyphenole aus der Emulsion direkt beeinflusst, nämlich, je höher der Ölgehalt ist, desto langsamer ist die Freisetzung von in der Formulierung enthaltenden Substanzen. Die Diffusionskoeffizienten wurden noch stärker beeinflusst als die entsprechenden K_r -Werte, mit einer Steigerung bei der Emulsion mit dem niedrigeren Ölgehalt von 67 % für PCA und Resveratrol bis zu 99 % für EGCG und Rutin. Dies kann zum Teil dadurch erklärt werden, dass der Stofftransport der hydrophilen phenolischen Verbindungen primär in der wässrigen Phase abläuft, so dass ein Anstieg des Ölgehaltes eine zunehmende Barriere gegen die Diffusion darstellt.

Der Exponent *n* aus der Korsmeyer-Gleichung (Gl. (20)) scheint eine spezifische Konstante für die freigesetzten Substanzen zu sein, da seine Werte bei der Variation der Formulierung unverändert blieben, im Gegensatz zu allen anderen Freisetzungsparametern. Der Exponent *n* variierte von 0,67 bis 1,17, was für einen anomalen Transportmechanismus und Zeit-Abhängigkeit von Freisetzungsprozess charakteristisch ist [102]. Dies bestätigt, dass die Bestimmung des Koeffizienten K_r nach dem 1. Fick'schen Gesetz (Gl. (17)) zu anfänglichen Zeitintervallen limitiert ist.

Für beide kinetischen Modelle, sowohl für das von Higuchi, als auch für das von Korsmeyer waren die Korrelationskoeffizienten sehr gut ($R^2 > 0,98$ für Quercetin, und > 0,99 für alle anderen Stoffe, Tabelle 5.5). In Tabelle 5.6 sind freigesetzte nach 4 h Mengen einzelner Polyphenole beobachteten Werte und die entsprechenden Werte, die anhand von den beiden kinetischen Modellen berechnet wurden, dargestellt.

Bei dem Vergleich der beobachteten und berechneten Werte ist zu erkennen, dass die mit dem Higuchi-Modell berechneten Werte etwas niedriger und die mit dem Korsmeyer Modell etwas höher liegen als die gemessenen Werte. Die geringen Unterschiede zeigen aber, dass beide Modelle zur Beschreibung der Freisetzungskinetik polyphenolischer Verbindungen aus Emulsionen geeignet sind.

Zur Bewertung der Reproduzierbarkeit der berechneten Modelle wurden analog zur Methode von Karasulu et al. [121] kumulative Abweichungen der beobachteten Werte von den berechneten ermittelt. Die Summen der kumulierten quadratischen Abweichungen (ΣSS), die für das Higuchi-Modell bestimmt wurden, waren 4,7 mal höher als die ΣSS von den experimentellen Daten für die beiden getesteten Formulierungen, während ΣSS beim Korsmeyer-Modell 8 bzw. 5,3 mal höher waren als die ΣSS von den experimentellen Werten für Emulsionen E1 bzw. E2 (Tabelle 5.6).

	Beobachtete Q(4)	und berech)/C₀·10² [cm	nete Werte,] **	Kumulierte quadratische Abweichung ^{I,II} , SS·10 ⁴			
	Beobachtet *	Higuchis Model	Korsmeyers Model	Beobachtet ¹	Higuchis model ["]	Korsmeyers model ["]	
Emulsion E1	-						
PCA	14,48 ± 0,02	14,37	14,96	0,08	0,06	0,50	
Catechin	13,71 ± 0,08	13,53	14,27	0,15	0,07	1,02	
EGCG	11,92 ± 0,15	11,58	12,36	0,04	0,70	0,98	
Resveratrol	8,13 ± 0,09	7,86	8,51	0,04	0,20	0,33	
Rutin	5,41 ± 0,16	5,36	5,78	0,05	0,39	0,23	
Quercetin	2,24 ± 0,13	2,14	2,36	0,02	0,35	0,04	
				∑SS = 0,38	∑SS = 1,76	∑SS = 3,11	
Emulsion E2	2						
PCA	19,2 ± 0,3	18,73	19,21	0,33	0,54	0,19	
Catechin	18,5 ± 0,3	18,29	19,42	0,24	0,32	2,23	
EGCG	15,7 ± 0,2	15,19	15,53	0,13	2,10	1,18	
Resveratrol	7,52 ± 0,07	7,36	7,90	0,04	0,44	0,25	
Rutin	10,6 ± 0,1	10,16	11,03	0,05	0,47	0,54	
Quercetin	2,23 ± 0,19	2,13	2,31	0,04	0,03	0,02	
				∑SS = 0,83	∑SS = 3,91	∑SS = 4,42	

Tabelle 5.6. Nach 4 h freigesetzte Mengen von Polyphenolen, beobachtet und berechnet aus kinetischen Modellen. Werte mit entsprechenden kumulierten Abweichungen innerhalb des gesamten Experiments nach [105] (mod.)

*Mittelwert ± SD, n = 3; ^{**}Q(4), kumulierte freigesetzte Menge nach 4 h durch eine Flächeneinheit, $mg \cdot cm^{-2}$; C₀, Ausgangskonzentration, $mg \cdot cm^{-3}$;

¹ Summe der quadratischen Standardabweichungen zu jedem Zeitpunkt t (SS = $\sum_{t} SD(m_{ot})^{2}$);

^{II} Summe der quadratischen Abweichungen der berechneten Werte von den beobachteten zu jedem Zeitpunkt t (SS = $\sum_{t} (m_{ot}-m_{et})^2)$, m_{ot} , $m_{et} = Q(t)/C_0$, beobachtet oder berechnet.

Obwohl beide Modelle die Beschreibung des Freisetzungsprozesses von Polyphenolen aus Emulsionen ermöglichen, ist das Higuchi-Modell aufgrund kleinerer Abweichungen zu experimentellen Daten vorzuziehen. Außerdem, bietet das Modell die Möglichkeit, die Diffusionskoeffizienten zu bestimmen.

5.3. Hautpermeation von Polyphenolen

Wie bereits erwähnt, ist die Penetration von Antioxidantien in die Haut eine wichtige Voraussetzung dafür, dass diese ihre Wirkung tatsächlich entfalten können. Die vorherigen Versuche zeigen, dass die Polyphenole gut aus den Emulsionen freigesetzt werden können. Im Folgenden ist deren Permeation durch die Schweinehaut *in-vitro* sowie ein Versuch zur Ermittlung der Penetration in Humanhaut *in-vivo* beschrieben.

5.3.1. In-vitro Hautpermeation

Die *in-vitro* Untersuchung der Hautpermeation erfolgte in Franz-Diffusionszellen gem. Kap. 8.3.2 unter Verwendung der exzidierten Schweinehaut. Die anschließende Analyse der Polyphenole in der Haut wurde wie in Kap. 8.3.3 beschrieben, durchgeführt.

In den Abb. 5.7 und Abb. 5.8 sind die Permeationskinetiken von Polyphenolen aus der Emulsionen E1 und E2 (Tabelle 5.3) mit den Öl-Wasser-Verhältnissen von 50/50 bzw. 25/75 dargestellt.



Abb. 5.7. Permeationskinetik der Polyphenole durch die Schweinehaut aus der Emulsion E1 mit o/w-Verhältnis von 50/50 (w/w) [105]. Permeierte Menge durch eine Flächeneinheit der Haut (Q, μ g/cm²), bezogen auf die Ausgangskonzentration (C₀ = 0,96 ± 0,06 μ g/ml), Mittelwert ± SD, n = 3



Abb. 5.8. Permeationskinetik der Polyphenole durch die Schweinehaut aus der Emulsion E2 mit o/w-Verhältnis von 25/75 (w/w). Permeierte Menge durch eine Flächeneinheit der Haut (Q, μ g/cm2), bezogen auf die Ausgangskonzentration (C0 = 0,96 ± 0,06 μ g/ml), Mittelwert ± SD, n = 3

Ähnlich der Freisetzung, wiesen die einzelnen Polyphenole unterschiedliche Permeatiosraten auf, und die permeierten Mengen nach 24 h bei Emulsion E2 mit niedrigerem Ölgehalt waren höher als bei Emulsion E1.

Die entsprechenden Permeationskoeffizienten K_p , Verzögerungszeiten (lag times) t_L (Gl. (12)), Diffusionskoeffizienten innerhalb der Haut D_s (Gl. (14)), Verteilungskoeffizienten Haut-Vehikel $P_{s/v}$ (Gl. (16)) und die kumulierten permeierten Mengen nach 24 h Versuchszeit sind in Tabelle 5.7 dargestellt.

Die Koeffizienten der Hautpermeation K_p waren für jede Substanz etwa zwei Größenordnungen niedriger als die jeweiligen Freisetzungskoeffizienten K_r (Tabelle 5.5). Damit stellt die Haut die limitierende Barriere gegen den Transport von Polyphenolen dar. Die höchste Permeationsgeschwindigkeit wurde für PCA, die niedrigsten wurden für EGCG und Quercetin beobachtet. Die Auswirkungen von Ölkonzentration in der Formulierung auf die Permeation von Polyphenolen durch die Haut waren ähnlich wie bei deren Freisetzung. Aus der Emulsion mit niedrigeren Ölgehalt wurden höhere Permeationsraten beobachtet.

	$K_{p} \cdot 10^{4} [\mathrm{cm h^{-1}}]$	<i>t</i> _L [h]	$D_{s} \cdot 10^{4} [\text{cm}^{2} \text{h}^{-1} \text{h}]$	P _{S/V}
Emulsion E 1				
PCA	5,0 ± 1,4	4,7 ± 0,3	6,6 ± 0,7	0,103 ± 0,024
Catechin	2,54 ± 0,29	6,7 ± 1,7	4,9 ± 1,3	0,074 ± 0,012
Resveratrol	1,73 ± 0,48	4,3 ± 1,1	7,4 ± 1,2	0,033 ± 0,012
Rutin	0,59 ± 0,16	8,3 ± 0,9	3,7 ± 0,6	0,012 ± 0,003
Quercetin	0,07 ± 0,06	6,4 ± 1,9	5,1 ± 1,0	0,002 ± 0,001
EGCG	0,03 ± 0,01	6,2 ± 0,7	5,0 ± 0,6	0,0007 ± 0,0002
Emulsion E 2				
PCA	11,8 ± 0,6	2,8 ± 0,4	6,3 ± 1,0	0,207 ± 0,008
Catechin	4,94 ± 0,59	6,0 ± 1,9	3,9 ± 0,7	0,150 ± 0,036
Resveratrol	3,79 ± 0,39	5,2 ± 1,3	4,4 ± 0,5	0,100 ± 0,013
Rutin	1,17 ± 0,16	5,9 ± 2,6	4,2 ± 0,9	0,034 ± 0,008
Quercetin	0,05 ± 0,03	5,2 ± 2,7	5,7 ± 3,8	0,0013 ± 0,0009
EGCG	0,03 ± 0,03	8,5 ± 2,3	2,8 ± 0,8	0,0012 ± 0,0006

Tabelle 5.7. Permeationsparameter, bestimmt für die Applikation von Emulsionen mit O/W Verhältnis von 50/50 (E1) und 25/75 (E2) [105]

 K_p , Permeationskoeffizient; t_L , Verzögerungszeit; D_s , Diffusionskoeffizient in der Haut (Hautdicke 1,2 ± 0,1mm); $P_{S/V}$, Verteilungskoeffizient zwischen Haut und Emulsion; Q(24)/C₀, Kumalative permeierte Menge durch eine Flächeneinheit der Haut nach 24 h, bezogen auf die Ausgangskonzentration. Alle Werte sind Mittelwerte ± SD, n =3

Die Verzögerungszeiten t_L (Lag-Zeit) variierten von 2,8 zu 8,5 h und korrelierten nicht mit den Permeationskoeffizienten. Vor der Permeation durch die Haut ist eine Sorption und Penetration von Substanzen in die Haut notwendig. Während der Lag-Zeit steigt die Stoffkonzentration in der Haut an, bis die weitere Freigabe infolge des Konzentrationsgradienten erfolgen kann [99]. Dieser Zeitraum ist für jeden Stoff und jede Formulierung individuell. Die Diffusionskoeffizienten D_s , die nach der Lag-Zeit-Methode bestimmt wurden (Gl. (14)) unterschieden sich zwischen den Substanzen nicht so stark wie die Permeationskoeffizienten K_p , waren aber tendenziell höher für die Emulsion mit höheren Ölgehalt (E1). Die K_p Werte, die sich zu t_L invers verhielten, waren beim Aufbringen der Emulsion mit dem niedrigeren Ölgehalt höher. Die Verteilungskoeffizienten Haut/Formulierung $P_{s/v}$ zeigten eine viel geringere Affinität der Polyphenole zu der Haut als zu den Emulsionen und stiegen mit niedrigerem Ölgehalt der Emulionen an. Die höchsten Werte wurden für PCA, die niedrigsten für EGCG und Quercetin bestimmt, ähnlich zu den Permeationskoeffizienten. Die Ermittelten D_s sowie $P_{s/v}$ Werte bestätigen, dass die Überwindung des Stratum Corneum, der primären Barriere, eine Voraussetzung für die Permeabilität von Wirkstoffen durch die Haut ist. Sie hängt von der Affinität der einzelnen Substanzen zum Stratum Corneum sowie von der Diffusion der penetrierten Substanzen in den tieferen Hautschichten ab. Letzteres findet wahrscheinlich unabhängig von der applizierten Emulsion statt.

Neben der Permeationskinetik, wurden die Verteilungen von Polyphenolen in den Hautschichten in dem mittels Tape-Stripping entfernten Stratum Corneum und in der restlichen Epidermis und Dermis, in der Rezeptorflüssigkeit und auf der Hautoberfläche nach den 24-h Permeationsexperimenten bestimmt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abb. 5.9 dargestellt.



Abb. 5.9. Verteilung der Polyphenole nach den Hautpermeationsexperimenten, A: Emulsion E1; B: Emulsion E2. (Mittelwerte ± SD; n = 3). C: Catechin, E: EGCG, Ru: Rutin, Res: Resveratrol, Q: Quercetin [105]

Relativ hohe Mengen der Polyphenole wurden in der Epidermis und Dermis gefunden, die als Ziel-Schichten für die vorgesehene antioxidative Wirkung gelten. Bemerkenswert ist, dass die Konzentration der Polyphenole im Stratum Corneum nach der Applikation der Emulsion E2 (mit niedrigerem Ölgehalt) niedriger war als bei Emulsion E1 (insgesamt penetriert 3,6 μ g/cm² (E2) bzw. 5,7 μ g/cm² (E1)). Die in die Dermis penetrierten Mengen waren nach der Applikation der Emulsion mit niedrigerem Ölgehalt höher (gesamte penetrierte Polyphenolmengen betrugen 61,5 μ g/cm² und 28,6 μ g/cm² für Emulsionen E2 bzw. E1). Dieses Verhalten stimmt damit überein, dass die Permeationsraten einzelner Polyphenole aus der Emulsion mit dem niedrigeren Ölgehalt höher waren, als aus der Emulsion E1. Die Konzentrationen einzelner Polyphenole in der Epidermis und Dermis sowie in der Rezeptorflüssigkeit korrelierten mit den Permeationskoeffizienten K_p (R² = 0,90 bzw. 0,99).

5.3.2. In vivo - Hautpenetration

Um die Penetration der phenolischen Verbindungen unter realen Bedingungen zu demonstrieren, wurde die Emulsion E2 auf den Unterarm von zwei gesunden Probanden aufgebracht. Nach 0,5 h wurde das Polyphenolgehalt in dem mittels Tape-Stripping entfernten Stratum Corneum analysiert. Diese Schicht konnte mit 10 Tape-Streifen teilweise und mit 20 Streifen komplett entfernt werden, was durch eine Erhöhung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) verifiziert wurde (TEWL von 7,7 ± 0,7 g·h⁻¹m⁻² für unbehandelte; 10,1 ± 0,7 und 38 ± 2 g·h⁻¹m⁻² für 10-mal und 20-mal gestrippte-Hautbereiche).



Abb. 5.10. Haut eines Probanden nach der Stratum Corneum-Entfernung mittels Tape-Stripping

Die Erhöhung des TEWLs korrelierte mit der Hautrötung (Abb. 5.10) und deutete auf die Verringerung der Barrierefunktion der Haut hin, und folglich in unserem Fall, auf eine partielle oder vollständige Entfernung des Stratum Corneum. In Tabelle 5.8 sind die Polyphenol-Gehalte in den oberen Schichten (1-10 Streifen) und tieferen Schichten (11-20 Streifen) des Stratum Corneums dargestellt.

Pro- Hautflä-		Applizierte Formuli-	Hauttiefe	Polyphenolgehalt in der Haut, % von applizertem*					
band	che, cm ²	erung, mg∙cm⁻²	(Streifen-	PCA	Catechin	EGCG	Rutin	Resveratrol	Quercetin
1	4,91	5,58	1-10	23,36	0	1,56	24,60	3,77	23,21
2	4,91	4,75	1-10	37,18	0	2,00	32,92	1,04	32,27
h	10.0	2 2 2	1-10	43,13	0	3,05	45,61	16,11	44,23
Z	10,0	3,33	11-20	0,41	0	0,65	1,40	1,04	1,45
2	10,0	0 ¤	1-10	0	0	0	0	0	0

Tabelle 5.8 Polyphenolgehalt in Stratum Corneum von zwei Probanden nach 30 min nach der Applikation der Emulsion auf dem Unterarm

* Bezogen auf den Applikationsbereich

^{*} Keine Formulierung appliziert (Kontrolle)

In allen Hautextrakten waren Catechin und EGCG nicht bzw. geringfügig nachweisbar. Die Konzentrationen anderer Polyphenole in den oberen Schichten wichen stark zwischen den Probanden und behandelten Hautarealen ab. Beim Vergleich der Polyphenolgehalte in den einzelnen Schichten (Proband 2) zeigte sich, dass in der oberen Schicht (Streifen 1-10) die Konzentrationen aller Substanzen, ausgenommen Catechin, deutlich höher waren als in der tieferen Schicht (Streifen 11-20). Die Wiederfindungsraten waren jedoch 44 bis 47 % für DHBA, Rutin und Quercetin, und lediglich 17; 3,7 und 0 % für Resveratrol, EGCG bzw. Catechin.

5.4. Diskussion

Die Zielhautschichten für eine antioxidative Wirkung von Polyphenolen sind die Epidermis, wo Polyphenole direkt die ROS inaktivieren können und die Dermis, die Schicht, in der für die Hautbeschaffenheit und Elastizität verantwortlichen Elastin- und Kollagenfasen gelagert sind und deren Destrukturierung und Abbau mit dem Alterungsprozess verbunden ist [2]. Daher müssen die Polyphenole aus der topischen Formulierung freigegeben werden, und in der Lage sein, das Stratum Corneum, die wichtigste Barriereschicht menschlicher Haut durchzudringen. Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den Kapiteln 5.1 bis 5.3 diskutiert.

5.4.1. Extraktion der Polyphenole aus der Schweinehaut

Bei der Untersuchung der Extraktion von phenolischen Substanzen aus der Schweinehaut wurden auffallend niedrige Wiederfindungsraten erzielt, besonders in den Versuchen, bei denen die Zerkleinerung mit UltraTurrax vorgenommen wurde (Abb. 5.1, Abb. 5.2, Versuch Nr. 1-8). Die Versuche mit Zugabe von L-Ascorbinsäure und unter Sauerstoffausschluss zeigten, dass die niedrige Extraktionsausbeute der Polyphenole aus der Haut nicht nur an ihrer Oxidation liegen kann. Möglicherweise werden aufgrund der Wechselwirkungen phenolischer Substanzen mit den Proteinen der Haut unlösliche Protein-Polyphenol-Komplexe gebildet [122]. Bei der Vermahlung in der Kryo-Mühle stiegen die Wiederfindungsraten einiger Polyphenole allerdings auf 90 % bis 100 % an (PCA, Rutin, Resveratrol, Quercetin). Die Unterschiede in der Polyphenolausbeute könnten zum Teil durch den deutlichen Unterschied zwischen den Verarbeitungstemperaturen erklärt werden. Bei -196 °C (Kryo-Mühle) sind biochemische Reaktionen in den Hautproben weitgehend ausgeschlossen. Im Gegensatz dazu können die Temperaturen während einer intensiven Behandlung mit Ultra-Turrax deutlich über 40 °C ansteigen, was sowohl die Oxidation phenolischer Substanzen, als auch eine Ausbildung von Polyphenol-Protein-Komplexen begünstigt.

Im Gegensatz zur PCA, Rutin, Resveratrol und Quercetin lagen die Wiederfindungsraten von EGCG und Catechin nur bei 19 % bzw. 56 %. Für diese Komponenten wurden die höchsten Indizien der Hemmung von Lipidoxidation (AI) (Abb. 4.3) sowie hohe Radikalfängeraktivitäten (TEAC) ermittelt (Tabelle 4.2). Wahrscheinlich findet ihr Abbau aufgrund der hohen Aktivität dieser Stoffe statt. Andererseits, konnte für Quercetin, das auch eine sehr hohe antioxidative Aktivität aufweist, eine Wiederfindungsrate von 96 % erreicht werden. Deswegen kann angenommen werden, dass die Lipophilität der Substanzen auch eine Rolle spielt. Möglicherweise kann Quercetin nicht mit hydrophilen Hautproteinen interagieren aufgrund seiner hohen Hydrophobizität [104].

5.4.2. Freisetzung polyphenolischer Verbindungen aus Emulsionen

Eine *in-vitro*-Überwachung der Wirkstofffreisetzung ist ein nützliches Werkzeug für die Kontrolle der Aktivität für die Entwicklung und Produktion kosmetischer oder pharmazeutischer Produkte wie topischer Emulsionen. Im Kapitel 5.2 ist die Bestimmung von anfänglichen Freisetzungskoeffizienten nach Fick'schem ersten Gesetz sowie die Anwendung kinetischer Modelle von Higuchi [101] und Korsmeyer [120] beschrieben. Das Model von Higuchi wurde ausgewählt als am besten geeignete für die Beschreibung der Freisetzung phenolischer Verbindungen aus Emulsionen.

Die Korsmeyer-Gleichung (Gl. (20)) wurde ursprünglich für die Untersuchung der Wirkstofffreisetzung aus starren oder schwellbaren Darreichungsformen vorgeschlagen [102, 120], aber dieses "Potenz-Gesetz" ist anwendbar für verschiedene Systeme und Geometrien. Anhand des Exponenten n kann der Mechanismus der Wirkstofftransport beschrieben werden. Beispielsweise, während der Untersuchung der Freisetzung einiger phenolischer Verbindungen aus einem polymeren Chitosan-Komplex, erfolgte die Freisetzung in den ersten Zeitintervallen infolge einer unidirektionalen Diffusion, wobei n sehr nah an 0,5 war. Das zweite Zeitintervall (60-270 min) wurde mit der Kinetik nullter Ordnung charakterisiert (n =1) [103]. Bei den im Kapitel 5.2 beschriebenen Freisetzungsuntersuchungen wurde nur ein Zeitintervall betrachtet und die n-Werte unterschieden sich für jede Substanz, waren aber unabhängig von der Formulierung, im Gegensatz zu den kinetischen Koeffizienten (Tabelle 5.5). Die Freisetzung von PCA, Catechin und EGCG erfolgte gemäß eines nicht-Fickschen Transportmechanismus, war aber zeitabhängig, da die entsprechenden *n*-Werte zwischen 0,5 und 1 lagen. Die Freisetzung von Rutin und Quercetin, mit den entsprechenden *n*-Werten von 0,90 und > 1, kann in erster Näherung als Freisetzung nullter Ordnung beschrieben werden. Das stimmt mit der Studie von Papa et al. überein [12], in der kinetische Modelle nullter Ordnung für die Freisetzung von Rutin aus verschiedenen halbfesten Formulierungen erhalten wurden. Die anomalen n-Werte von Quercetin (> 1) lassen sich mit der Begrenzung der Freisetzungsgeschwindigkeit durch die angewandte Cellulosemembran erklären. Bei der Freisetzung von Quercetin wurden nämlich die Verzögerungszeiten von 10-16 min beobachtet, im Gegensatz zu anderen Substanzen, für die keine Verzögerungszeiten und damit keine Limitierung durch die Membran beobachtet wurden.

Obwohl das Korsmeyer-Modell gut zu den experimentellen Daten passte, stimmte das Modell von Higuchi mit den Ergebnissen besser überein (Tabelle 5.6). Ähnlich wurde in der Studie von Marquele et al. [17] die Freisetzung von p-Cumarinsäure und von Polyphenolhaltigen Propolis-Extrakt aus kosmetischen Emulsionen untersucht, dabei wurden die Freisetzungsprofile mit dem Higuchi-Modell beschreiben. Das Modell erlaubt, die Diffusionskoeffizienten zu berechnen. Die in Kapitel 5.2 berechneten D_{v} - Werte zeigten, dass die Freisetzung von polyphenolischen Verbindungen von ihrer Diffusionsgeschwindigkeit innerhalb der Emulsion abhängt. Allerding korrelierten die anfänglichen Freisetzungskoeffizienten K_r nicht immer mit D_v -Werten.

Die Freisetzungs- und Diffusionskoeffizienten einzelner Polyphenole unterschieden sich erheblich. Um die Auswirkungen der Moleküleigenschaften auf ihre Freisetzung aus Emulsionen zu ermitteln, wurden die K_r -Werte gegen das Molekulargewicht (Abb. 5.11, links) und gegen die entsprechenden *log P_{ow}*-Werten aufgetragen (Abb. 5.11, rechts). Diese beiden Faktoren werden als die wichtigsten für die Freisetzung und die Hautpermeation von Wirkstoffen beschrieben [123].



Abb. 5.11. Anfängliche Freisetzungskoeffizienten (K_r) der Polyphenole aus der Emulsion E1 als Funktion von Molekularmasse (MW) und Oktanol-Puffer (pH 5,5) Verteilungskoeffizienten (log P_{ow}). PCA, Protocatechusäure, C, Catechin, EGCG, Epigallocatechingallat, Re, Resveratrol, Ru, Rutin, Q, Quercetin [105]

Die mehr hydrophilen Moleküle mit *log* P_{OW} < 1 (PCA, Catechin, EGCG und Rutin) zeigten eine umgekehrt proportionale Korrelation zwischen den anfänglichen Freisetzungskoeffizienten K_r und dem Molekulargewicht. Die hydrophoben Resveratrol und Quercetin zeigten eine ähnliche Tendenz beim Vergleich untereinander. Mit Ausnahme von Rutin, waren die K_r -Werte proportional zu der Hydrophilitätsgrad der Polyphenole. Möglicherweise können die hydrophilen Moleküle, die in der äußeren wässrigen Phase der Emulsion befinden, leichter zu der Grenzfläche zwischen der Emulsion und der Membran diffundieren. Im Gegensatz dazu müssen hydrophobere Moleküle wie Resveratrol und Quercetin, die sich überwiegend in und an der dispersen Lipidphase befinden, noch zusätzlich die Grenzfläche zwischen Öl und Wasser überwinden. Das erklärt deren niedrigeren die K_r-Werte.

Rutin, hingegen, hat keinen aufgrund seines niedrigen *log P_{ow}*-Wertes erwarteten hohen Freisetzungskoeffizienten aufgewiesen. Der Rutinose-Rest in seiner Struktur verleiht dem Molekül einen amphiphilen Charakter und macht es leicht oberflächenaktiv [124]. Aus diesem Grund wird Rutin stärker an der Öl-Wasser-Grenzschicht gebunden, was seine Diffusion und Freisetzung behindert.

Für die Diffusionskoeffizienten in den Emulsionen (D_V) wurde eine ähnliche Tendenz bezüglich des Einfluss des Molekulargewichts und der Lipophilie erhalten, jedoch lagen D_{V^-} Werte von PCA, Catechin und EGCG näher beieinander, als die entsprechenden K_r -Werte (Tabelle 5.5). Durch die sehr schnelle anfängliche Freisetzung dieser relativ hydrophilen Substanzen, nimmt deren Konzentration in den Emulsionsschichten in der Nähe von Membran schnell ab. Als Folge sinkt der Konzentrationsgradient innerhalb der Membran, was im Endeffekt die weiteren Freisetzungsraten verlangsamt. Der Konzentrationsgradient innerhalb der Emulsion wird jedoch erhöht, was zu höheren Diffusionsraten der Polyphenole führt.

Die Freisetzungsraten der phenolischen Verbindungen waren höher aus der Emulsion mit niedrigerem Ölgehalt. Die Erhöhung der Freisetzungsraten aus Formulierungen mit höheren Wassergehalt wurde in der Literatur bereits beschrieben [17, 106, 117, 125]. Der Hauptgrund hierfür wird in der Stabilisierung von phenolischen Substanzen an der Öl-Wasser-Grenzschicht gesehen. Wie oben erwähnt, können Polyphenole leicht amphiphile Eigenschaften aufweisen [26]. In den Emulsionen mit höherem Ölgehalt ist die Grenzfläche bei gleicher Partikelgrößenverteilung größer, daher können Polyphenole besser stabilisiert werden, was zu einer Abnahme der Freisetzungsraten führt. Ein anderer Grund kann die höhere Viskosität von Emulsionen mit höherem Ölgehalt sein. Sie erschwert die Diffusion von Polyphenolen in den Emulsionen und führt schließlich zur Minderung deren Freisetzungs- und Permeationsraten.

5.4.3. Hautpermeation

Diffusion von Wirkstoffen durch die Haut ist ein deutlich komplexerer Prozess als die Freisetzung, insbesondere aufgrund der Inhomogenität des Hautgewebes. Bei der mehrschichtigen Hautmembran liegt die primäre Barrierefunktion im Stratum Corneum, das aus verhornten Korneozyten, und chemisch hauptsächlich aus Lipiden verschiedener Polarität besteht, so dass die Haut als semi-permeable Membran wirkt [22].

Im Allgemeinen korrelierten die Permeationskoeffizienten K_p mit den anfänglichen Freisetzungskoeffizienten K_r (Abb. 5.12), mit einer Ausnahme von EGCG (R² = 0,9246). Dies deutet darauf hin, dass die Diffusität des Wirkstoffs in dem Vehikel ein wichtiger Faktor für den Prozess der Hautpermeation ist.



Abb. 5.12. Korrelation zwischen Freisetzungs- (K_r) und Hautpermeationskoeffizienten (K_p), die für die Emulsionen mit dem Ölphasengehalt von 25 % (weiße Kreise) und 50 % (schwarze Rauten). Q: Quercetin, Ru: Rutin, C: Catechin, Re: Resveratrol, E: Epigallocatechingallat (EGCG), PCA: protocatechuic acid. Die durchgezogene Linie zeigt die Korrelation aller Punkte, bei der gestrichelten Linie ist EGCG aus der Korrelation ausgeschlossen

Da die Variation von D_s -Werten (Diffusionskoeffizienten in der Haut) zwischen den Substanzen und den Formulierungen viel geringer als die Variation der K_p -Werte und der Haut-Formulierung Verteilungskoeffizienten ($P_{S/V}$) war (Tabelle 5.7), kann hergeleitet werden, dass die Diffusion durch die Haut deutlich schneller als die Durchdringung des Stratum Corneums abläuft und nicht in dem Maß durch die aufgebrachte Formulierung oder Molekuleigenschaften beeinträchtigt wird. Diese Hypothese konnte mit einer Studie bestätigt werden, bei der die vom Stratum Corneum abgestreifte Haut für eine Untersuchung der Hautabsorption von Catechin-beladenen Liposomen [116] verwendet wurde. In dieser Studie waren die Permeationsraten mit den Freisetzungsraten durch eine Cellulose-Membran vergleichbar, was die Abwesenheit einer Barrierefunktion der tieferen Epidermis nahe legt. Dies könnte erklären, warum die im Kapitel 5.3.1 beschriebenen Diffusionskoeffizienten durch die Haut D_s nicht mit den Permeationskoeffizienten K_p (Tabelle 5.7) korrelieren. Jedoch ist in der Regel eine experimentelle Zeit von mindestens drei oder vier t_L erforderlich, um die Genauigkeit der Lag-Zeit-Methode zu gewährleisten [99]. Permeationsstudien mit *ex-vivo* Haut sind während so einer langen Zeitperiode oft nicht möglich, weil die strukturelle Integrität und die Lebensfähigkeit von der ausgeschnittenen menschlichen oder tierischen Kadaverhaut innerhalb langer Zeiträume nicht gewährleitet sind. Da die Versuchsdauer auch aus der mikrobiologischen Sicht begrenzt war, war sie ggf. für eine exakte Bestimmung von t_L -Werten nicht ausreichend. Somit ist mit einer möglichen Unterschätzung von t_L und somit von D_s -Werten zu rechnen.

Die Hautpermeationsraten von EGCG waren extrem niedrig, so dass diese sich nicht mit den Freisetzungskoeffizienten korrelierten, wie die anderen getesteten Substanzen. Hier kann vermutet werden, dass eine derart hochreaktive Verbindung (Tabelle 4.2) während des Versuchs durch oxidativen Abbau oder eine Interaktion mit Proteinen der Haut zerstört oder immobilisiert werden kann. Signifikante Mengen an EGCG wurden im abgestreiften Stratum Corneum und in der Epidermis und Dermis gefunden (Abb. 5.9). In diesen Schichten können enzymatische Abbauprozesse oder kovalente Wechselwirkungen mit den Hautproteinen wie z. B. Kollagen auftreten, was die Diffusion der Substanz durch die Haut zum Rezeptormedium behindert. Ähnliche Ergebnisse wurden von Batchelder et al. [126] berichtet. Sie gingen von einer Hydrolyse durch dermale Esterase als möglicher Abbaumechanismus von EGCG in der Haut aus. EGCG ist die einzige von den hier untersuchten Substanzen, die einen veresterten Gallatrest in der Molekülstruktur enthält (Abb. 4.1), der durch die Esterase gespalten werden kann. Diese enzymatische Hydrolyse könnte das herausragende Verhalten von EGCG, wie auch das Fehlen der für andere Substanzen charakteristischen Korrelation zwischen Permeation und Freisetzung erklären. Nach den Permeationsuntersuchungen wurden große Mengen der untersuchten Substanzen in der Epidermis und Dermis gefunden (Abb. 5.9), den Zielschichten für den gewünschten "Anti-Aging"-Effekt.

Dal Belo et al. [118] untersuchten die Permeation verschiedener Polyphenole wie EGCG und Quercetin durch exzidierte menschliche Haut und erhielten ähnliche Ergebnisse wie die beschriebenen im Kapitel 5.3.1. Die größte Menge an EGCG in wurde Stratum Corneum gefunden, Quercetin war meist in der lebensfähigen Epidermis lokalisiert, konnte aber nicht zu der Rezeptor-Flüssigkeit durchdringen [118]. Bei unseren *in-vitro* Untersuchungen wurden EGCG und Quercetin ähnlich verteilt, geringe Mengen von ihnen wurden jedoch in der Rezeptorflüssigkeit gefunden. Dies deutet darauf hin, dass die Schweinehaut etwas höhere Permeabilität aufweist, als die menschliche. Allerdings wäre für diese Schlussfolgerung ein direkter Vergleich notwendig. Beispielsweise, Barbero und Frasch [127] verglichen die Permeationsdaten von 18 Studien, 41 Permeabilitätsmessungen für 26 Chemikalien durch humane Haut und Schweinehaut. Der erhaltene Korrelationskoeffizient von 0,88 ist als Beleg zu werten, dass die Schweinehaut ein guter Ersatz für die menschliche Haut bei Permeationsuntersuchungen ist. Zu ähnlichen Schlussfolgerungen führte die Arbeit von Netzlaff et al. [128], obwohl in anderen Quellen die Schweinehaut als etwas mehr permeabel als die Humanhaut beschrieben wird [10].

Der *in-vivo* Pilotversuch (Kap. 5.3.2) zeigte keine übereinstimmenden Ergebnisse mit der *in-vitro* Permeation. Die niedrigen Wiederfindungsraten der Polyphenole im Stratum Corneum könnten durch ein tieferes Eindringen der Testsubstanzen verursacht sein, das bereits innerhalb von 30 min Versuchszeit auftreten könnte. Eine solch schnelle Permeation ist jedoch eher unwahrscheinlich, da, wie es in dem *in vitro* Experiment mit Versuchsdauer von 24 h ermittelt wurde, wo die Lag-Zeiten (t_l) für EGCG und Catechin bei über 6 h lagen (Tabelle 5.7). Andere Gründe könnten Polyphenolabbau im Hautgewebe durch Oxidation, enzymatische Reaktionen oder Polyphenol-Protein-Wechselwirkungen sein. Dies wird zum Teil durch den Vergleich der Freisetzung und *in vitro* Hautpermeationsdaten (Abb. 5.12) unterstützt. Aus diesem Vergleich ist ersichtlich, dass EGCG abseits der Korrelation liegt, was auf einen Abbau in oder eine Reaktion mit der der Haut hindeutet. *In-vitro* Daten für Catechin waren allerdings nicht herausragend. Daraus kann eine Schlussfolgerung gezogen werden, dass entweder die Metabolisierung von Catechin nur in der lebendigen Haut stattfinden kann, oder dass der Unterschied zwischen menschlicher und Schweinehaut eine größere Rolle spielt. Um diese Hypothesen zu überprüfen wären aber noch weitere Untersuchungen notwendig.

Bei dem Vergleich der in-vitro Permeation aus Emulsionen mit unterschiedlichen O/W-Verhältnissen zeigten Emulsionen mit niedrigerem Ölgehalt höhere Permeationsraten (Abb. 5.9), ähnlich wie bei der Freisetzung. Von diesem Effekt wurde auch in anderen Studien berichtet [106, 117, 125]. Einer der Gründe für dieses Verhalten könnte eine beschleunigte Diffusion der Polyphenole innerhalb der Emulsionen mit niedrigerem Ölgehalt sein, die zu verbesserten Permeationsraten führt. Ein weiterer Grund könnte eine Hyperhydratisierung der Haut nach der Applikation Formulierungen mit höherem Wassergehalt sein. Unter normalen Bedingungen ist das Stratum Corneum relativ trocken (Wassergehalt von etwa 20 %), und ein erhöhter Feuchtezufuhr führt zu einer Reorganisation von Lipid-Lamellenstrukturen und kann generell die transdermale Verabreichung von topisch applizierten Substanzen erhöhen [22].

6. Auswirkung von Emulsionskomponenten auf die Emulsionseigenschaften und Wirkstofffreisetzung

Die in den Kapiteln 4 und 5 beschriebenen phenolischen Substanzen wurden unter Verwerdung von Sonnenblumenöl und zwei verschiedenen Emulgatorsystemen unter der Variation von Öl-zu-Wasser-Verhältnis und Polyphenolgehalt in Emulsionen eingearbeitet. Die entsprechenden Rezepturen sind in Tabelle 6.1 dargestellt. Die Emulsionen wurden gem. Kapitel 8.2.1 (3) hergestellt.

Die Emulsionen wurden bezüglich deren rheologischen Eigenschaften, Tröpfchengrößenverteilungen, Zentrifugenstabilität sowie Polyphenolfreisetzung und Lagerstabilität untersucht.

	Formulierung	T1	Т 2	Т 3	S 1	S 2	S 3	S 4
	O/W-Verhältnis (wt.)	25/75	35/65	45/55	25/75	35/65	45/55	15/85
Phase	e Ingredient							
Α	Wasser	ad.100						
А	Xanthan gum	0,20	0,17	0,15	0,20	0,17	0,15	0,23
А	Paraben K	0,40	0,35	0,29	0,40	0,35	0,29	0,45
В	Sonnenblumenöl	15,0	21,0	27,0	20,0	28,0	36,0	12,0
В	Sorbitanmonopalmitat (Span 40)	3,37	4,7	6,1				
В	Polyoxyethylen Sorbitanmonopalmitat (Tween 40)	1,63	2,3	2,9				
В	Cetylalkohol	5,0	7,0	9,0				
В	Symbiomuls GC (Glycerylstearat Citrat, Cetearylalcohol, Glycerylcaprylat)				5,0	7,0	9,0	3,0
С	Glycerin-Wasser (1:1)	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
С	Polyphenole*	0-1,0	0-1,0	0-1,0	0-1,0	0-1,0	0-1,0	0-1,0

Tabelle 6.1. Zusammensetzung von untersuchten Emulsionen (% wt.)

* Protocatechusäure, Catechin, Rutin, Resveratrol, Quercetin; einzeln oder als Mischung (20% von jeder Substanz)

6.1. Freisetzung von Polyphenolen aus den Emulsionen mit unterschiedlichem Ölgehalt und Emulgator

In Kapitel 5.2 wurde gezeigt, dass Higuchis Quadratwurzel-Modell am besten geeignet für die Beschreibung der Freisetzungskinetik von Polyphenolen aus kosmetischen Emulsionen ist, anhand dessen unter anderem auch die Bestimmung von Diffusionskoeffizienten in der Formulierung möglich ist [105]. Da es in diesem Kapitel um einen Vergleich der Formulierungen, und nicht um die reale Hautpermeationsprozesse geht, werden im Weiteren lediglich die Diffusionskoeffizienten innerhalb der Formulierung D_v diskutiert. Die D_v -Werte von Polyphenolen in den Emulsionen mit Emulgator Tween 40-Span 40-Cetylalkohol (T1-T3) und Symbiomuls GC (S1-S3), (Tabelle 6.1) sind in Abb. 6.1 als eine Funktion des Ölgehaltes dargestellt. Die Ausgangskonzentration von jedem Polyphenol betrug 0,16 ± 0,02 mg/ml und entsprach dem niedrigsten untersuchten Gesamtpolyphenolgehalt von 0,08 ± 0,01 %.



Abb. 6.1. Diffusionskoeffizienten (D_v) der Polypenole bei der Freisetzung aus Emulsionen mit unterschiedlichem Ölphasenanteil (wt.) und Emulgatorsystemen (T: Span 40- Tween 40-Cetylalcohol; S: Symbiomuls GC, Tabelle 6.1), Mittelwerte \pm SD, n = 3. Die Ausgangskonzentrationen von Einzelsubstanzen betrugen 0.16 \pm 0.02 mg/ml

Bei der Freisetzung der Polyphenole aus den Emulsionen mit beiden Emulgatorsystemen zeigt sich eine starke Abhängigkeit der Diffusion vom Öl-zu-Wasser-Verhältnis. Dabei nehmen die Diffusionskoeffizienten D_v mit zunehmendem Ölgehalt ab. Ein ähnliches Verhalten wurde bereits in Kapitel 5.2 für andere Emulsionen beschrieben. Die Diffusionskoeffizienten der einzelnen Substanzen innerhalb der Emulsionen S (Symbiomuls GC) waren vier bis acht Mal höher als in den Emulsionen T (Span 40- Tween 40- Cetylalkohol) bei den jeweiligen O/W-Verhältnissen. Für alle Emulsionen T wurden die höchsten Diffusionsraten PCA, das kleinste der untersuchten Moleküle erhalten. Für die Emulsionen S wurden die höchsten D_v-Werte bei der Diffusion von Catechin beobachtet. Bei der Untersuchung der Freisetzung aus Emulsionen mit unterschiedlichen Polyphenolkonzentrationen (Tabelle 6.2) zeigten sich für die Emulsionen T die Tendenz einer Erhöhung von D_v -Werten für PCA und Catechin und Verminderung von D_v -Werten für Rutin und Resveratrol bei Steigerung der Konzentration. Bei der Freisetzung aus den Emulsionen S nahmen die D_v bei höheren anfänglichen Konzentrationen ab (Tabelle 6.3).

Tabelle 6.2. Diffusionskoeffizienten der Polyphenole bei der Freisetzung aus Emulsionen T (Tween 40-Span40-Cetylalcohol, Tabelle 6.1), verschiedenen O/W-Verhältnissen und Ausgangskonzentrationen

	C_0^* , mg/ml		0,14 ± 0,02	0,65 ± 0,05	1,5 ± 0,1
	Emulsion	O/W		D_{v}^{**} , cm ² h ⁻¹ ·10 ³	
PCA	T1	25/75	2,1±0,2	2,8±0,3	3,1±0,2
	T2	35/65	$2,0\pm 0,2$	2,26±0,06	$2,8\pm0,1$
	Т3	45/55	$1,25 \pm 0,08$	1,55 ±0,05	$1,34 \pm 0,06$
Catechin	T1	25/75	1,8±0,3	2,0±0,1	2,27±0,02
	T2	35/65	$1,37 \pm 0,04$	$1,48 \pm 0,09$	1,66±0,07
	Т3	45/55	$0,74 \pm 0,07$	$0,99 \pm 0,00$	0,72±0,03
Rutin	T1	25/75	$1,1\pm 0,1$	0,58±0,08	0,29±0,03
	T2	35/65	$0,78 \pm 0,05$	0,37±0,02	$0,25 \pm 0,01$
	Т3	45/55	$0,59 \pm 0,03$	0,36±0,00	$0,14 \pm 0,01$
Resveratrol	T1	25/75	$1,12 \pm 0,05$	1,0±0,2	$1,00 \pm 0,04$
	T2	35/65	$0,98 \pm 0,04$	0,81±0,03	0,80±0,04
	Т3	45/55	$0,47 \pm 0,03$	$0,78 \pm 0,01$	0,50±0,03
Quercetin	T1	25/75	$0,53 \pm 0,01$	0,60±0,04	0,08±0,01
	T2	35/65	$0,07 \pm 0,00$	$0,19 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,00$
	Т3	45/55	0,43±0,08	0,11±0,00	0,08±0,00

* Mittelwert der C_0 (Ausgangskonzentration von jeder Substanz) in allen Emulsionen ± SD

** Mittelwert ± SD, n = 3

	C_0^* , mg/ml		0,17 ± 0,02 0,85 ± 0,08		1,6 ± 0,2
	Emulsion	O/W		D_v^{**} , cm ² h ⁻¹ ·10 ³	
PCA	S4	15/75	26,6±1,3	23,9±1,1	
	S1	25/75	9,7±0,4	10,1±0,7	8,0±1,0
	S2	35/65	7,1±0,4	7,4±0,4	3,5±0,3
	S3	45/55	5,9±0,2	4,5±0,3	3,2±0,2
Catechin	S4	15/75	27,6±1,9	24,8±1,7	
	S1	25/75	11,4±0,2	11,4±1,2	8,2±1,0
	S2	35/65	7,62±0,09	8,9±0,5	3,6±0,2
	S3	45/55	6,2±0,3	5,0±0,3	3,2±0,2
Rutin	S4	15/75	8,2±0,5	7,3±0,4	
	S1	25/75	4,8±0,2	1,35±0,08	0,67±0,09
	S2	35/65	2,67±0,01	1,38±0,09	$0,78 \pm 0,01$
	S3	45/55	2,56±0,04	0,88±0,08	0,45±0,02
Resveratrol	S4	15/75	16,3±1,3	14,7±1,2	
	S1	25/75	5,3±0,2	2,94±0,04	$1,9\pm0,3$
	S2	35/65	3,20±0,07	2,42±0,12	1,21±0,03
	S3	45/55	3,3±0,1	$1,44\pm0,11$	0,92±0,00
Quercetin	S4	15/75	1,8±0,1	1,6±0,1	
	S1	25/75	3,2±0,1	1,16±0,09	0,25 ± 0,05
	S2	35/65	2,98±0,00	0,49±0,03	$0,18 \pm 0,02$
	S3	45/55	3,2±0,4	0,36±0,02	0,27±0,00

Tabelle 6.3. Diffusionskoeffizienten der Polyphenole bei der Freisetzung aus Emulsionen S (mit Symbiomuls GC, Tabelle 6.1) mit verschiedenen O/W-Verhältnissen und Ausgangskonzentrationen

* Mittelwert der C_0 (Ausgangskonzentration von jeder Substanz) in allen Emulsionen ± SD ** Mittelwert ± SD, n = 3

6.2. Physikalische Eigenschaften der Emulsionen

Die rheologischen Eigenschaften der Emulsionen wurden gem. Kap. 8.2.4 beurteilt. Abb. 6.3 zeigt die Speicher- (*G'*) und der Verlustmoduli (*G''*) der Emulsionen T1 (emulgiert mit Tween 40-Span 40-Cetylalkohol und O/W-Verhältnis 25/75 (Tabelle 6.1). Die Emulsionen zeigten viskoelastisches Verhalten. Da der Elastizitätsmodul *G'* höher war als der viskose Modul (*G'* > *G''*), stellen die Emulsionen halbfeste Formulierungen dar. Der Schnittpunkt von *G'* und *G''* wird als Fließgrenze τ (*f*) definiert. Aus dem Diagramm ist ersichtlich, dass die Zugabe von Polyphenolen die Konsistenz der Emulsionen signifikant beeinflusst, die G' und G''-Werte nehmen dabei ab. Auch für die Fließgrenze zeigt sich ein Absinken 58 auf 33 Pa.



Abb. 6.2. Amplituden-Sweep Oszillationstest von Emulsionen T1 (Tabelle 6.1) mit O/W Verhältnis von 25/75 ohne (1) und mit 0.09 % Polyphenolen (2). G': Elastischer (Speicher-) Modul; G'': Viskoser (Verlust-) Modul; τ (f)1, τ (f)2: Fließgrenzen

Für die weitere Datenverarbeitung wurden die Mittelwerte von G' und G'' im linearen - viskoelastischen Bereich (LVB) der Kurve berechnet. Im Anhang A1 sind weitere Vergleiche der erhaltenen rheologischen Werte für verschiedene Emulsionen angeführt, die eine sehr gute Korrelation zwischen G' und G'' ($R^2 > 0.98$) und zwischen G' und G* ($R^2 > 0.99$).

In Abb. 6.3 sind die Verteilungen der Tröpfchengrößen in den Emulsionen (T1, Tabelle 6.1) mit und ohne Polyphenole dargestellt. Für die Emulsion ohne Polyphenole (1) wurde eine bimodale Tröpfchengrößenverteilung mit zwei Maxima bei 1,9 und 16,6 μm ermittelt. Die Verteilungsfunktion der Emulsion mit 0,09% Polyphenolen (2) verschob sich in die Richtung größerer Tröpfchen und wies ein Maximum bei 19,3 μm auf. Die mittleren Tröpfendurchmesser *d50*, welche dem Wert entsprechen, unter dem 50% aller Tröpfchen liegen, betrugen 4,6 bzw. 9,2 μm (für Emulsionen ohne (1) bzw. mit Polyphenolen (2)).



Abb. 6.3 Tröpfchengrößenverteilung von Emulsionen T1 (Tabelle 6.1) mit O/W Verhältnis von 25/75 ohne (1) und mit 0.09 % Polyphenolen (2)

Beim Vergleich von Abb. 6.3 mit Abb. 6.2 ist ersichtlich, dass die zugesetzten Polyphenole die Struktur von Emulsionen beeinflussen, indem die Konsistenz weniger elastisch aufgrund der Bildung von größeren Teilchen wird.

In Abb. 6.4 sind die Eigenschaften von T1-Emulsionen (Tabelle 6.1) dargestellt, die mit Einzelpolyphenolen produziert wurden, im Vergleich zu Emulsionen mit der Polyphenolmischung sowie ohne Polyphenolzugabe. Alle Substanzen beeinflussten die Emulsionsstruktur erheblich, die stärkste Strukturzerstörung fand nach der Zugabe von Resveratrol und Catechin statt. Die Emulsionen mit diesen Substanzen wiesen die niedrigsten *G'*-Werte und die höchsten *d50*-Werte. Mit Ausnahme von Quercetin, war die Abnahme der Speichermodul *G'* proportional zur Lipophilität von den entsprechenden Polyphenolen (PCA> Rutin> Catechin> Resveratrol; *log P_{ow}*-Werte von -0.33; 0,1; 0,4 bzw. 2,7 (Kap. 4.3, [104]).



Abb. 6.4 Speichermoduli (G', Mittelwert \pm SD, n = 3) und mittlere Tröpfchendurchmesser (d₅₀, Mittelwert \pm SD, n = 4) von Emulsionen T1 (Tabelle 6.1) mit O/W Verhältnis von 25/75 ohne Polyphenole (1) und mit 0.9 \pm 0.07 mg/g Polyphenolen: Mischung in gleichen Proportionen (2); Quercetin (Q), Protocatechusäure (P), Rutin (Ru), Catechin (C), Resveratrol (Res)

Beim Vergleich der Eigenschaften der Emulsion mit dem Polyphenolgemisch mit den Emulsionen mit einzelnen phenolischen Substanzen wird ersichtlich, dass der Effekt des Polyphenolgemisches auf den Elastizitätsmodul etwas stärker war als die Summe der Effekte einzelner Substanzen (mittlerer *G'*-Wert von Emulsionen mit einzelnen Polyphenolen betrug *1,41* kPa, mittlerer *d*₅₀-Wert lag bei 9,10 µm, im Vergleich zu G' = 1,30 kPa und d50 = 9,17 µm für die Polyphenolgemisch-Emulsion (2), Abb. 6.4).

In Abb. 6.5 sind die Speichermoduli und Tröpfchengrößen in Formulierungen mit unterschiedlichen O/W-Verhältnissen und Polyphenolkonzentrationen angegeben, die mit Emulgatorsystem Span 40-Tween 40-Cetylalcohol hergestellt wurden (Emulsionen T1-T3, Tabelle 6.1).



Abb. 6.5. Speichermoduli (G', Mittelwert \pm SD, n = 3) und Tröpfchengrößen (d₅₀, Mittelwert \pm SD, n = 4) in den Emulsionen T (Span 40-Tween 40-Cetylalcohol, Tabelle 6.1) mit unterschiedlichen O/W-Verhältnissen als Funktion der Polyphenolkonzentration

Speichermoduli *G'* von den Emulsionen, die ohne Polyphenole hergestellt wurden ($C_0 = 0$), zeigten eine lineare Proportionalität zum O/W-Verhältnis in der Emulsion ($\Delta G'$ betrug ca. 1,57 kPa pro 10 %-igen Anstieg des Ölgehaltes, Abb. 6.6). Im Zentrifugentest waren die Emulsionen bei höchster Drehzahl (13.400 rpm) noch stabil. Nach Zugabe von Polyphenolen, sanken die Speichermoduli *G'* der Emulsionen bei allen untersuchten O/W-Verhältnissen. Die Öltröpfchen vergrößerten sich dabei teilweise deutlich, was zu einem Verlust der Emulsionen mit höheren Ölgehalten (35 und 45 %) und einer Polyphenolkonzentration von 0,4 % festgestellt. Die Stabilität dieser Emulsionen war sehr niedrig, sie konnte im Zentrifugentest bei niedrigster Einstellung gespalten werden. Nach der weiteren Erhöhung der Polyphenolkonzentration stieg die Elastizität der Emulsionen, *G'*-Werte von Emulsionen mit 0,8 % Polyphenolen waren sogar höher als die *G'*-Werte von Emulsionen ohne Polyphenole. Die mittleren Tröpfchendurchmesser *d*₅₀ wurden kleiner, was zu einer erhöhten Zentrifugentstabilität führte (bis 5.000 rpm für die Emulsion T3 mit O/W-Verhältnis von 45/55, und über 13.400 rpm für die Emulsionen mit niedrigerem Ölgehalt).



Abb. 6.6. Abhängigkeit der Speichermoduli vom Gehalt der Ölphase in den Emulsionen S und T ohne Polyphenole

In Abb. 6.7 sind die physikalischen Eigenschaften der Emulsionen S (Tabelle 6.1) dargestellt, die mit dem gemischten Emulgator Symbiomuls GC unter Variation des O/W-Verhältnisses und der Polyphenolkonzentrationen hergestellt wurden. Die dargestellten Speichermoduli und Tröpfchengrößen der Emulsionen S verlaufen völlig anders als die entsprechenden Kurven für die Emulsionen T.

Im Gegensatz zu den Emulsionen T, konnte die Abhängigkeit der Speichermodule der Emulsionen S von den O/W-Verhältnissen als Potenzfunktion beschrieben werden ($G' = m \cdot C_{op}^{n}$, wobei C_{op} der Ölphasenanteil ist, Abb. 6.6). Diese Art von Abhängigkeit könnte sowohl für die Emulsionen ohne Polyphenole, als auch für die jeweiligen Polyphenolkonzentrationen festgestellt werden.



Abb. 6.7 Speichermoduli (G', Mittelwert \pm SD, n = 3) und Tröpfchengrößen (d₅₀, Mittelwert \pm SD, n = 4) in den Emulsionen S (mit Symbiomuls GC, Tabelle 6.1) mit unterschiedlichen O/W-Verhältnissen als Funktion der Polyphenolkonzentration

Der Einfluss der Polyphenole auf die Eigenschaften der Emulsionen S war nicht so stark ausgeprägt wie bei den Emulsionen T, und wies einen entgegengesetzten Charakter auf. Die Zugabe von Polyphenolen verursachte eine leichte Erhöhung der Speichermodule, die für die Emulsionen mit höheren O/W-Verhältnissen stärker ausgeprägt war. Allerdings sanken die G'-Werte bei einer Polyphenolkonzentration von 1 % wieder ab. Eine Zunahme der mittleren Tröpfchengröße wurde nur für die Emulsionen mit der Polyphenolkonzentration von 0,1 % festgestellt.

Im Allgemeinen waren die von den Polyphenolen in unterschiedlichen Konzentrationen verursachten Veränderungen bei den Emulsionen S nicht so stark ausgeprägt wie bei den Emulsionen T. Außerdem waren diese Änderungen in den Formulierungen S eher positiv, denn sie führten zu einer erhöhten Elastizität und in einer verbesserten Stabilität der Emulsionen. Die Zentrifugenstabilität der Emulsionen S war vom Ölgehalt abhängig, nicht aber von der Polyphenolkonzentration. Emulsionen mit O/W-Verhältnissen von 15/85 und 25/75 waren bei 3.000 und 6.000 rpm stabil, Emulsionen mit höheren O/W-Verhältnissen waren auch über 13.400 rpm noch stabil.

6.3. Lagerstabilität von Polyphenolen in Emulsionen

Neben der Stabilität der Emulsionen war auch zu prüfen, ob die phenolischen Verbiundungen in den Emulsionen für einen längeren Zeitraum stabil vorliegen, um auch nach längerer Lagerdauer noch ihre Funktion entfalten zu können. Aus diesem Grund erfolgten Lagertests bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Lagerstabilität der Polyphenole in den Emulsionen nach 4 Monaten Lagerzeit bei 40 °C ist in Abb. 6.8 dargestellt.



Abb. 6.8. Stabilität von Polyphenolen in den Emulsionen T und S (Tabelle 6.1) nach 4 Monaten Lagerung bei 40 °C, Mittelwerte \pm SD, n = 3. Gesamtpolaphenolkonzentrationen in den Emulsionen: C1: 0,09 \pm 0,01 %; C2: 0,45 \pm 0,04 %; C3: 0,89 \pm 0,06 % (wt.)

Die Stabilität der Polyphenole bei 40 °C war von ihrer Konzentration in der Formulierung abhängig. Polyphenole waren stabiler bei höheren Konzentrationen, was auf eine gewisse Selbststabilisierung hindeutet. Für die Emulsionen S konnte kein Einfluss des O/W-Verhältnisses auf die Polyphenolstabilität festgestellt werden. Im Fall der Emulsionen T sank die Lagerstabilität von Polyphenole bei der Erhöhung des Ölphasenanteils in den Emulsionen. Dieses Verhalten war besonders ausgeprägt bei den Emulsionen T mit den niedrigsten Ausgangskonzentrationen von Polyphenolen (C1). Die Stabilität einzelner Substanzen verringerte sich in der Reihe Quercetin > PCA > Rutin > Resveratrol > Catechin (Anhang A2, Tabelle A.1).



Abb. 6.9. Stabilität von Polyphenolen in den Emulsionen T und S (Tabelle 6.1) nach 4 Monaten Lagerung bei 5 °C, Mittelwerte \pm SD, n = 3. Gesamtpolaphenolkonzentrationen in den Emulsionen: C1: 0,09 \pm 0,01 %; C2: 0,45 \pm 0,04 %; C3: 0,89 \pm 0,06 % (wt.)

Nach der Lagerung bei 5 °C (Abb. 6.9) und 20 °C (Abb. 6.10) betrug die Stabilität der Polyphenole in allen untersuchten Emulsionen über 90 %. Die Stabilität einzelner Polyphenole ist ergänzend in Anhang A2 zu finden.



Abb. 6.10. Stabilität von Polyphenolen in den Emulsionen T und S (Tabelle 6.1) nach 4 Monaten Lagerung bei 20 °C, Mittelwerte \pm SD, n = 3. Gesamtpolaphenolkonzentrationen in den Emulsionen: C1: 0,09 \pm 0,01 %; C2: 0,45 \pm 0,04 %; C3: 0,89 \pm 0,06 % (wt.)

6.4. Diskussion

Nach der Einarbeitung der Polyphenole in die Sonnenblumenöl-Emulsionen wurde die Veränderung der physikalischen Eigenschaften der Emulsionen untersucht (Kap. 6.2). Die Anwesenheit von Polyphenolen beeinflusste die Konsistenz und Stabilität der Emulsionen T negativ, so dass deren Konsistenz weniger elastisch und flüssiger wurde (Abb. 6.5). Auch Pilpel et al. untersuchten O/W-Emulsionen mit Sonnenblumenöl, Span 40 und Tween 40 [129] und konnten die Ausbildung flüssigkristalliner Phase ermitteln. Flüssige lamellare Kristalle führten dabei zur zusätzlichen Stabilisierung der Emulsionströpfchen und verhinderten die Koaleszenz. Die Emulsionen mit ≥ 5 % (wt.) Emulgatoren wiesen Viskoelastizität auf, die vom Verhältnis zwischen Span 40 und Tween 40 (mit dem Optimum zwischen 6:4 und 7:3, wt.) sowie vom Öl- und Emulgatorgehalt abhängig war. Die im Kap. 6.2 untersuchten Emulsionen zeigten ebenso ein viskoelastisches Verhalten, die Speichermodule stiegen mit zunehmendem Ölgehalt. Der Polyphenolgehalt beeinflusste die Emulsionseigenschaften ganz erheblich, insbesondere von Emulsionen T (mit Span 40 und Tween 40 im Verhältnis 6,7:3,3, wt.).

Eine sinkende Viskosität von Emulsionen mit pflanzlichen phenolischen Extrakten wurde auch von Di Mambro et al. beschrieben [130]. Jedoch enthielten die flüssigen Extrakte in dieser Studie bis zu 10 % Protein. Aus diesem Grund führten die Forscher die Verminderung der Viskosität einerseits auf eine mögliche spontane Adsorption von Proteinen an der Öl-Wasser-Grenzfläche zurück, die zu einer Verringerung der Oberflächenspannung und zur Bildung einer größeren Grenzfläche in der Emulsion führen kann. Andererseits wurde ein Verdünnungseffekt durch die unterschiedliche Viskosität der zugesetzetn Extrakte als Ursache diskutiert [130]. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Emulsionen enthielten keine Proteine, zudem kann ein Verdünnungseffekt ausgeschlossen werden, da bei der Herstellung der Emulsionen ohne Polyphenole eine äquivalente Menge von Glycerin-Wasser ergänzt wurde.

Darüber hinaus wurden die Minima der G'-Werte (Speichermodule) und der Stabilität der Emulsionen T bei den Polyphenolkonzentrationen von ca. 0,4 % beobachtet (Abb. 6.5). Durch eine weitere Erhöhung der Polyphenolkonzentration stiegen die G'-Werte wieder an, die

97

Größe der Öltröpfchen verringerte sich und die Emulsionen wurden damit stabiler. Erstaunlicherweise stieg die Stabilität der Emulsionen T mit höheren Polyphenolkonzentrationen (0,8 %) trotz des größer werdenden Tröpfchendurchmesser an. Dieses Verhalten legt die Bildung von Pickering-Emulsionen nahe, für deren Ausbildung feinster unlöslicher Komponenten erforderlich sind, wie ungelöste Polyphenole, die in den höheren Mengen durch den Emulgator offenbar nicht solubilisiert werden können. Für einige Flavonoide, insbesondere für Rutin, wurde eine stabilisierende Wirkung auf Emulsionen beschrieben. Unlösliche Flavonoide konnten auf der O/W-Grenzfläche adsorbiert werden und fungierten als Stabilisatoren durch die Bildung von Pickering-Emulsionen [19, 124].

Beim Vergleich der physikalischen Eigenschaften der Emulsionen mit zwei unterschiedlichen Emulgatorsystemen, wurden einige Wechselwirkungen der Polyphenole mit den Emulgatoren ersichtlich. So, für die Emulsionen S, die Glycerylstearatcitrat, Cetearylalkohol und Glycerylcaprylat enthält, keine Destabilisierung durch Zugabe von Polyphenolen beobachtet, während die Emulsionen T mit Tween 40, Span 40 und Cetylalkohol erheblich destabilisiert wurden (Abb. 6.5, Abb. 6.7).

In der Literatur sind zahlreiche Referenzen zu finden, in denen Wechselwirkungen von Polyphenolen mit Proteinen beschreiben werden. In der Regel schließen diese Wechselwirkungen reversible Komplexierung durch nicht-kovalente Bindungen (Wasserstoffbrücken, hydrophobe Bindung, van-der-Waals-Bindung) bzw. irreversible Aggregation mit Bildung von kovalenten Bindungen ein [122, 131]. Die Wechselwirkungen zwischen Polyphenolen und anderen Makromolekülen wie Polysacchariden, sind aufgrund ähnlicher Mechanismen ebenso möglich [131]. Einige ionische Polysaccharide wie Xanthan oder Pectin können Protein-Polyphenol-Interaktionen inhibieren. Möglicherweise kann Xanthan durch die Entstehung eines gelartigen Netzwerkes in Lösung hydrophobe Einschlüsse bilden und ist somit in der Lage, Polyphenole zu verkapseln und zu komplexieren. Darüber hinaus wird auch eine Bindung zwischen Kohlenhydraten und Polyphenolen beschrieben [131-133].

Es ist daher anzunehmen, dass Wechselwirkungen zwischen Polyphenolen und Xanthan auftreten können. Xanthan wird Emulsionen zugesetzt, um deren Viskosität und Stabilität zu erhöhen. Es verhindert das Aufrahmen der Emulsionen durch seine Gelbildung in wässriger Phase, stabilisiert Öltröpfchen und führt zu höheren Oxidationsstabilität [134]. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Emulsionen (T und S, Tabelle 6.1) enthielten jedoch die gleiche Menge an Xanthan, bezogen auf die Wasserphase (0,267 %). Deswegen können mögliche Polyphenol-Xanthan-Wechselwirkungen nicht erklären, warum unterschiedliche Effekte bei der Zugabe von Poylphenolen zu Emulsionen mit zwei verschiedenen Emulgatoren auftreten. Es wird vielmehr davon ausgegangen, dass diese Effekte durch die Unterschiede in der chemischen Struktur der Emulgatoren verursacht werden.



Abb. 6.11. Glycerylstearatcitrat (Citronensäureester von Monostearin)

Die Hauptkomponente von Symbiomuls GC, Glycerylstearatcitrat (Citronensäureester von Glycerinmono- und –distearat, Abb. 6.11) ist ein anionischer Emulgator in der Regel mit zwei Carboxylgruppen [135]. Die in Polyphenol-Molekülen (Abb. 4.1) enthalteten OH-Gruppen führen dazu, dass diese leicht sauer reagieren (mit Bildung von -O⁻Anionen in wässrigen Medium). Somit können ionische Wechselwirkungen zwischen Citronensäureester und Polyphenolen ausgeschlossen werden. Dies wird auch durch die Tatsache bestätigt, dass Polyphenole eine stabilisierende Wirkung auf Emulsionen S (Abb. 6.7) aufwiesen. Höhere Diffusionsraten von Polyphenolen in diesen Emulsionen im Vergleich zu Formulierungen T (Abb. 6.1) deuten ebenso darauf hin, dass die Solubilisierung von Phenolen mit Emulgator auf Grund von schwachen hydrophoben Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrücken und nicht durch die stärkere ionische Kräfte auftritt.

Der gegenteilige Effekt wurde für Emulsionen T beobachtet, die nicht-ionische Tenside Sorbitanmonopalmitat und sein Polyoxyethylenderivat enthalten (Abb. 6.12).


Abb. 6.12. Sorbitanmonopalmitat (Span 40), links, und Polyoxyethylen(20)-Sorbitanmonopalmitat (Tween 40), rechts. w+x+y+z = 20 [136]

In einigen Studien wurde beschrieben, dass in O/W-Emulsionen, die einen Überschuss an nicht-ionischen Emulgatoren enthalten, diese mit der kontinuierlichen Wasserphase ein Gelnetzwerk mit gequollenen Doppelschichtstrukturen ausbilden. Diese können die rheologischen Eigenschaften der Emulsionen beeinflussen. Wenn der Emulgator aus nicht-ionischen Tensiden mit Polyoxyethylenketten besteht (wie Tween 40), tritt die Quellung durch die Hydratation dieser Ketten auf, die in die intralamellaren Wasserschichten ausgerichtet sind [16, 137]. Das Quellverhalten und die rheologischen Eigenschaften der Emulsionen sind somit von den Polyoxyethylenketten des Tensids abhängig.

Wie in der Arbeit von Stöckmann et al. [138] für Derivate der Hydroxybenzoesäuren, die mit nichtionischen Brij 58 (Polyoxyethylen(20)-Cetylether) emulgiert wurden, gezeigt wurde, zieht die diffuse Umgebung, an der die Sauerstoffatome der Polyoxyethylenketten in Brij 58 beteiligt sind, die Phenole an, so dass diese tiefer in die Umgebung von Polyoxyethylen eindringen [138]. Im Rahmen einer Studie von Liu et al. zur Solubilisierung von Quercetin mit dem nicht-ionischen Tensid Triton X-100 (Polyoxyethylenoctylphenylether) konnte gezeigt werden, dass die Lokalisierungsposition von Quercetin in Mizellen der B-Ring in Quercetin-Molekül ist, und dass die Wechselwirkung tritt wahrscheinlich auf Grund der schwachen intermolekularen (hauptsächlich hydrophoben) Kräfte auf [20].

Analog kann angenommen werden, dass sich Polyphenole in den Emulsionen T ebenso an den Polyoxyethylen-Ketten von Tween 40-Molekülen anlagern und dadurch die hydrophilen Zentren der Emulgatormoleküle blockieren und diese damit weniger wirksam für der Stabilisierung von O/W-Emulsionen machen. Allerdings wäre es zur Untermauerung dieser Theorie wünschenswert den genauen Mechanismus der Polyphenol-Tensid-Wechselwirkungen zu klären.

Bei einer Untersuchung von Flavonoidsolubilisierung in Tween 80-Mizellen (Polyoxyethylensorbitan Monooleat) wurde aufgeklärt, dass die Solubilisierungsgrad von chemischer Struktur von Flavonoiden abhängt [18]. So, Naringenin mit einem Knick in seiner Molekülstruktur (Abb. 2.11), und Rutin (mit Rutinose verestertes Quercetin, Abb. 4.1), was diesen beiden Moleküle einen leicht amphiphilen Charakter verleiht, konnten in relativ stabile Mizellen eingearbeitet werden, im Gegensatz zu Quercetin, das eher eine planare Struktur hat (Abb. 4.1). Daher wird erwartet, dass Emulsionen mit Rutin stabiler sein sollten, als Emulsionen mit Quercetin.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Untersuchung zur Auswirkung einzelner Substanzen auf die Eigenschaften von Emulsionen mit Span 40-Tween 40-Cetylalkohol (T) (Abb. 6.4) durchgeführt. Die Abnahme der Speichermodule und der Stabilität war proportional zur Lipophilie der eingesetzten Polyphenole, was in Übereinstimmung mit der Studie von Richards et al. ist [139], in der die Solubilisierung phenolischer Antioxidantien durch nichtionische Tensidmizellen untersucht wurde. Diese war abhängig von der Polarität, wobei unpolaren Substanzen weniger solubilisiert werden konnten als polare.

Die einzige Ausnahme war Quercetin (Abb. 6.4), bei dessen Zugabe stabilere Emulsion gebildet wurde als bei der Zugabe aller anderen Polyphenolen, inklusive Rutin, im Gegensatz zu oben erläuterten Erwartung. Zusätzlich wurde ein "synergistischer" Effekt beobachtet, d. h. die Wirkung der Mischung phenolischer Verbindungen auf die Emulsionseigenschaften war etwas stärker als die Summe der Wirkungen einzelner Polyphenole. Die Vertreter verschiedener Polyphenolklassen mit unterschiedlicher Polarität und lipophilen-hydrophilen Eigenschaften können durch die Unterschiede in der molekularen Struktur somit offensichtlich in verschiedene physikalisch-chemische Wechselwirkungen mit nicht-ionischen oder anionischen Tensiden einbezogen werden. Die Mechanismen dieser Wechselwirkungen sind bis jetzt bei Weitem noch nicht so intensiv untersucht, wie die Polyphenol-Protein-Wechselwirkungen oder biochemischen Eigenschaften der Polyphenole. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Wechselwirkungen die Funktionalität der Tenside beeinflussen und bei der Herstellung von kosmetischen Emulsionen einen wesentlichen Faktor darstellen. So verleihen die Polyphenole in Emulsionen S, die Glycerylstearatcitrat, Cetearylalkohol und Glycerylcaprilate (Symbiomuls GC) als Emulgator enthalten, eher eine stabilisierende Wirkung, die wahrscheinlich durch die Bildung von Pickering-Emulsionen zu erklären ist, wie oben bereits beschrieben [19, 124].

Die Lokalisierung der Antioxidantien in Emulsionen (in der Wasser- oder Ölphase, an der Grenzschicht) ist außerdem ein wichtiger Faktor ihrer Aktivität. Das sog. "polare Paradox" besagt, dass nicht-polare Antioxidantien eine höhere Aktivität in Emulsionen mit einer kontinuierlichen Wasserphase aufweisen und umgekehrt [140]. Wie in Kap. 4.3 beschrieben, sinkt die Lipophilität der Polyphenole in der Reihe Resveratrol = Quercetin > Catechin > Rutin > PCA. Allerdings konnten die log P_{ow} -Werte nicht mit der entsprechenden Radikalfänger-Aktivität oder mit der Hemmung von Lipidoxidation korreliert werden. Daher konnte das "polare Paradox" durch diese Arbeit weder bestätigt noch widersprochen werden.

Ein weiterer wichtiger Faktor zur Bewertung topischer Formulierungen ist die Fähigkeit der Wirkstoffe, die Hautbarriere zu durchdringen. In Kap. 5 wurde die Untersuchung der Permeation von Polyphenolen *in-vitro* durch exzidierte Schweinehaut beschrieben, dabei wurde eine gute Korrelation zwischen der Permeation und der Wirkstofffreisetzung aus kosmetischen Emulsionen erhalten. Die Messung der Wirkstofffreisetzung aus topischen Formulierungen ist ein etabliertes Verfahren zur vorläufigen Beurteilung der Bioverfügbarkeit von Wirksoffen und für ein Screening experimenteller Formulierungen [17]. Normalerweise werden in den Freisetzungsversuchen entweder Diffusionskoeffizienten innerhalb der Vehikel D_v oder anfängliche Freisetzungskoeffizienten K_r bestimmt [12, 15]. In dieser Arbeit wurden für den Vergleich der Formulierungen die Diffusionskoeffizienten von Polyphenolen herangezogen.

Ähnlich wie im Kap. 5.2 beschrieben, wurden höhere Diffusionsraten für Polyphenole in den Emulsionen mit niedrigerem Ölgehalt ermittelt (Abb. 6.1). Auch andere Autoren beschrieben eine erhöhte Freisetzung phenolischer Substanzen aus Formulierungen mit höherem Wassergehalt [17, 106, 117, 125]. Dieses Verhalten könnte mit der höheren Viskosität von Emulsionen mit höherem Ölgehalt in Verbindung gebracht werden, die zu einer niedrigeren Diffusion in den Emulsionen führt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch keine lineare Proportionalität zwischen den Speichermodulen und Diffusionskoeffizienten erhalten, was diese These nicht untermauert. Daher erscheint es wahrscheinlicher, dass unterschiedliche Zusammensetzungen der Vehikel-Emulsionen auch zu einer Veränderung von *D_V* führen. In den Emulsionen S (mit Symbiomuls GC) bei den gleichen O/W-Verhältnissen wurden bis zu 8mal höhere Diffusionsraten der Polyphenole ermittelt als in den Emulsionen T (mit Span 40-Tween 40-Cetylalkohol). Dieses Verhalten wurde trotz der höheren Speichermodule der S-Emulsionen beobachtet (besonders bei höheren O/W-Verhältnissen (35/65 und 45/55)). Wie oben bereits diskutiert, wurden Emulsionen S vermutlich durch die Bildung von Pickering-Emulsion besser stabilisiert, d. h., die nicht gelösten Polyphenole lagerten sich an der O/W-Grenzfläche an, was zu einer erhöhten Emulsionsstabilität führte [19, 124]. Somit ist davon auszugehen, dass die Polyphenole nicht chemisch gebunden wurden und daher leichter freigesetzt werden können. Im Gegensatz dazu, wenn die Polyphenole in den T-Emulsionen mit den Polyoxyethylenketten von Tween 40 mit Wasserstoffbrücken gebunden werden, führt das einerseits zu einer verringerten Emulsionsstabilität, und behindert außerdem aufgrund höheren Bindungskräften die Freisetzung von Polyphenolen.

Polyphenole sind in der Literatur als sehr empfindlich und instabil beschrieben [6]. Daher ist es wichtig, ihre Stabilität in der Formulierung während der Lagerung zu untersuchen. Die Lagerstabilität von Polyphenolen in Emulsionen verhielt sich in einem beschleunigten Test (4 Monate bei 40 °C) proportional zu ihrer Konzentration (Abb. 6.8). Das kann dadurch erklärt werden, dass der während der Herstellung in die Emulsionen eingebrachte Sauerstoffgehalt in allen Emulsionen nahezu gleich ist und wird von einer gewissen Menge an Polyphenolen abgefangen. Je mehr Polyphenole in der Emulsion enthalten sind, desto weniger (prozentuell gesehen) werden in die Oxidationsvorgänge miteinbezogen. Dies kann als eine selbsstabilisierende Wirkung von Polyphenolen betrachtet werden. Ein Einfluss des O/W-Verhältnisses auf die Lagerstabilität von Polyphenolen wurde nur für die Emulsionen T beobachtet, dieser Effekt ging mit abnehmender Emulsionsstabilität bei höheren Polyphenolkonzentrationen einher. Das Öl in diesen Emulsionen T wurde nicht zufriedenstellend emulgiert, was die Bildung sehr großer Öltröpfchen zur Folge hatte (Abb. 6.5) und das Öl anfälliger für Oxidation wurde. Gohtani et al. [134] berichten, dass bei dem Aufrahmen einer Emulsion die Oxidation viel schneller stattfindet. Dies liegt daran, dass die Öltröpfchen sehr nah zu einander liegen und zum Teil direkt an der Oberfläche, wo sie Kontakt zum Luftsauerstoff haben. Außerdem werden durch die großen Öltröpfchen die Kettenreaktionen begünstigt. Allerdings, wenn die Öltröpfchen sehr klein sind, macht das die Emulsion wieder Anfälliger zur Oxidation, denn die Oberfläche wird größer [134]. Dieser Effekt wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Polyphenole einen deutlichen Einfluss auf Emulsionseigenschaften wie Rheologie und Stabilität zeigen. Auf der einen Seite sind es Interaktionen mit dem Emulgator, die zu einer stabilen oder instabilen Emulsion nach Zugabe der phenolischen Verbindungen führen. Daher sollte für stabile kosmetische Produkte ein Emulgator ausgewählt werden, der mit Polyphenolen nicht oder nur wenig wechselwirkt, wie z. B. Glycerylstearatcitrat. Weiterhin zeigte sich, dass mit stabilieren Emulsionen höhere Freisetzungsraten erzielt werden können, so dass eine bessere Verfügbarkeit der Polyphenole für die Freisetzung in die Haut gewährleistet ist.

7. Humanuntersuchung zur Evaluierung der Wirksamkeit einer Polyphenol-haltigen Formulierung

Um erste Hinweise zu bekommen, ob die erhaltenen in-vitro Ergebnisse zum antioxidativen Potenzial der Polyphenole auf kosmetische Anwendungen übertragen werden können, wurde eine *in-vivo* Untersuchung durchgeführt. In dieser Untersuchung wurde die Auswirkung einer Resveratrol-haltigen kosmetischen Emulsion auf biophysikalische Hautparameter wie Elastizität, Feuchtigkeit und Rauheit getestet. Resveratrol wurde ausgewählt, da es in der Literatur als hoch potente Substanz für topische Anwendungen gilt [106]. Allerdings wurde der Effekt der topischen Applikation auf die biophysikalischen Hautparameter bis jetzt nicht ausreichend untersucht, was die Relevanz der vorliegenden Untersuchung bestätigt.

7.1. Durchführung der Untersuchung

Es handelte sich um eine monozentrische doppelblinde prospektive Studie. Die Probanden gaben eine Einverständniserklärung ab (Anhang A3), nachdem sie ausreichend über die Studiendurchführung und über die Risiken informiert worden waren (Anhang A4).

7.1.1. Design

Am ersten Tag der Untersuchung wurden Ausgangswerte der biophysikalischen Hautparameter ermittelt. Die Probanden wurden gebeten, am Tag der Messung keine Hautpflegeprodukte und kein Make-up zu verwenden. Nach einer Akklimatisationszeit von 15 min bei 20 °C und 40 % relativer Feuchte (RF) wurden Hautelastizität, Feuchtigkeit, TEWL, Rauheit auf den getesteten Hautarealen (Unterarme, Stirn) wie in den Kapiteln 8.4.1, 8.4.2 und 8.4.3 beschrieben, gemessen.

Anschließend wurden den Probanden je 2 Cremedosen (Polyphenol-haltige Creme und Vehikel, verschlüsselt) ausgeteilt und die Anwendung erklärt. Folgende Schritte waren durchzuführen:

- Auftragen jeden Tag morgens und abends am linken bzw. rechten Unterarm und an der Stirn (Abb. 7.1). Dabei wird eine Creme stets links, und die andere stets rechts aufgetragen (verschlüsselt).

- Auftragsmenge: ca. 0,1 g auf den Unterarm, 0,05 g auf die Stirn, die Creme so lange einreiben, bis sie eingezogen ist.

- Gewöhnliche Hautreinigungsprodukte verwenden; die Testcremes erst ca. 10 min nach der Reinigung (Duschen) applizieren.

- Keine anderen Hautpflegeprodukte an den getesteten Arealen verwenden.



Abb. 7.1. Applikation von kodierten Testformulierungen

Die Anwendungsdauer betrug 8 Wochen, eine Evaluierung der Hautparameter erfolgte nach 2, 4 und 8 Wochen (Abb. 7.2). An den Messtagen wurden die Probanden gebeten, kein Make-up aufzutragen und die Testcremes spätestens 2 h vor der Messung zu applizieren.



Abb. 7.2. Design der *in-vivo* Untersuchung. Biophysikalische Hautparameter am Tag 0 wurden vor der Applikation der Emulsionen gemessen. Die Wirkstoff- und die Vehikel-Formulierung wurden von jeder Person stets links bzw. rechts aufgetragen (verschlüsselt).

7.1.2. Probanden

An der Untersuchung nahmen 18 gesunde erwachsene Freiwillige teil. <u>Einschlusskriterien</u> waren Hauttyp nach Fitzpatrick I-IV [2], über 30 Jahre, Verlust der Hautelastizität. Zu <u>Aus-</u> <u>schlusskriterien</u> gehörten akute Hautkrankheiten, Allergien gegen Komponenten der Creme, Schwangerschaft oder Stillzeit.

Eine Anamnese bezüglich Krankheiten (Hautkrankheiten), Allergien wurde vorgenommen. Die Daten wurden anonymisiert gespeichert. Aus 20 Freiwilligen wurden 2 Personen ausgeschlossen, da sie akute Hautprobleme hatten (Neurodermitis bzw. eine Pilzinfektion).

Zu Beginn der Untersuchung wurde ein Patch-Test auf Verträglichkeit durchgeführt. Hierzu wurde das Produkt auf den Unterarm appliziert, mit einem Pflaster zugeklebt und für 24 h auf der Haut belassen. Das Testareal wurde über 96 h nachbeobachtet. Im Falle einer Reaktion müsste die Person aus der Untersuchung ausgeschlossen werden. Bei keiner der Testpersonen trat eine Unverträglichkeitsreaktion auf.

Das mittlere Alter der Probanden betrug $43,3 \pm 9,3$ Jahre, der mittlere Body-Mass-Index (BMI) lag bei 25,1 \pm 3,7. Die Verteilung des Alters, des Hautphototyps nach Fitzpatrick [2] sowie der BMI-Werte ist in Tabelle 7.1 dargestellt.

Altersgruppen		30-39	40-49	50-59	>60
	Ν	7	5	5	1
Hauttyp		I	II	III	IV
	Ν	1	6	10	1
BMI		<18,5	18,5-25,0	25,1-30	>30
	Ν	1	8	8	1

Tabelle 7.1. Verteilung der Probanden nach dem Alter, dem Hauttyp und BMI

N – Anzahl der Probanden

7.1.3. Testemulsionen

Die Testemulsionen wurden gemäß Kap. 8.2.1 (1, 2) hergestellt. Die genaue Zusammensetzung zeigt Tabelle 7.2.

Tabelle 7.2	. Zusammensetzung de	r Testemulsionen
-------------	----------------------	------------------

		Rsv	Veh
Phase A	Wasser	ad.100	ad.100
	Xanthan	0,20	0,20
	Dermofeel 1388	2,00	2,00
Phase B	Symbiomuls GC	5,00	5,00
	MCT Oil	5,00	5,00
	Cetiol MM	5,00	5,00
	Sonnenblumenöl	10,00	10,00
Phase C	Resveratrol	0,50	0,00
	Glycerin-Wasser (1:1, wt.)	6,00	6,00

Rsv, Resveratrol-haltige Formulierung

Veh, Vehikel-Formulierung

Nach der Herstellung wurden die Emulsionen in ca. 15-g-Portionen aufgeteilt und in 20-ml-Spezialkruken (Wepa Apothekenbedarf GmbH, Hillscheid) gefüllt. Diese sind mit einem Drehsystem ausgerüstet und ermöglichen eine möglichst berührungslose Entnahme. Da es nahezu keinen Kopfraum im System gibt, ist der Kontakt der Emulsion mit Luftsauerstoff minimal. Die 36 Cremedosen wurden mit einer 3-Stelligen Zufallszahl kodiert und an die Probanden so verteilt, dass weder für die Probanden noch für die Prüferin ersichtlich war, in welcher Dose sich die Wirkstoff- und in welcher sich die Vehikel-Formulierung befand. Bei der Aufschlüsselung nach Beendigung der Untersuchung ergab sich, dass 6 Probanden die wirkstoffhaltige Creme auf der linken und Vehikel auf der rechten Seite, und 12 Probanden vice versa aufgetragen hatten.

7.2. Sensorische Bewertung

Um sicher zu stellen, dass die Probanden die wirkstoffhaltige Formulierung von dem Vehikel nicht unterscheiden können, wurden diese sensorisch bewertet. Hierzu erhielten die Probanden zu Beginn der Untersuchung Fragebögen. Die entsprechenden sensorische Profile sind in Abb. 7.3 dargestellt.



Abb. 7.3. Sensorische Profile der getesteten Emulsionen. Rsv, Resveratrol-haltige Emulsion, Veh, Vehikel.
Erläuterungen zur Bewertungsskala: <u>Homogenität</u>: 0: inhomogen, 10: homogen; <u>Farbe</u>: 0: weiß, 10: farbig; <u>Glanz</u>: 0: matt, 10: glänzend; <u>Konsistenz</u>: 0: flüssig, 10: fest; <u>fadenziehend</u>: 0: wenig, 10: stark; <u>Verteilbarkeit</u>: 0: schlecht, 10: gut; <u>Einziehbarkeit</u>: 0: schlecht, 10: gut; <u>Klebrigkeit</u>: 0: nicht klebrig, 10: klebrig; <u>Feuchtigkeitsspendend</u>: 0: wenig, 10: stark; <u>Beliebtheit</u>: 0: mögen, 10: ablehnen.

Abb. 7.3 macht deutlich, dass die Profile beider Cremes nahezu identisch waren. Für keinen der Parameter ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Formulierungen (zweiseitiger t-Test, n = 18, α = 0,05).

7.3. Auswirkung der Testformulierungen auf die biophysikalischen Hauteigenschaften

7.3.1. Hauttopographie

Während der Studie wurde die Hauttopographie mittels des kontaktlosen optischen Messgerätes (PRIMOS Pico) beurteilt. Es wurden die in Kap. 2.2.2 beschriebenen Rauheitsparameter bestimmt. Im Folgenden werden ausgewählte Ergebnisse dargestellt, und zwar die Flächenrauheit und die Sternrauheit (arithmetische Mittelrauwerte Sa, Ra) von Unterarmen und Stirn sowie die Veränderung der mittleren Faltentiefe (Stirnfalten). Im Anhang A5 sind Auswertungen zu weiteren Rauheitsparameter aufgeführt.



Abb. 7.4. Flächenrauheit von Unterarmen vor (Tag 0), während (2, 4 Wochen) und nach der Applikation der Creme.. Sa, arithmetischer Rauwert, 95 % Konfidenzintervall. Rsv, Resveratrol-haltige Formulierung, Veh, Vehikel. *Signifikante Unterschiede zu dem Tag 0, # Signifikante Unterschiede zwischen den Formulierungen, zweifaktorielle ANOVA, paarweiser Vergleich mittels Tukey-Tests, $\alpha = 0,05$, N = 15

Die Flächenrauheit der Haut an den Unterarmen (Sa) sank bereits nach 4 Wochen Applikation der Resveratrol-Creme signifikant. Die Sternrauheitswerte (Ra, Abb. 7.5) ergaben hingegen keine signifikanten Veränderungen weder im vorher/nachher Vergleich, noch bei dem Vergleich der Formulierungen untereinander.



Abb. 7.5. Sternrauheit von Unterarmen vor (Tag 0), während (2, 4 Wochen) und nach der Applikation der Creme. Ra, arithmetischer Rauwert, 95% Konfidenzintervall. Rsv, Resveratrol-haltige Formulierung, Veh, Vehikel; N = 15

Die Flächenrauheit der Stirn (Sa) ist in Abb. 7.6 dargestellt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede während und nach der Applikation beider Formulierungen.



Abb. 7.6. Flächenrauheit der Stirn vor (Tag 0), während (2, 4 Wochen) und nach der Applikation der Creme. Sa, arithmetischer Rauwert, 95% Konfidenzintervall. Rsv, Resveratrol-haltige Formulierung, Veh, Vehikel; N = 12



Abb. 7.7. Mittlere Tiefe der Stirnfalten vor (Tag 0), während (2, 4 Wochen) und nach der Applikation der Creme (8 Wochen), 95% Konfidenzintervall. Rsv, Resveratrol-haltige Formulierung, Veh, Vehikel; N = 12

Abb. 7.7 stellt die mittlere Tiefe der gemessenen Stirnfalten dar. Es ist ersichtlich, dass es während und nach der Applikation beider Testformulierungen zu keinen signifikanten Veränderungen kam.

7.3.2. Mechanische Hauteigenschaften

Die Messung der mechanischen Eigenschaften der Haut wurde wie in Kap. 8.4.1 beschrieben, durchgeführt. Als Zielgrößen wurden die folgenden Parameter ermittelt: die Dehnbarkeit der Haut R0 (der reziproke Wert der Festigkeit), die Bruttoelastizität R2, die Hautermüdung R9, die Fläche F0 (umgekehrt proportional zur Elastizität) und R6, das Verhältnis des viskosen Anteils zum elastischen Anteil. Die genaue Beschreibung der Elastizitätsparameter ist in Kap. 2.2.4 aufgeführt.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Elastizitätsparameter vor, während und nach der Behandlung. Die Messwerte, die in Woche 4 ermittelt wurden, sind nicht dargestellt. Der Grund hierfür war ein Kalibrierproblem mit der Cutometer-Sonde. Daher werden im Folgenden lediglich die Messdaten nach 2 und 8 Wochen im Vergleich zu dem Tag 0 vorgestellt. Aus Abb. 7.8 (links) ist ersichtlich, dass nach der Applikation der Cremes an den Unterarmen die Dehnbarkeit der Haut RO signifikant abnimmt. Allerdings waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Hautarealen, an denen die Resveratrol-haltige Formulierung und den Hautstellen, an denen die Vehikel-Formulierung appliziert wurde, festzustellen.



Abb. 7.8. Dehnbarkeit (R0) der Haut an den Unterarmen (A) und auf der Stirn (B) vor (Tag 0), während (2 Wochen) und nach der Applikation der Creme (8 Wochen), 95% Konfidenzintervall, N = 18 (Unterarme), 16 (Stirn). Rsv, Resveratrolhaltige Formulierung, Veh, Vehikel. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu dem Tag 0: α Rsv, * Veh, zweifaktorielle ANO-VA, paarweiser Vergleich mittels Tukey-Tests, α = 0.05

Die Dehnbarkeit der Haut an der Stirn (Abb. 7.8, rechts) war deutlich niedriger als an den Unterarmen. Die Applikation beider Testformulierungen (Resveratrol-haltig (Rsv) sowie Vehikel (Veh)) bewirkte keine signifikanten Veränderungen der Dehnbarkeit von der Stirnhaut (Abb. 7.8, rechts).



Abb. 7.9 Brutto-Elastizität (R2) der Haut an den Unterarmen (A) und auf der Stirn (B) vor (Tag 0), während (2 Wochen) und nach der Applikation der Creme (8 Wochen), 95% Konfidenzintervall; N = 18 (Unterarme), 16 (Stirn). Rsv, Resveratrolhaltige Formulierung, Veh, Vehikel. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu dem Tag 0: ¤ Rsv, * Veh, zweifaktorielle ANO-VA, paarweiser Vergleich mittels Tukey-Tests, α = 0.05

Anders stellte sich der Verlauf der Elastizität dar. Abb. 7.9 zeigt die gemessene Brutto-Elastizität (R2) der Haut. Es ist ersichtlich, dass die Haut an den Unterarmen sehr elastisch ist (R2 > 0,88, entspricht >88 % Rückbildung), im Gegensatz zu der Stirnhaut (ca. 60 % Rückbildung am Tag 0). Die Elastizität der Haut an den Unterarmen änderte sich nicht wesentlich während der Behandlung. Im Gegensatz dazu zeigte die Haut der Probanden an der Stirn nach 8 Wochen eine signifikante Zunahme der Elastizität, allerdings ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Resveratrol-Creme und dem Vehikel (Abb. 7.9, rechts).



Abb. 7.10. Hautermüdung (R9) der Haut an den Unterarmen (A) und auf der Stirn (B) vor (Tag 0), während (2 Wochen) und nach der Applikation der Creme (8 Wochen), 95% Konfidenzintervall; N = 18 (Unterarme), 16 (Stirn). Rsv, Resveratrolhaltige Formulierung, Veh, Vehikel. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu dem Tag 0: α Rsv, * Veh, zweifaktorielle ANO-VA, paarweiser Vergleich mittels Tukey-Tests, α = 0.05

Die Hautermüdung nach 3 Saugzyklen (R9, Abb. 7.10) war an der Stirn höher als an den Unterarmen. Die regelmäßige Applikation der Creme an den Unterarmen bewirkte eine signifikante Minderung der Ermüdungserscheinungen (Abb. 7.10, links). Bei der Stirn war lediglich nach 2 Wochen eine signifikante Veränderung festzustellen (Abb. 7.10, rechts). Bei diesem Parameter ergaben sich wiederum keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Resveratrol-haltigen Creme und der Vehikel-Formulierung.

In der Abb. 7.11 ist die Veränderung des Flächenparameters FO dargestellt. Da FO die normierte Fläche über der ersten Saugkurve ist (Kap. 2.2.4), ist dieser Parameter von der Amplitude RO unabhängig, d.h. die Auswirkung des Pressdrucks auf die Sonde bei dem Messen ist minimisiert. FO ist umgekehrt proportional zur Hautelastizität.



Abb. 7.11. Normierte Fläche über der Saugkurve Kurve (F0), gemessen an den Unterarmen (A) und auf der Stirn (B) vor (Tag 0), während (2 Wochen) und nach der Applikation der Creme (8 Wochen), 95% Konfidenzintervall; N = 18 (Unterarme), 16 (Stirn). Rsv, Resveratrol-haltige Formulierung, Veh, Vehikel. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu dem Tag 0: α Rsv, * Veh, zweifaktorielle ANOVA, paarweiser Vergleich mittels Tukey-Tests, α = 0.05

Im Gegensatz zu den anderen oben beschriebenen Elastizitätsparametern, waren die normierten Flächen F0, die an der Unterarmhaut und an der Stirnhaut gemessen wurden, am Tag 0 fast identisch (0,053-0,054). Im Verlauf der Untersuchung sanken die F0-Werte an den Unterarmen signifikant, d. h. die Haut wurde elastischer; an der Stirn war kein Unterschied zu messen. Für diesen Parameter ergaben sich wiederum keine signifikanten Unterschiede zwischen der Vehikel-Formulierung und der Polyphenol-haltigen Creme.



Abb. 7.12. Verhältnis der viskosen Deformation zur elastischen (R6), gemessen an den Unterarmen (A) und auf der Stirn (B) vor (Tag 0), während (2 Wochen) und nach der Applikation der Creme (8 Wochen), 95% Konfidenzintervall; N = 18 (Unterarme), 16 (Stirn). Rsv, Resveratrol-haltige Formulierung, Veh, Vehikel. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu dem Tag 0: \times Rsv, * Veh, zweifaktorielle ANOVA, paarweiser Vergleich mittels Tukey-Tests, $\alpha = 0.05$

Abb. 7.12 stellt die viskoelastischen Eigenschaften der Haut dar und zwar das Verhältnis zwischen der verzögerten (viskosen) und der sofortigen (elastischen) Deformation (R6 = Uv/Ue, Kap. 2.2.4). Die R6-Werte verhielten sich für die Unterarme und die Stirn unterschiedlich. Bei den Unterarmen stieg der Anteil des viskosen Anteils nach 2 und 8 Wochen signifikant an, und zwar sowohl bei der Applikation der Resveratrol-haltigen als auch Vehikel Formulierung ohne signifikante Unterschiede zwischen den beiden. Bei der Behandlung der Stirn war ein anderes Bild zu beobachten, die R6-Werte für die Hautstellen, an denen die Vehikel-Formulierung appliziert wurde, blieben nach 2 und 8 Wochen unverändert, wohingegen an den Hautpartien, an denen die Resveratrol-Creme appliziert wurde, eine signifikante Senkung des viskosen Anteils zu beobachten war (Abb. 7.12, rechts).

7.3.3. Hautfeuchtigkeit und transepidermaler Wasserverlust

Eine ausreichende Hauthydratation ist eine der Voraussetzungen für einen gesunden Hautzustand. Abb. 7.13 zeigt die Veränderung der Hautfeuchtigkeit an den Unterarmen und an der Stirn im Laufe der Studie.

Die Feuchtigkeit der Unterarme am Tag 0 war deutlich niedriger als die der Stirn. Die Stirnhaut enthält viele Talgdrüsen, deswegen werden an der Stirn normalerweise höhere Feuchtigkeitswerte ermittelt [34].



Abb. 7.13. Feuchtigkeit der Unterarme (A) und der Stirn (B) vor (Tag 0), während (2, 4 Wochen) und nach der Applikation der Creme (8 Wochen), 95% Konfidenzintervall; N = 15 (Unterarme), 13 (Stirn). Rsv, Resveratrol-haltige Formulierung, Veh, Vehikel. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu dem Tag 0: α Rsv, * Veh, zweifaktorielle ANOVA, paarweiser Vergleich mittels Tukey-Tests, α = 0.05

Während der Behandlung blieb die Stirnhautfeuchtigkeit unverändert. An den Unterarmen, hingegen, war ein deutlicher Anstieg zu beobachten (Abb. 7.13, links). Ähnlich wie bei den Elastizitätsparametern ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Formulierungen. Bei der Messung nach 8 Wochen ergab sich eine Abnahme der Corneometer-Werte im Vergleich zu der Messung nach 4 Wochen. Dies ist dadurch zu erklären, dass, um den Effekt der regelmäßigen Applikation der Cremes wegzulassen und um langzeitige Effekte sehen zu können, wurde eine Pause von mind. 20 h zwischen der letzten Applikation der Cremes und der letzten Messung (nach 8 Wochen) angelegt wurde. Bei den Zwischenmessungen (nach 2, 4 Wochen) betrug der Abstand zwischen der Applikation und der Messung 2 bis 6 Stunden. Der größere Abstand bei der letzten Messung wurde extra angelegt, um den Behandlungseffekt mit den Werten am Tag 0 besser vergleichen zu können. Aus der Abb. 7.13 ist ersichtlich, dass die Corneometer-Werte nach der Applikation der Resveratrol-haltigen Creme auch nach der Behandlung immer noch signifikant höher sind als am Tag 0.



Abb. 7.14. Transepidermaler Wasserverlust (TEWL) der Unterarme (A) und der Stirn (B) vor (Tag 0), während (2, 4 Wochen) und nach der Applikation der Creme (8 Wochen), 95% Konfidenzintervall; N = 15 (Unterarme), 13 (Stirn). Rsv, Resveratrol-haltige Formulierung, Veh, Vehikel. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu dem Tag 0: α Rsv, * Veh, zweifaktorielle ANOVA, paarweiser Vergleich mittels Tukey-Tests, α = 0.05

Die TEWL-Werte der Unterarme blieben nahezu unverändert (Abb. 7.14, links), was auf eine konstante Barrierefunktion der Haut hindeutet. Der TEWL an der Stirn war deutlich höher als an den Unterarmen, was auch auf die höhere Hautfeuchtigkeit der Stirn zurückzuführen ist. Die TEWL-Werte sanken nach 2 und 4 Wochen der Cremeapplikation, und stiegen am Ende der Untersuchung wieder leicht an (Abb. 7.14, rechts).

7.4. Diskussion

Die Untersuchung des Einflusses der Resveratrol-haltigen Creme auf die biophysikalischen Hautparameter zeigte keine einheitlichen Ergebnisse. Die Untersuchung der Hauttopographie ergab eine signifikante Abnahme des Flächenrauwertes *Sa* der Unterarme nach der Applikation der Resveratrol-haltigen Formulierung im Gegensatz zum Vehikel, was auf eine Verbesserung des Hautzustandes zu einer glatteren Hautbeschaffenheit hindeutet (Abb. 7.4). Die Linienrauwerte *Ra* (Sternrauheit) blieben währenddessen allerdings nahezu unverändert (Abb. 7.5). In der Literatur werden als Bewertungsparameter sowohl Linienrauheitsparameter wie *Ra* oder *Rz* [141], als auch Flächenrauheitsparameter wie *Sa* herangezogen [41]. Im direkten Vergleich kann die Aussagekraft der Flächenrauheitsparameter für die Bewertung der Hauttopographie höher eingeschätzt werden, da sie ein Integral der gesamten gemessenen Hautoberfläche darstellen und somit weniger fehlerbehaftet sind als Linienrauheitsparameter, die für vier zufällige Linien bestimmt werden. Eine eindeutige Aussage lässt sich allerdings aus diesem Ergebnis nicht ableiten.

Was die Hauttopographie an der Stirn betrifft, so konnten nach der Applikation beider Formulierungen keine signifikanten Unterschiede sowohl in den Rauheitswerten, als auch in der Faltentiefe (Abb. 7.6, Abb. 7.7) ermittelt werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Stirn deutlich mehr äußerlichen Faktoren wie Sonnenstrahlung oder Verschmutzung ausgesetzt wird, als die Unterarme. Die Talgdrüsen sowie Mimikbewegungen beeinflussen ebenso stark die Stirnhauttopographie und machen mögliche Veränderungen schwer messbar. Die äußerlichen Einflüsse führen zu einer verminderten Elastizität (R2, Abb. 7.9) sowie zur erhöhten Ermüdungsneigung (R9, Abb. 7.10) der Stirnhaut im Vergleich zur Haut der Unterarme. Beide Parameter deuten auf eine fortgeschrittene Hautalterung.

Bei der Betrachtung der mechanischen Hauteigenschaften wurde keine spezifische Wirkung von Resveratrol auf die Haut beobachtet. Sowohl die Resveratrol-haltige, als auch die Vehikel-Formulierung bewirkten eine Verbesserung der Hautfestigkeit an den Unterarmen (Abb. 7.8) sowie der Elastizität der Stirnhaut (Abb. 7.9). Diese Veränderungen wurden vermutlich durch die feuchtigkeitsspendenden Eigenschaften beider Formulierungen verursacht, die beide das Feuchtehaltemittel Glycerin enthielten. Diese Vermutung wird durch die Messung der Hautfeuchtigkeit (Abb. 7.13) bestätigt, da die Haut an den Unterarmen während der Behandlung unabhängig von der applizierten Formulierung signifikant hydratisierter wurde. Dies wurde auch durch die sensorische Untersuchung bestätigt, wonach die Probanden beide Formulierungen als "feuchtigkeitsspendend" bewerteten (Abb. 7.3).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Wirksamkeit von Resveratrol als Anti-Aging-Agenz im Rahmen dieser Untersuchung nicht nachgewiesen werden konnte. Die Auswertung der Untersuchungen lassen aber den Schluss zu, dass Resveratrol zumindest einen Effekt auf die Hauttopographie an UV-geschützten Hautpartien zu haben scheint. Dabei stellt sich die Frage, ob es möglich ist, dass nur die Hauttopographie aber nicht die Hautelastizität von dieser Substanz beeinflusst werden kann. Hierzu ist anzumerken, dass die Hautelastizität stark von dem Zustand der Dermis abhängt, und zwar vom Gehalt und der Organisation von Kollagen- und Elastinfasern sowie anderer Komponenten der extrazellulären Matrix [2]. Dabei spielt der Wassergehalt eine große Rolle. Das Mikrorelief der Haut ist hingegen, solange keine Falten vorliegen, stärker von der Funktionalität der Epidermis beeinflusst als von der Beschaffenheit der Dermis. So wird beispielsweise eine schnellere Differenzierung der Korneozyten mit einem jüngeren Erscheinungsbild assoziiert. Bastianetto *et al.* ermittelten die Existenz spezifischer Bindungsstellen für Resveratrol, die vor allem in der Epidermis lokalisiert wurden [142]. Somit wäre es möglich, dass Resveratrol vorzugsweise auf die Epidermis wirkt und die Rauheit positiv beeinflusst. In dem Fall, dass das Resveratrol nicht wesentlich weiter durch die Haut in die Dermis permeiert, wäre dann kein Effekt auf die Elastizität zu erwarten, was auch nicht ermittelt wurde.

Diese Annahme einer Transportbegrenzung konnte im Rahmen der hier vorgestellten *invitro* Untersuchung mit Schweinehaut nicht vollständig bestätigt werden, denn bei den Versuchen zur Hautpermeation wurde Resveratrol zwar größtenteils in der Epidermis und Dermis lokalisiert, ein relativ hoher Anteil permeierte jedoch durch die Haut und gelangte in die Rezeptorflüssigkeit (Abb. 5.9) [105]. Da diese Untersuchungen aber unter den "infinitedose"-Bedingungen durchgeführt wurden, sind sie auf die *in-vivo* Untersuchungen nicht direkt übertragbar. Eine *in-vivo* Untersuchung der Hautpermeation, bei dem die abgestreiften Hautschichten analysiert wurden (Tabelle 5.8), zeigte, dass die Konzentration von Resveratrol im äußeren SC ca. 15 mal höher war, als in der tieferliegenden Schicht.

Was den Wirkmechanismus von Resveratrol in der Haut betrifft, gibt es noch einige offenen Fragen. Es wurden mehrere *in-vitro* Studien durchgeführt, die für Polyphenole und speziell für Resveratol eine antioxidative [61, 143], antimikrobielle [143, 144], chemopräventive, antimutagene und entzündungshemmende Wirkung [6, 145] nahe legen, was eine potente kosmetische Wirkung erwarten lässt. Die anti-apoptotische Wirkung von Resveratrol kann eine protektive Wirkung auf verschiedene mit der Alterung assoziierte Erkrankungen hervorrufen [142]. Resveratrol und andere Polyphenole sind zudem als Phytoöstrogene beschrieben, d. h., dass sie an Östrogenrezeptoren binden können und sowohl als Agonist, als auch als Antagonist wirken können [146, 147]. Dabei kann die anti-östrogene Wirkung sowohl positiv sein, denn ein hoher Östrogenspiegel mit einem erhöhten Risiko an Krebskrankheiten (z. B. Brustkrebs, Ovarialkarzinom) verbunden ist. Einige Studien zeigten zudem, dass Resveratrol dank seiner Phytoöstrogenaktivität gegen diese und andere Krebsarten wirksam ist [148, 149].

Allerdings fehlt es noch immer an echten Belegen für die beschriebenen Wirkmechanismen durch *in-vivo* Untersuchungen. Viele bislang verfügbare Vorschläge zur Anwendung von Polyphenolen basieren immer noch auf *in-vitro* Tests. So patentierten Sreekumar et al. [150] ein kosmetisches Hautpflegemittel, das Resveratrol und Retinoide enthält und zu einer Verbesserung des Hautbildes sowie der Elastizität, beitragen soll. Obwohl Resveratrol alleine keinen signifikanten Effekt zeigte, in Kombination mit einigen Retinoiden bewirkte es eine synergistische Erhöhung deren Aktivität. Die genannten Wirkungen wurden jedoch lediglich mittels *in-vitro* Assays belegt. In einer anderen *in-vitro* Studie wurde ein inhibitorischer Effekt von Resveratrol auf die Synthese von Kollagen Typ I beobachtet, was nicht eine Anti-Aging Anwendung, sondern vielmehr einen Einsatz als anti-Fibrose Agenten nahe legen könnte [151].

Obwohl die orale Bioverfügbarkeit von Polyphenolen schlecht ist [152] und die perkutane Absorption einen effektiveren Weg zu Verabreichung der Polyphenole im Körper und spezifisch in der Haut darstellt, wurden die Polyphenolpräparate in den meisten berichteten Humanstudien, die mit der Auswirkung von Polyphenolen auf die biophysikalischen Hauteigenschaften sich befassten, oral eingenommen.

In einer Placebo-kontrollierten Studie von Buonocore et al. [153] wurden topische und systemische Wirkungen eines Nahrungsergänzungsmittels auf Basis von Resveratrol und Procyanidinen auf altersbedingte Veränderungen und Antioxidanzsystem der Haut sowie auf den systemischen oxidativen Stress untersucht. Nach 60 Tagen der Einnahme des Polyphenol-haltigen Mittels wurde eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität von Blutplasma und von Haut, eine Verbesserung von Hautfeuchtigkeit und Elastizität sowie eine Verringerung der Hautrauheit, der Faltentiefe und der Intensität von Altersflecken beobachtet [153]. Möglicherweise hat die spezifische Mischung aus Resveratrol und Procyanidinen einen starken positiven Effekt auf die Haut aufgrund von synergistischen Effekten zwischen den Polyphenolen. Diese war in der vorliegenden Arbeit nicht vorhanden, denn hier ein Effekt von reinem Resveratrol getestet wurde.

In einer zweijährigen Studie untersuchten Janjua et al. [154] den langfristigen Effekt oral eingenommener Polyphenole aus grünem Tee auf einige klinische und histologische Merkmale der Hautphotoaging. Die Ergebnisse zeigten keinen signifikant positiven Effekt des Grünteeextraktes (GTE) im Vergleich zum Placebo. In einer kürzeren Studie, hingegen, führte der 12-wöchige Konsum eines Grüntee-Getränkes zu einer Verbesserung von Hautelastizität, Rauheit, Dichte und anderer Hauteigenschaften wie die Durchblutung [155]. Die Kombination von oraler und topischer Applikation des GTE innerhalb von 8 Wochen bewirkte eine Verbesserung des elastischen Gewebes, allerdings waren keine klinisch signifikante Veränderungen festzustellen [156].

In Bezug auf die Ergebnisse der hier beschriebenen Humanuntersuchung kann zusammengefasst werden, dass eine eindeutige Wirkung des Resveratrols auf den Hautzustand nicht festgestellt werden konnte. Obwohl das Rauheitsbild der Unterarme sich signifikant verbesserte, wurde dieses Ergebnis mit keinem anderen bestätigt. Möglicherweise war die acht-wöchige Anwendung nicht ausreichend lang, um die Unterschiede zwischen der Resveratrol-haltigen Formulierung und dem Vehikel feststellen zu können. Die elastischen Eigenschaften der untersuchten Hautpartien änderten sich bei der Applikation beider Formulierungen signifikant positiv, was offenbar durch die Verbesserung der Hauthydratation zu begründen ist.

Anscheinend war Resveratrol alleine nicht effektiv genug, denn, wie es oben erwähnt, können zwischen verschiedenen Substanzen synergistische Effekte auftreten. So verglichen, Chuarienthong et al. in ihrer Studie die Auswirkungen der Applikation kosmetischer Formulierungen mit verschiedenen poylphenolischen Extrakten und zeigten, dass eine Gingko-Formulierung deutlich effektiver war als beispielsweise Mischung aus Tee und Rotbusch oder Soja-Extrakt, was vermutlich auf die Unterschiede in der Polyphenol-Zusammensetzung zurückzuführen ist [157].

8. Experimenteller Teil

8.1. Charakterisierung der Wirkstoffe

8.1.1. HPLC-Analyse

Die HPLC-Analyse der Polyphenole wurde mit einem Dionex System (Thermo Fisher Scientific, Idstein, Deutschland) durchgeführt, ausgerüstet mit einem Degaser SOR-100, einer binären Pumpe P680, einem Autosampler ASI-100, einem temperaturgesteuerten Säulenofen TCC-100 und einem DAD-Detektor DAD 3000RS. Die Trennung wurde in einer Synergi 4U Hydro-RP 80A Säule (150 mm x 3 mm, 4 Mikron), (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) durchgeführt. Die mobile Phase war ein binärer Gradient, zusammengesetzt aus Wasser mit 2 % Essigsäure (v/v) (Eluent A) und Acetonitril mit 0,5 % (v/v) Essigsäure (Eluent B). Das Gradientenprogramm bei einer Fließrate von 0,5 ml/min ist in Tabelle 8.1 dargestellt. Die Säulentemperatur wurde bei 25 °C konstant gehalten. Die Detektion erfolgte bei 256 nm (PCA, Rutin, Quercetin), 279 nm (EGCG, Catechin), 306 nm (Resveratrol). Die Absorptionsspektren von 190 bis 400 nm wurden zu jedem Zeitpunkt aufgenommen. Es wurden Aliquoten von 10 μ l analysiert, und die Quantifizierung erfolgte unter Verwendung einer externen Kalibrierung.

Zeit, min	Eluent B, %
-3	5
0	5
15	50
17	100
19	100
20	5
22	5

Tabelle 8.1. Eluentengradienten bei der HPLC-Analyse von Polyphenolmischungen

8.1.2. ABTS Assay

Die Radikalfängeraktivität wurde mittels ABTS-Entfärbungsassay (2,2'-Azino-bis-(3ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) ermittelt [107]. Experimente wurden am Spektralphotometer Lambda 25 (Perkin-Elmer, Shelton, USA) durchgeführt. Das ABTS Radikalkation (ABTS^{•†}) wurde durch die Reaktion von 7 mM ABTS Wasserlösung mit 2,45 mM Kaliumpersulfat erzeugt und im Dunklen bei Raumtemperatur für 12-16 h gelagert. Die Stammlösung wurde direkt vor der Analyse mit dest. Wasser verdünnt, so dass die Radikallösung eine Extinktion von 0,70 ± 0,02 bei 734 nm aufwies. Die Polyphenolproben sowie Trolox, die Standard-Referenz-Verbindung, wurden in Ethanol gelöst und auf 5-6 Konzentrationen (bis zu 25 μ M) verdünnt. Mischungen von 0,99 mL der verdünnten ABTS^{•†}-Lösung mit 10 μ l der Testlösung oder 10 μ l Ethanol (Blindprobe) wurden exakt 15 min bei 30 °C temperiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 734 nm gemessen. Die prozentuale Inhibition der Radikalkonzentration (*RI*, %) wurde aus der Reduktion der Extinktion nach der Formel (24) berechnet:

$$RI = \frac{E_0 - E_m}{E_0} \cdot 100,$$
 (24)

*E*⁰ ist die Extintkion der Blindprobe, *E*^{*m*} ist die Extinkton der Messlösung.

Für die Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50} , mM) wurden *RI* Werte als Funktion der Konzentration aufgetragen. IC₅₀ wurde aus dem Diagramm als eine einer 50-%-ger Inhibierung entsprechende Konzentration abgelesen. Die TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) wurde als Verhältnis von IC₅₀-Werten für die Testsubstanz und für Trolox angegeben. Es wurde stets eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

8.1.3. Rancimat-Test

Die hemmende Wirkung von Polyphenolen auf die Lipidoxidation wurde mittels eines beschleunigten Oxidationstests [109, 158] im Rancimat 679 (Methrom, Herisau, Schweiz) durchgeführt. Die Bestimmung basierte auf der Messung der Induktionsperiode bei der Oxidation von Sonnenblumenöl. Die Ölprobe wird in einer Reaktionszelle aufgeheizt, die mit Luft durchgeblasen wird (Abb. 8.1). Flüchtige Verbindungen, die während des Oxidationsprozesses freigesetzt werden, geraten zusammen mit der Luft in eine mit entmineralisiertem Wasser gefüllte Messzelle, in der die Leitfähigkeit des Wassers kontinuierlich gemessen wird. Das Ende der Induktionsperiode (IP) wird durch eine rasche Zunahme der Leitfähigkeit gekennzeichnet.



Abb. 8.1. Messprinzip eines Rancimats [159]

Für die Bestimmung einer antioxidativen Wirkung wurde die IP von raffiniertem Sonnenblumenöl mit der IP von Öl, zu dem 0,1 % (w/w) der Testsubstanz zugesetzt wurde, verglichen. Die Probenmenge betrug 3,0 g. Die Oxidation wurde bei 100 °C und einem Luftdurchsatz von 20 L/h induziert. Die antioxidativen Indizes (*AI*) der Testsubstanzen wurden als Verhältnis der IP berechnet (25):

$$AI = IP_t / IP_c, \tag{25}$$

 IP_t ist Induktionsperiode von Öl mit Antioxidanz; IP_c ist die Induktionsperiode der Kontrollprobe (reines Öl). Die Bestimmungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt.

8.1.4. Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizient

Die Bestimmung des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten basiert auf der Methode von Rothwell et al. [111]. Zu den Aliquoten der Testsubstanzen (0,5 – 1 mg) wurden 1-Octanol (1 mL) sowie Wasser oder McIlvaine (Zitronensäure - Phosphat)-Puffer-Lösung mit pH 5,5 bzw. 7,4 (1 mL) zugegeben. Nach intensivem Mischen (Vortex) wurden die Proben in einem Ultraschallbad für 15 min bei 25 °C gegeben und anschließend mit einer MiniSpin Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 5 min, bei 13400 rpm zentrifugiert. Die Octanolfraktion wurde vorsichtig von der Wasserphase abgetrennt. Beide Phasen wurden filtriert (0,2 pm, GHP Acrodisc minispike) und mittels HPLC analysiert. Die Verteilungskoeffizienten (*log Pow*) wurden nach folgender Formel (26) ermittelt:

 $log P_{ow} = lg (C_o / C_w),$ $C_o \text{ und } C_w \text{ sind die Konzentrationen der untersuchten Substanzen in der Octanol- bzw. in der Wasserphase.}$ (26)

8.1.5. Löslichkeit

Mit dem Ziel, eine geeignete Rezeptorflüssigkeit für Fluid Freisetzungs- und Permeationsexperimente zu finden, wurde die Sättigungslöslichkeit der untersuchten Substanzen in unterschiedlichen Medien verglichen. Hierzu wurde ein Überschuss an Testsubstanz zu dem jeweiligen Medium (1 mL) zugegeben und mittels Vortex intensiv gemischt. Nach 15 min im Ultraschallbad wurden die Proben in einem Thermomixer bei 34 °C für 1 h temperiert. Anschließend wurden die Proben filtriert (0,2 μ m) und mittels HPLC analysiert. Ggf. musste eine Verdünnung mit dem jeweiligen Medium vorgenommen werden. Es erfolgte stets eine Dreifachbestimmung.

8.2. Herstellung und Charakterisierung der Emulsionen

8.2.1. Herstellung der Emulsionen

1) Die Testemulsionen wurden in einem Laborreaktor, ausgerüstet mit einem Wasserbad, einem Rührer und einem Ultraturrax (IKA Werke, Staufen, Deutschland), mittels eines *hothot* Verfahrens hergestellt. Die entsprechenden Zusammensetzungen sind in Kapiteln 5.2, 6, 7.1.3 aufgeführt. Die Wasserphase (Phase A) wurde unter Rühren (100 rpm) ca. 15 min auf 70 °C erhitzt, so dass das darin enthaltene Xanthan ein durchsichtiges Gel bildete. Separat wurde die Ölphase (Phase B) bis zum Aufschmelzen aller Komponenten auf 70 °C erhitzt und anschließend zu der Wasserphase zugegeben. Nach 2 min Rühren bei 200 rpm wurde die Mischung mit dem Ultraturrax bei 22.000 rpm für 10 min homogenisiert. Anschließend wurden die Emulsionen unter langsamem Rühren abgekühlt. Die Wirkstoffzugabe erfolgte gemäß Punkt (2) bzw. (3). **2)** Nach dem Abkühlen der Emulsion auf 40-50 °C wurde der jeweilige Wirkstoff (Phase C) zum Reaktor zugegeben, die Emulsion wurde erneut mit Ultra-Turrax homogenisiert (22.000 rpm, 5 min). Unter Rühren bei 50 rpm wurden die Emulsionen auf 25 °C abgekühlt.

3) Nach dem Abkühlen auf 25 °C, wurde die Basisemulsion, hergestellt nach Punkt (1), in spezielle Kruken aliquotiert (50 - 100 g) und die jeweilige Wirkstoffmischung (Phase C) zugegeben. Die Wirkstoffdispergierung erfolgte in einem Emulsionsrührgerät Topitec Touch (Wepa Apothekenbedarf GmbH, Hillscheid) nach folgendem Programm: Vordispergieren (1 min bei 1000 rpm), Mischen (10 min bei 3000 rpm), Abkühlen (5 min bei 300 rpm).

8.2.2. Polyphenolanalyse in Emulsionen

Für die Polyphenolanalyse in Emulsionen wurde die beschriebene bei Frauen et al. Methode modifiziert [119]. Die Testemulsion (0,5 - 1 g) wurde mit 1 ml Tetrahydrofuran und 2 ml Methanol-Wasser-Gemisch (90:10, v/v), das 0,2 g/L L-Ascorbinsäure enthielt, gemischt. Nach kurzem Vortexen und 15 min im Ultraschallbad bei 25 °C wurde die Mischung durch einen Faltenfilter filtriert, das Filtrat wurde mit Methanol-Wasser gewaschen (90:10, v/v) und auf 5 bzw. 10 ml aufgefüllt. Vor der HPLC-Analyse wurden die Proben durch einen 0,2 um Spritzenfilter (GHP Acrodisc MiniSpike; Pall, USA) filtriert. Nach der Bestimmung der Emulsionsdichte unter Verwendung eines Pyknometers (25 °C), wurde die Konzentration der Testsubstanzen in μ g/mL begerechnet, die für die Berechnung der Permeationskoeffizienten erforderlich ist. Alle Messungen erfolgten in dreifacher Ausführung durchgeführt.

8.2.3. Partikelgrößenverteilung

Die Verteilung der Tröpfchengrößen in den Emulsionen wurde mittels der Laserbeugungsspektroskopie am Mastersizer S (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK) gemessen. Vor den Messungen wurden die Emulsionen mit dest. Wasser verdünnt (1:1000). Für die Messung von Partikelgrößen von 0,05 bis 900 µm wurde ein Objektiv 300 RF eingesetzt. Für die Datenverarbeitung wurden die Brechungsindizes von 1,5295 und 1,330 (für Öl- und Wasserphase) angewendet. Die Messungen wurden in vierfacher Ausführung durchgeführt.

8.2.4. Rheologische Messungen

Die rheologischen Messungen wurden an einem Schubspannung-gesteuerten Rheometer Bohlin CVO-100 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK) durchgeführt.

Das viskoelastische Verhalten der Emulsionen wurde mittels Oszillationsrheometrie in der gleichen Kegel-Platte Messgeometrie (40 mm, 4 °) ermittelt. Der Amplituden-Sweep-Test erfolgte bei konstanten Frequenz (1 Hz) und Temperatur (25 °C) durchgeführt, nach einer Vorscherung von 300 s bei 0 Pa wurde die Schubspannung logarithmisch von 1 bis 100 Pa (in einigen Fällen von 1 bis 1000) erhöht. Die erhaltenen Speichermodul (G') und Verlustmodul (G'') beschreiben elastisches bzw. viskoses Verhalten der Probe. Für die Auswertung wurden die gemittelten Werte dieser Parameter in dem linearen viskos-elastischen Bereich (LVE) ermittelt. Es wurden Dreifachbestimmungen vorgenommen.

8.2.5. Zentrifugenstabilität

Die Stabilität von Emulsionen wurde mit einer MiniSpin Zentrifuge (Eppendorf AG, Hamburg) getestet. Die Zentrifuge mit einem Rotorradius von 6 cm ermöglicht eine maximale Drehzahl von 13.400 1/min (entspricht RZB von 12.100 g). Emulsionsaliquoten von 1 g wurden bei verschiedenen Drehzahlen (von 1.000 bis 13.400 1/min) für 10 min zentrifugiert, die letzte Drehzahl ohne sichtbare Phasentrennung wurde als Stabilitätspunkt angegeben.

8.2.6. Lagerversuche

Emulsionen mit Polyphenolmischungen wurden bei 4 °C, 20 °C und 40 °C unter Lichtausschluss für 4 Monate eingelagert. In geeigneten Zeitintervallen wurde die Konzentration der Polyphenole bestimmt.

8.3. In-vitro Permeation und Wirkstofffreisetzung

Die Freisetzungsraten sowie das Hautpermeationsverhalten von Polyphenolen aus den verschiedenen Formulierungen wurden in Diffusionszellen nach *Franz* (SES GmbH, Bechenheim, Deutschland) mit einem Innendurchmesser von 25 mm (entsprechend einer Permeationsfläche von 4,91 cm²) und mit einem Volumen von 20 mL (Abb. 2.15) ermittelt.

8.3.1. Membranen, Präparation der Schweinehaut

Für die Messung der Wirkstofffreisetzung wurde eine Zellulosemembran (MWCO 12000-14000 (molecular weight cut-off), mit einem Porendurchmesser von 25 Å, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Unmittelbar vor dem Versuch wurde die Membran in der Rezeptorflüssigkeit getränkt.

Das in-vitro Permeationsverhalten wurde an exzidierter Schweinehaut getestet. Die Haut von ca. fünf Monate alten Schweinen wurde von der Klinik für Schweine an der Ludwig-Maximilian Universität München, Oberschleißheim, zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden im Rahmen anderer medizinischer Experimente, die vom der Klinik durchgeführt wurden, eingeschläfert, so dass für die vorliegende Arbeit wurden keine Tierversuche durchgeführt wurden. Ca. 2 h nach dem Einschläfern wurde die Abtrennung der Haut vorgenommen. Die Tiere wurden mit einer Jod-Seife gewaschen und rasiert, anschließend wurden mit einem Skalpell Hautstücke von etwa 20x30 cm von beiden Seiten, nicht näher als 10 cm zur Wirbelsäule, ausgeschnitten. Die Haut wurde in einer Kühlbox bei ca. 0 °C zur Weiterverarbeitung in das Labor des Fraunhofer IVV transportiert. Anschließend wurde die Haut mit Wasser abgewaschen und das subkutane Fettgewebe mit einem Skalpell entfernt. Die Dicke der Haut, die aus Epidermis und Dermis bestand, lag bei etwa 3 mm. Etwa 5 mm von jeder Seitenkante wurde verworfen, um eine mögliche Kontamination der Epidermis mit Fett zu vermeiden. Die Hautstücke wurden in Alufolie und Plastiktüten vakuumverpackt und bei -20 °C eingelagert. Vor den Permeationsexperimenten wurde die Haut ca. 15 min bei Raumtemperatur aufgetaut und bis zu einer Dicke von ca. 1 mm dermatomiert (Schink Dermatom, Schreiber GmbH, Fridingen, Deutschland). Anschließend wurden 35-mm-Kreise ausgestanzt, in der Rezeptorflüssigkeit für 15 min rehydratisiert und auf die Franz-Zellen aufgesetzt.

8.3.2. Durchführung der Permeations- und Freisetzungsuntersuchung

Die *Franz*-Zellen (Abb. 2.15) wurden mit entgaster Rezeptorflüssigkeit (5 g/L Tween 20 im Wasser-Ethanol-Gemisch (1:1, v/v)) gefüllt und mit einem Wasserbad auf 34 °C temperiert. Die Zellulosemembran bzw. das Hautstück wurde zwischen den Donor- und Rezeptorkammern platziert (die Haut mit der Epidermis nach oben); dabei wurde ein direkter Kontakt mit dem Rezeptorfluid und Abwesenheit von Luftblasen sichergestellt. Vor dem Auftragen der

Probe, wurde das System für 15 Minuten stabilisiert. 2 g der Testformulierung wurde auf der Haut oder Membran aufgebracht. In geeigneten Zeitabständen wurden Aliquoten von 250 µl aus der Rezeptorflüssigkeit entnommen und sofort durch eine frische Portion ersetzt. Die Proben wurden filtriert (0,2 µm, GHP Acrodisc minispike) und direkt mittels HPLC analysiert. Die Dauer der Freisetzungsexperimente betrug 4 h, die der Permeationsexperimente – 24 h. Die Versuche wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Als Kontrolle kamen Vehikel-Formulierungen zum Einsatz.

8.3.3. Extraktion der Polyphenole aus der Schweinehaut

Am Ende der Permeationsexperimente wurde die Probe von der Hautoberfläche entfernt, und die Hautoberfläche mit 5 ml Methanol-Wasser (90:10, v/v) abgewaschen, um die restliche Probe zu entfernen; die Waschflüssigkeit wurde filtriert (0,2 μm) und mittels HPLC analysiert. Die Haut wurde mit einem Papiertuch abgetrocknet und 10 mal Tape-gestrippt um das SC zu entfernen (Tesafilm, Beiersdorf, Hamburg, Deutschland). Die Klebestreifen wurden in einem Kolben gesammelt, in welchem 20 ml Lösung A (Methanol-Wasser (90:10, v/v) mit L-Ascorbinsäure (0,2 g/L) zugegeben wurde. Die restliche Haut, die aus der unterem Epidermis und der Dermis bestand, wurde mit einem Skalpell geschnitten und nach dem Einfrieren mit flüssigem Stickstoff (bei -196 °C) in einer Kryo-Mühle mit einer Frequenz von 25 s⁻¹ für 4 min vermahlen (CryoMill, Retsch, Haan, Deutschland). Anschließend wurden 20 ml der Lösung A zugesetzt. Alle Proben wurden in einem Laborschüttler bei 300 rpm und Raumtemperatur für 0,5 h geschüttelt und in einem Ultraschall-Wasserbad für 15 min bei 25 °C inkubiert, filtriert (blaues Band, Porengröße 2 µm) und mit 20 ml Lösung B (Methanol-Wasser, 90:10 (v/v)) versetzt. Das Lösungsmittel wurde in einem Rotationsverdampfer (Büchi GmbH, Essen, Deutschland) bei 40 °C und 100 bis 30 mbar abgedampft. Die trockenen Proben wurden in 2 ml Methanol gelöst, filtriert (0,2 pm, GHP Acrodisc minispike) und mittels HPLC analysiert.

8.3.4. Auswertung

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurde die kumulative permeierte bzw. freigesetzte Polyphenolmenge, normiert mit der Haut- bzw. Membranfläche und Ausgangskonzentration in der Formulierung (Q/C_0), als Funktion der Zeit (bzw. von Quadratwurzel oder vom *In* der Zeit) aufgetragen. Unter Verwendung der Gleichungen (11) - (16) wurden für jede Substanz die Hautpermeationskoeffizienten K_p , Diffusionskoeffizienten in der Haut D_s , Verzögerungszeiten t_L und Verteilungskoeffizienten Haut/Vehikel $P_{s/v}$ berechnet. Unter Verwendung der Gleichungen (17) - (21) wurden die anfänglichen Freisetzungskoeffizienten K_r , die Koeffizienten aus den kinetischen Modellen von Higuchi und Korsmeyer (K_{H_v} , K_{K_v} , n) sowie die Diffusionskoeffizienten innerhalb der Formulierungen D_v bestimmt. Die Reproduzierbarkeit der beiden kinetischen Modelle wurde verglichen.

Für die Hautpermeation wurden am Ende der Versuche die Konzentrationen der Wirkstoffe in den Hautschichten und zwar an der Hautoberfläche, in SC, Epidermis und Dermis (zusammen), sowie in der Rezeptorflüssigkeit ermittelt und auf die Permeationsfläche bezogen.

8.4. In-vivo Wirksamkeitsnachweis

Der in-vivo Wirksamkeitsnachweis erfolgte mittels eines Vorher-nachher Vergleiches der biophysikalischen Hautparameter, die instrumentell nicht invasiv erfasst wurden. Die Studienbeschreibung ist im Kap. 7.1 aufgeführt.

8.4.1. Hautelastizität

Die Hautelastizität wurde mittels Cutometer MPA 580 (Courage-Khazaka electronic GmbH, Köln), ausgerüstet mit einer Elastizitätssonde (Öffnung mit 2 mm Durchmesser), ermittelt. Die Messungen wurden in einem klimatisierten Raum bei 20 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40%, nach einer Akklimatisierungszeit von mind. 30 min durchgeführt. Nach dem Anlegen des Unterdrucks (450 mbar) wurde die Haut in die Sonde eingesaugt und über die in der Sonde befindliche optische Messoptik die Eindringtiefe erfasst. Nach 3 s Ansaugzeit wurde der Unterdruck abrupt unterbrochen (Relaxationszeit, 3 s). Der Saug-Relaxations-Zyklus wurde drei Mal wiederholt um den Ermüdungseffekt zu erfassen. Aus der Saugkurve wurden Hautelastizitätsparameter (R und F Parameter) gemäß Kap. 2.2.4 ermittelt. Die Messungen wurden vier bis acht Mal an benachbarten Hautstellen wiederholt.

8.4.2. Hauttopographie

Die Hauttopographie wurde mit einem optischen 3D-Hautmessgerät Primos Pico (GFMesstechnik GmbH, Teltow/Berlin) erfasst. Dem Gerät liegt ein Streifenprojektionsver-

fahren zugrunde (Kap. 2.2.1) und es ermöglicht eine präzise Messung der *in-vivo* Hautoberfläche. Für Messungen an den Unterarmen wurden diese auf eine Unterlage gelegt und das Gerät darüber in einem Stativ fixiert. Es wurde ein Messmodus "smooth" ("glatte Haut") angewendet und mind. 5 Messungen durchgeführt. Bei den Messungen an der Stirn wurden das Gerät sowie der Kopf der Probanden in einem Spezialstativ fixiert (bei einer wiederholten Messung wurden die gleichen Einstellungen verwendet). Dabei wurde das Messmodus "Wrinkles" ("Falten") angewendet und mind. 5 Wiederholungen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels der Software PRIMOS 5.7 (GFMesstechnik GmbH), dabei wurden die im Kap. 2.2.2 beschriebene Rauheitsparameter ermittelt, und zwar Linienrauheitsparameter *Ra*, *Rq* (gemittelt für vier sternförmig angeordneten Linien, zentriert) sowie Flächenrauheitsparameter *Sa*, *Sq*.

8.4.3. Hautfeuchtigkeit und Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)

Die Hautfeuchtigkeit wurde mittels einer Corneometer-Sonde CM 825 gemessen, der TEWL wurde mit einer Tewameter TM 300 Sonde erfasst. Beide Sonden wurden an Multi Probe Adapter MPA 580 (Courage-Khazaka electronic GmbH, Köln), angeschlossen. Die Messungen wurden in einem klimatisierten Raum bei 20 °C und der relativen Luftfeuchtigkeit von 40%, nach einer Akklimatisierungszeit von mind. 40 min durchgeführt. Vor der Messung wurden die Messsonden auf 34 °C vorgewärmt (Probe Heater PR 100). Es wurde jeweils 20 Messwerte gesammelt, wobei zur Auswertung nur 5 konstante Werte herangezogen wurden. Die Messungen wurden an benachbarten Hautstellen wiederholt.

8.4.4. Statistische Auswertung

Da bei den Elastizitätsmessungen 3 bis 8 Messungen an benachbarten Stellen erfolgten, wurden für jeden ermittelten Parameter, jeden Probanden und jede Hautstelle ein Mittelwert und eine Standardabweichung (SD) ermittelt.

Im Falle des Verdachts auf einen Ausreißer (SD > 10% vom Mittelwert), wurde innerhalb von Vierfach- bis Achtfachbestimmungen ein Ausreißertest nach Nalimov (r-Test) durchgeführt [160]. Für die experimentellen Werte wurde die Prüfgröße r_i nach Formel (27) berechnet, die anschließend mit dem kritischen Wert N_{krit} für das entsprechende Signifikanzniveau (p = 0.95) und den Freiheitsgrad (f = n-2, n ist die Anzahl der Werte) verglichen wurde.

$$r_i = \left| \frac{x_i - \bar{x}}{SD} \right| \sqrt{\frac{n}{n-1}},\tag{27}$$

wobei x_i der experimentelle Wert ist, \bar{x} der Mittelwert aller Werte und *SD* die Standardabweichung aller Werte. Falls $r_i > r_{krit}$, galt der Wert x_i als Ausreißer.

Der Vorher-nachher-Vergleich sowie der Vergleich der aktiven Formulierung mit dem Vehikel erfolgte durch die Zweiwege ANOVA (analysis of variance) mit wiederholten Messungen mittels der Software OriginPro 8G (OriginLab Corporation, Northampton, USA). Die Mittelwerte der Messdaten für jeden Proband, Messstelle und Messtag wurden zunächst mittels Kolmogorow-Smirnow Tests nach ihrer Normalität geprüft. Im Falle, dass die Messwerte signifikant (p = 0.95) zu einer normalverteilten Grundgesamtheit gehören, wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) angewendet. Einflussfaktoren waren der Messtag (4 Stufen: Tag 0, nach 2 Wochen, nach 4 Wochen, nach 8 Wochen) und die Formulierung (2 Stufen: Resveratol-haltige (Rsv) und Vehikel (Veh)), als Subjekt wurden Probanden (bzw. entsprechende Mittelwerte, min. und max. Werte) gesetzt. Ein paarweiser Vergleich der Datengruppen erfolgte mittels Tukey-Tests bei p = 0.95. Wenn die Messwerte nicht normalverteilt waren, erfolgte deren Vergleich mittels des nicht parametrischen Wilcoxon-Rangtests.

9. Verwendete Chemikalien und Rohstoffe (H-und P-Sätze)

Tabelle 9.1. Chemikalien u	nd Rohstoffe
----------------------------	--------------

Name	Hersteller	H- und P-Sätze
ABTS (2,2'-Azino-di-(3-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,	H315, H319, H335
ethylbenzthiazolin)-6- sulfonsäure)	Steinheim	P261-P305, P351, P338
Acetonitril	Th. Geyer GmbH, Renningen	H225-H302, H312, H332-H319
		P210-P280-P305, P351, P338
L-Askorbinsäure	Merck KGaA, Darmstadt	
(+)-Catechinhydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,	H315-H319-H335
	Steinheim	P261-P305, P351, P338
Cetiol MM (Myristyl Myristate, Myrystyl Alkohol)	Cognis GmbH, Düsseldorf	
Cetylalkohol	BaccaraRose, Sonsbeck	
Cosphaderm Resveratrol (> 98 % trans-Resveratrol)	Lanxess Engineering Chemistry, Langenfeld	
Dermosoft 1388 (Glycerin, Wasser, Parfum)	Dr. Straetmans GmbH, Ham- burg	
(-)-Epigallocatechin-3-gallat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	
Essigsäure (Eisessig)	Th. Geyer GmbH, Renningen	H226-H314
		P280-P305, P351, P338-P310
Ethanol	Th. Geyer GmbH, Renningen	H225
		P210
Glycerol	BaccaraRose, Sonsbeck	
Kaliumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	H272-H302-H315-H317-H319- H334-H335
		P220-P261-P280-P305, P351, P338-P342, P311
Methanol	Th. Geyer GmbH, Renningen	H225-H301, H311, H331-H370
		P210-P260-P280-P301, P310- P311
MCT ÖL Typ V (medium chai triglycerides)	in Gustav Hees GmbH, Stuttgart	
---	---	------------------------------------
n-Octanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,	H315-H319
	Steinheim	P305, P351, P338
Paraben K	BaccaraRose, Sonsbeck	H412
		P273
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	
Protocatechusäure (3,4-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,	H315-H319-H335
Dihydroxybenzoesäure)	Steinheim	P261-P305, P351, P338
Quercetin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,	H301
	Steinheim	P301, P310
Resveratrol	ABCR GmbH, Karlsruhe	H319
		P305, P351, P338
Rutin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	H302
Sonnenblumenöl	lokaler Supermarkt	
Span 40 (Sorbitan Monopalr	ni- Sigma-Aldrich Chemie GmbH,	H315-H319-H335
tat)	Steinheim	P261-P305, P351, P338
Symbiomuls GC (Glyceryl Ste rate Citrate, Cetearyl Alcoho Glyceryl Caprylate)	ea- Dr. Straetmans GmbH, Ham- ol, burg	
Tetrahydrofuran	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,	H225-H319-H335-H351
	Steinheim	P210-P261-P281-P305, P351, P338
Traubenkernöl	Gustav Hees GmbH, Stuttgart	
Tween 20 (Polyoxyethyl- enesorbitan Monolaurat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	
Tween 40 (Polyoxyethyl- enesorbitan Monopalmitat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	
Xanthan transparent (Xanth gum)	an BaccaraRose, Sonsbeck	

10. Literaturverzeichnis

1. Callaghan, T.M. and Wilhelm, K.-P. A review of ageing and an examination of clinical methods in the assessment of ageing skin. Part I: Cellular and molecular perspectives of skin ageing. *Int J Cosmet Sci.* 30(5):313-22 (2008).

2. Kerscher, M., Williams, S. and Trüeb, R.M. *Dermatokosmetik*. Darmstadt: Steinkopff Verlag (2009).

3. Farage, M.A., Miller, K.W., Elsner, P. and Maibach, H.I. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *Int J Cosmet Sci.* 30(2):87-95 (2008).

4. Sanchez, M., Franco, D., Sineiro, J., Magarinos, B. and Nunez, M.J. Antioxidant power, bacteriostatic activity, and characterization of white grape pomace extracts by HPLC-ESI-MS. *Eur Food Res Technol.* 230(2):291-301 (2009).

5. Daglia, M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotech.* 23(2):174-81 (2012).

6. Havsteen, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therapeut.* 96(2–3):67-202 (2002).

7. He, S., Sun, C.R. and Pan, Y.J. Red wine polyphenols for cancer prevention. *Int J Mol Sci.* 9(5):842-53 (2008).

8. Thring, T., Hili, P. and Naughton, D. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complement Altern Med.* 9(1):27 (2009).

9. Lee, K.-K., Cho, J.-J., Park, E.-J. and Choi, J.-D. Anti-elastase and anti-hyaluronidase of phenolic substance from *Areca catechu* as a new anti-ageing agent. *Int J Cosmet Sci.* 23(6):341-6 (2001).

10. Scheuplein, R.J. Permeability of the Skin. In: *Handbook of Physiology Section 9: Reactions to Environmental Agents*, pp. 299-322. American Physiological Society, Bethesda, Maryland (1977).

11. Arct, J., Oborska, A., Mojski, M., Binkowska, A. and Awidzikowska, B. Common cosmetic hydrophilic ingredients as penetration modifiers of flavonoids. *Int J Cosmet Sci.* 24(6):357-66 (2002).

12. Baby, A.R., Haroutiounian-Filho, C.A., Sarruf, F.D., Pinto, C.A.S.d.O., Kaneko, T.M. and Velasco, M.V.R. Influence of Urea, Isopropanol, and Propylene Glycol on Rutin In Vitro Release from Cosmetic Semisolid Systems Estimated by Factorial Design. *Drug Dev Ind Pharm.* 35(3):272-82 (2009).

13. OECD. Skin Absorption: *in vitro* Method. In: *Guidelines for the testing of chemicals*, pp. 1-8, (2004).

14. Diembeck, W., Beck, H., Benech-Kieffer, F., Courtellemont, P., Dupuis, J., Lovell, W., et al. Test Guidelines for In Vitro Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients. *Food Chem Toxicol.* 37(2-3):191-205 (1999).

15. Parks, J.M., Cleek, R.L. and Bunge, A.L. Chemical release from topical formulations across synthetic membranes: Infinite dose. *J Pharm Sci.* 86(2):187-92 (1997).

16. Eccleston, G.M. Functions of mixed emulsifiers and emulsifying waxes in dermatological lotions and creams. *Colloid Surf A-Physicochem Eng Asp.* 123–124(0):169-82 (1997).

17. Marquele, F.D., Oliveira, A.R.M., Bonato, P.S., Lara, M.G. and Fonseca, M.J.V. Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. *J Pharm Biomed Anal.* 41(2):461-8 (2006).

18. Löf, D., Schillen, K. and Nilsson, L. Flavonoids: Precipitation Kinetics and Interaction with Surfactant Micelles. *J Food Sci.* 76(3):N35-N9 (2011).

19. Luo, Z., Murray, B.S., Yusoff, A., Morgan, M.R.A., Povey, M.J.W. and Day, A.J. Particle-Stabilizing Effects of Flavonoids at the Oil–Water Interface. *J Agric Food Chem.* 59(6):2636-45 (2011).

20. Liu, W.Y. and Guo, R. Interaction of flavonoid, quercetin with organized molecular assemblies of nonionic surfactant. *Colloid Surf A-Physicochem Eng Asp.* 274(1-3):192-9 (2006).

21. Callaghan, T.M. and Wilhelm, K.-P. A review of ageing and an examination of clinical methods in the assessment of ageing skin. Part 2: Clinical perspectives and clinical methods in the evaluation of ageing skin. *Int J Cosmet Sci.* 30(5):323-32 (2008).

22. Bouwstra, J.A., Honeywell-Nguyen, P.L., Gooris, G.S. and Ponec, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog Lipid Res.* 42(1):1-36 (2003).

23. Wlaschek, M., Tantcheva-Poór, I., Naderi, L., Ma, W., Schneider, L.A., Razi-Wolf, Z., et al. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B*. 63(1–3):41-51 (2001).

24. Rabe, J.H., Mamelak, A.J., McElgunn, P.J.S., Morison, W.L. and Sauder, D.N. Photoaging: Mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol.* 55(1):1-19 (2006).

25. Pinnell, S.R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J Am Acad Dermatol.* 48(1):1-19 (2003).

26. Vermerris, W. and Nicholson, R. *Phenolic compounds biochemistry*. Dordrecht, The Netherlands: Springer (2006).

27. Podda, M. and Grundmann-Kollmann, M. Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. *Clin Exp Dermatol.* 26(7):578-82 (2001).

28. Kerscher, M. and Buntrock, H. Update on cosmeceuticals. *JDDG*. 9(4):314-27 (2011).

29. Wilfried Umbach, e. *Kosmetik und Hygiene - von Kopf bis Fuß*. 3. ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (2004).

30. Carruthers, A. and Carruthers, J. A validated facial grading scale: The future of facial ageing measurement tools? *J Cosmet Laser Ther.* 12(5):235-41 (2010).

31. Honeck, P., Weiss, C., Sterry, W., Rzany, B. and Gladys Study, G. Reproducibility of a four-point clinical severity score for glabellar frown lines. *Br J Dermatol.* 149(2):306-10 (2003).

32. Hund, T., Ascher, B., Rzany, B. and Grp, S.S. Reproducibility of two four-point clinical severity scores for lateral canthal lines (Crow's feet). *Dermatol Surg.* 32(10):1256-60 (2006).

33. Fischer, T.W., Wigger-Alberti, W. and Elsner, P. Direct and non-direct measurement techniques for analysis of skin surface topography. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 12(1-2):1-11 (1999).

34. Schrader, K. and Domsch, A. *Cosmetology - Theory and Practice. Research, Test Methods, Analysis, Formulas*. Augsburg: Verlag für chemische Industrie H. Ziolkowsky GmbH (2005).

35. De Paepe, K., Lagarde, J.M., Gall, Y., Roseeuw, D. and Rogiers, V. Microrelief of the skin using a light transmission method. *Arch Dermatol Res.* 292(10):500-10 (2000).

36. GFMesstechnik. *Handbuch für optisches 3D-Hautmessgerät PRIMOS Pico und Software PRIMOS 5.7*. Teltow/Berlin: GFMesstechnik GmbH (2009).

37. Kerscher, M., Bayrhammer, J. and Reuther, T. Rejuvenating influence of a stabilized hyaluronic acid-based gel of nonanimal origin on facial skin aging. *Dermatol Surg.* 34(5):720-6 (2008).

38. Udompataikul, M., Sripiroj, P. and Palungwachira, P. An oral nutraceutical containing antioxidants, minerals and glycosaminoglycans improves skin roughness and fine wrinkles. *Int J Cosmet Sci.* 31(6):427-35 (2009).

39. Abella, M.L. Evaluation of anti-wrinkle efficacy of adenosine-containing products using the FOITS technique. *Int J Cosmet Sci.* 28(6):447-51 (2006).

40. Rohr, M. and Schrader, K. Fast Optical in vivo topometry of human skin (FOITS). Vergleichende Untersuchungen zur Laserprofilometrie. *SOFW-Journal.* (124):52-39 (1998).

41. Bloemen, M.C.T., van Gerven, M.S., van der Wal, M.B.A., Verhaegen, P.D.H.M. and Middelkoop, E. An objective device for measuring surface roughness of skin and scars. *J Am Acad Dermatol.* 64(4):706-15 (2011).

42. Fujimura, T., Haketa, K., Hotta, M. and Kitahara, T. Global and systematic demonstration for the practical usage of a direct in vivo measurement system to evaluate wrinkles. *Int J Cosmet Sci.* 29(6):423-36 (2007).

43. Friedman, P.M., Skover, G.R., Payonk, G., Kauvar, A.N.B. and Geronemus, R.G. 3D In-Vivo Optical Skin Imaging for Topographical Quantitative Assessment of Non-Ablative Laser Technology. *Dermatol Surg.* 28(3):199-204 (2002).

44. Volk, R. *Rauheitsmessung. Theorie und Praxis*. Berlin: Beuth Verlag GmbH (2005).

45. Information und Gebrauchsanweisung zum Cutometer MPA 580 und der Software Cutometer MPA Q. Köln: Courage Khazaka electronic GmbH (2009).

46. Gütt, S. Rheologische in-vivo-Untersuchung an der menschlichen Haut mit nichtinvasiven Verfahren. Hamburg (1998). 47. Kapoor, S. and Saraf, S. Age Dependent Studies as Various Skin Parameters Using Cutometer. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research.* 43(4):338-45 (2009).

48. Ryu, H.S., Joo, Y.H., Kim, S.O., Park, K.C. and Youn, S.W. Influence of age and regional differences on skin elasticity as measured by the Cutometer[®]. *Skin Res Technol.* 14(3):354-8 (2008).

49. Reuther, T., Bayrhammer, J. and Kerscher, M. Effects of a three-session skin rejuvenation treatment using stabilized hyaluronic acid-based gel of non-animal origin on skin elasticity: a pilot study. *Arch Dermatol Res.* 302(1):37-45 (2010).

50. Sohm, B., Cenizo, V., André, V., Zahouani, H., Pailler-Mattei, C. and Vogelgesang, B. Evaluation of the efficacy of a dill extract in vitro and in vivo. *Int J Cosmet Sci.* 33(2):157-63 (2011).

51. Reuther, T., Bayrhammer, J. and Kerscher, M. Use of biophysical techniques to evaluate the physiologic effects of injected hyaluronic acid. *Hautarzt*. 58(12):1046-50 (2007).

52. J. W. Fluhr, M. Gloor, S. Lazzerini, P. Kleesz, R. Grieshaber and Berardesca, E. Comparative study of five instruments measuring stratum corneum hydration (Corneometer CM 820 and CM 825, Skicon 200, Nova DPM 9003, DermaLab). Part I. In vitro. *Skin Res Technol.* 5(3):161-70 (1999).

53. Fluhr, J.W., Gloor, M., Lazzerini, S., Kleesz, P., Grieshaber, R. and Berardesca, E. Comparative study of five instruments measuring stratum corneum hydration (Corneometer CM 820 and CM 825, Skicon 200, Nova DPM 9003, DermaLab). Part II. In vivo. *Skin Res Technol.* 5(3):171-8 (1999).

54. Alanen, E., Nuutinen, J., Nicklén, K., Lahtinen, T. and Mönkkönen, J. Measurement of hydration in the stratum corneum with the MoistureMeter and comparison with the Corneometer. *Skin Res Technol.* 10(1):32-7 (2004).

55. O'goshi, K. and Serup, J. Skin conductance; validation of Skicon-200EX compared to the original model, Skicon-100. *Skin Res Technol.* 13(1):13-8 (2007).

56. Boncheva, M., Sterke, J.d., Caspers, P.J. and Puppels, G.J. Depth profiling of *Stratum corneum* hydration *in vivo*: a comparison between conductance and confocal Raman spectroscopic measurements. *Exp Dermatol.* 18(10):870-6 (2009).

57. Paepe, K.D., Houben, E., Adam, R., Wiesemann, F. and Rogiers, V. Validation of the VapoMeter, a closed unventilated chamber system to assess transepidermal water loss vs. the open chamber Tewameter. *Skin Res Technol.* 11(1):61-9 (2005).

58. Engelhardt, U. Flavonoide (Polyphenole). In: *Praxishandbuch Functional Food, 5 Akt-Lfg*. Behr's Verlag, Hamburg (2001).

59. Rodrigo, R. and Bosco, C. Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney. A review. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 142(3-4):317-27 (2006).

60. Boskou, D. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci Technol.* 17(9):505-12 (2006).

61. Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P. and Sebastiani, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *J Food Compos Anal.* 21(8):589-98 (2008).

62. Kallithraka, S., Tsoutsouras, E., Tzourou, E. and Lanaridis, P. Principal phenolic compounds in Greek red wines. *Food Chem.* 99(4):784-93 (2006).

63. Darra, N., Grimi, N., Vorobiev, E., Louka, N. and Maroun, R. Extraction of Polyphenols from Red Grape Pomace Assisted by Pulsed Ohmic Heating. *Food Bioprocess Technol.* 6(5):1281-9 (2013).

64. Lafka, T.-I., Sinanoglou, V. and Lazos, E.S. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chem.* 104(3):1206-14 (2007).

65. Horzic, D., Komes, D., Belscak, A., Ganic, K.K., Ivekovic, D. and Karlovic, D. The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chem.* 115(2):441-8 (2009).

66. Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M. and Merillon, J.M. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *J Agric Food Chem.* 57(5):1768-74 (2009).

67. de Oliveira, A.C., Valentim, I.B., Silva, C.A., Bechara, E.J.H., Barros, M.P.d., Mano, C.M., et al. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. *Food Chem.* 115(2):469-75 (2009).

68. Wittenauer, J., Falk, S., Schweiggert-Weisz, U. and Carle, R. Characterisation and quantification of xanthones from the aril and pericarp of mangosteens (Garcinia mangostana L.) and a mangosteen containing functional beverage by HPLC–DAD–MSn. *Food Chem.* 134(1):445-52 (2012).

69. Fathiazad, F., Delazar, A., Amiri, R. and Sarker, S.D. Extraction of Flavonoids and Quantification of Rutin from waste Tobacco Leaves. *Iran J Pharm Res.* 5(3):6 (2006).

70. Karioti, A., Kitsaki, C.K., Zygouraki, S., Ziobora, M., Djeddi, S., Skaltsa, H., et al. Occurrence of flavonoids in Ophrys (Orchidaceae) flower parts. *Flora*. 203(7):602-9 (2008).

71. Sevin, A., Oztas, P., Senen, D., Han, U., Karaman, C., Tarimci, N., et al. Effects of polyphenols on skin damage due to ultraviolet A rays: an experimental study on rats. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 21(5):650-6 (2007).

72. Trompezinski, S., Denis, A., Schmitt, D. and Viac, J. Comparative effects of polyphenols from green tea (EGCG) and soybean (genistein) on VEGF and IL-8 release from normal human keratinocytes stimulated with the proinflammatory cytokine TNF alpha. *Arch Dermatol Res.* 295(3):112-6 (2003).

73. Aggarwal, B.B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R.S., Seeram, N.P., Shishodia, S. and Takada, Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 24(5A):2783-840 (2004).

74. Osmond, G.W., Augustine, C.K., Zipfel, P.A., Padussis, J. and Tyler, D.S. Enhancing Melanoma Treatment with Resveratrol. *J Surg Res.* 172(1):109-15 (2012).

75. Jacobo-Velázquez, D.A. and Cisneros-Zevallos, L. Correlations of Antioxidant Activity against Phenolic Content Revisited: A New Approach in Data Analysis for Food and Medicinal Plants. *J Food Sci.* 74(9):R107-R13 (2009).

76. Nagle, D.G., Ferreira, D. and Zhou, Y.-D. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry*. 67(17):1849-55 (2006).

77. Katiyar, S.K., Afaq, F., Perez, A. and Mukhtar, H. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Carcinogenesis.* 22(2):287-94 (2001).

78. Stleger, A.S., Cochrane, A.L. and Moore, F. FACTORS ASSOCIATED WITH CARDIAC MORTALITY IN DEVELOPED-COUNTRIES WITH PARTICULAR REFERENCE TO THE CONSUMPTION OF WINE. *Lancet.* 1(8124):1017-20 (1979).

79. Opie, L.H. and Lecour, S. The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules. *Eur Heart J.* 28(14):1683-93 (2007).

80. Aggarwal, B.B., Bharwaj, A., Aggarwal, R.S., Seeram, N.P., Shishodia, S. and Takada, Y. Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies. *Anticancer Res.* 24(5A):2783-840 (2004).

81. Michels, G. Vergleichende Untersuchungen protektiver und zytotoxischer Effekte von Polyphenolen in kultivierten Säugerzellen. Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2005).

82. Kim, Y.-J., Uyama, H. and Kobayashi, S. Inhibition effects of (+)-catechin-aldehyde polycondensates on proteinases causing proteolytic degradation of extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun.* 320(1):256-61 (2004).

83. Otto, A., Du Plessis, J. and Wiechers, J.W. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *Int J Cosmet Sci.* 31(1):1-19 (2009).

84. Schubert, H. *Emulgiertechnik - Grundlagen, Verfahren und Anwendungen*. Hamburg: Behr's Verlag (2005).

85. Eccleston, G.M. and Florence, A.T. Application of emulsion theory to complex and real systems. *International Journal of Cosmetic Science*. 7(5):195-212 (1985).

86. Rähse, W. and Dicoi, O. Produktdesign disperser Stoffe: Emulsionen für die kosmetische Industrie. *Chemie Ingenieur Technik.* 81(9):1369-83 (2009).

87. Capek, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 107(2-3):125-55 (2004).

88. Mühlbach, M. Nutzung des Zentrifugalkraftfeldes für die Vorhersage der Langzeitstabilität von kosmetischen Emulsionen [Dissertation]. Karlsruhe: Universitätsverlag Karlsruhe; (2007).

89. Mezger, T.G. *Das Rheologie Handbuch*. 2. Auflage ed. Hannover: Vincentz Network GmbH & Co KG (2006).

90. Derkach, S.R. Rheology of emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 151(1–2):1-23 (2009).

91. Brummer, R. *Rheology essentials of cosmetic and food emulsions*. Berlin: Springer (2006).

92. Kurz, G. *Kosmetische Emulsionen und Cremes - Formulierung, Herstellung, Prüfung.* Augsburg: Verlag für chemische Industrie H.Ziolkovsky GmbH (2001).

93. Gassenmeier, T. and Busch, P. Sensory Assessment zur Prüfung der Wirkung galenischer Konzepte. In: *13 Symposium der DGK Wirksamkeit der Kosmetika - Anspruch und Wirklichkeit*, p.^pp. 23-31. Verlag für chemische Industrie H.Ziolkovsky GmbH, Bad Neuenahr (1999).

94. Busch-Stockfisch, M. *Praxishandbuch Sensorik*. 24. Aktualisierungslieferung ed. Hamburg: Behr's Verlag (2002).

95. Hansen, S., Lehr, C.-M. and Schaefer, U.F. Improved input parameters for diffusion models of skin absorption. *Adv Drug Deliv Rev.* 65(2):251-64 (2013).

96. Riedel, S. Vergleichende Untersuchungen zur dermalen Penetration und Permeation in Diffusionszellen [Dissertation]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; (2003).

97. Frauen, M. Analytik kosmetisch wirksamer Pflanzenextrakte mit der Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS). Studien zur Stabilität in kosmetischen Mitteln und zum in vitro Penetrationsverhalten [Dissertation]. Hamburg: Universität Hamburg; (2001).

98. Huong, S.P., Bun, H., Fourneron, J.-D., Reynier, J.-P. and Andrieu, V. Use of various models for in vitro percutaneous absorption studies of ultraviolet filters. *Skin Res Technol.* 15(3):253-61 (2009).

99. Shah, J.C. Analysis of permeation data: evaluation of the lag time method. *Int J Pharm.* 90(2):161-9 (1993).

100. Shah, J.C., Kaka, I., Tenjarla, S., Lau, S.W.J. and Chow, D. Analysis of percutaneous permeation data: II. Evaluation of the lag time method. *Int J Pharm.* 109(3):283-90 (1994).

101. Higuchi, W.I. Analysis of data on the medicament release from ointments. *J Pharm Sci.* 51(8):802-4 (1962).

102. Ritger, P.L. and Peppas, N.A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J Control Release*. 5(1):23-36 (1987).

103. Popa, M.I., Aelenei, N., Popa, V.I. and Andrei, D. Study of the interactions between polyphenolic compounds and chitosan. *React Funct Polym.* 45(1):35-43 (2000).

104. Zillich, O.V., Schweiggert-Weisz, U., Hasenkopf, K., Eisner, P. and Kerscher, M. Antioxidant activity, lipophilicity and extractability of polyphenols from pig skin – development of analytical methods for skin permeation studies *Biomed Chromatogr.* 27(11):1444-51 (2013 (a)).

105. Zillich, O.V., Schweiggert-Weisz, U., Hasenkopf, K., Eisner, P. and Kerscher, M. Release and *in vitro* skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsions *Int J Cosmet Sci.* 35:491-501 (2013 (b)).

106. Hung, C.F., Lin, Y.K., Huang, Z.R. and Fang, J.Y. Delivery of resveratrol, a red wine polyphenol, from solutions and hydrogels via the skin. *Biol Pharm Bull.* 31(5):955-62 (2008).

107. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 26(9-10):1231-7 (1999).

108. Medvidovic-Kosanovic, M., Seruga, M., Jakobek, L. and Novak, I. Electrochemical and Antioxidant Properties of (+)-Catechin, Quercetin and Rutin. *Croat Chem Acta*. 83(2):197-207 (2010).

109. Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L.R., Gardner, P.T., Heinonen, M.I., Hopia, A., et al. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *Eur Food Res Technol.* 212(3):319-28 (2001).

110. Viskupicova, J., Danihelova, M., Ondrejovic, M., Liptaj, T. and Sturdik, E. Lipophilic rutin derivatives for antioxidant protection of oil-based foods. *Food Chem.* 123(1):45-50 (2010).

111. Rothwell, J.A., Day, A.J. and Morgan, M.R.A. Experimental Determination of Octanol–Water Partition Coefficients of Quercetin and Related Flavonoids. *J Agric Food Chem.* 53(11):4355-60 (2005).

112. Seif, S. and Hansen, S. Measuring the stratum corneum reservoir: Desorption kinetics from keratin. *J Pharm Sci.* 101(10):3718-28 (2012).

113. Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B. and Simic, M.G. Flavonoids as Antioxidants. *J Am Chem Soc.* 116(11):4846-51 (1994).

114. Jovanovic, S.V., Hara, Y., Steenken, S. and Simic, M.G. Antioxidant Potential of Gallocatechins. A Pulse Radiolysis and Laser Photolysis Study. *J Am Chem Soc.* 117(39):9881-8 (1995).

115. López-Nicolás, J.M. and García-Carmona, F. Aggregation State and pKa Values of (E)-Resveratrol As Determined by Fluorescence Spectroscopy and UV–Visible Absorption. *J Agric Food Chem.* 56(17):7600-5 (2008).

116. Fang, J.-Y., Hwang, T.-L., Huang, Y.-L. and Fang, C.-L. Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes incorporating anionic surfactants and ethanol. *Int J Pharm.* 310(1-2):131-8 (2006).

117. Casagrande, R., Georgetti, S.R., Verri, J.W.A., Borin, M.F., Lopez, R.F.V. and Fonseca, M.J.V. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. *Int J Pharm.* 328(2):183-90 (2007).

118. Dal Belo, S.E., Gaspar, L.R., Campos, P. and Marty, J.P. Skin Penetration of Epigallocatechin-3-Gallate and Quercetin from Green Tea and Ginkgo biloba Extracts Vehiculated in Cosmetic Formulations. *Skin Pharmacol Physiol.* 22(6):299-304 (2009).

119. Frauen, M., Rode, T., Rapp, C. and Steinhart, H. Determination of green-tea catechins in cosmetic formulations and in in-vitro skin extracts by high-performance liquid

chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Chromatographia*. 55(1):43-8 (2002).

120. Korsmeyer, R.W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P. and Peppas, N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int J Pharm.* 15(1):25-35 (1983).

121. Karasulu, E., Yeşim Karasulu, H., Ertan, G., Kirilmaz, L. and Güneri, T. Extended release lipophilic indomethacin microspheres: formulation factors and mathematical equations fitted drug release rates. *Eur J Pharm Sci.* 19(2–3):99-104 (2003).

122. Papadopoulou, A. and Frazier, R.A. Characterization of protein-polyphenol interactions. *Trends Food Sci Technol.* 15(3-4):186-90 (2004).

123. Fitzpatrick, D., Corish, J. and Hayes, B. Modelling skin permeability in risk assessment - the future. *Chemosphere*. 55(10):1309-14 (2004).

124. Luo, Z., Murray, B.S., Ross, A.-L., Povey, M.J.W., Morgan, M.R.A. and Day, A.J. Effects of pH on the ability of flavonoids to act as Pickering emulsion stabilizers. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 92(0):84-90 (2012).

125. Kitagawa, S., Yoshii, K., Morita, S. and Teraoka, R. Efficient Topical Delivery of Chlorogenic Acid by an Oil-in-Water Microemulsion to Protect Skin against UV-Induced Damage. *Chem Pharm Bull.* 59(6):793-6 (2011).

126. Batchelder, R.J., Calder, R.J., Thomas, C.P. and Heard, C.M. *In vitro* transdermal delivery of the major catechins and caffeine from extract of Camellia sinensis. *Int J Pharm.* 283(1-2):45-51 (2004).

127. Barbero, A.M. and Frasch, H.F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review. *Toxicol in Vitro*. 23(1):1-13 (2009).

128. Netzlaff, F., Schaefer, U.F., Lehr, C.-M., Meiers, P., Stahl, J., Kietzmann, M., et al. Comparison of bovine udder skin with human and porcine skin in percutaneous permeation experiments. *Altern Lab Anim.* 34(5):499-513 (2006).

129. Pilpel, N. and Rabbani, M.E. Formation of liquid crystals in sunflower oil in water emulsions. *J Colloid Interface Sci.* 119(2):550-8 (1987).

130. Di Mambro, V.M. and Fonseca, M.J.V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. *J Pharm Biomed Anal.* 37(2):287-95 (2005).

131. Le Bourvellec, C. and Renard, C. Interactions between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms. *Crit Rev Food Sci.* 52(1-3):213-48 (2012).

132. de Freitas, V., Carvalho, E. and Mateus, N. Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chem.* 81(4):503-9 (2003).

133. Ozawa, T., Lilley, T.H. and Haslam, E. Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry*. 26(11):2937-42 (1987).

134. Gohtani, S., Sirendi, M., Yamamoto, N., Kajikawa, K. and Yamano, Y. Effect of droplet size on oxidation of docosahexaenoic acid in emulsion system. *J Dispersion Sci Technol.* 20(5):1319-25 (1999).

135. Johnson, W., Jr. Amended final report on the safety assessment of Glyceryl Dilaurate, Glyceryl Diarachidate, Glyceryl Dibehenate, Glyceryl Dierucate, Glyceryl Dihydroxystearate, Glyceryl Diisopalmitate, Glyceryl Diisostearate, Glyceryl Dilinoleate, Glyceryl Dimyristate, Glyceryl Dioleate, Glyceryl Diricinoleate, Glyceryl Dipalmitate, Glyceryl Dipalmitoleate, Glyceryl Distearate, Glyceryl Palmitate Lactate, Glyceryl Stearate Citrate, Glyceryl Stearate Lactate, and Glyceryl Stearate Succinate. *Int J Toxicol.* 26:1-30 (2007).

136. http://www.sigmaaldrich.com.

137. Ribeiro, H.M., Morais, J.A. and Eccleston, G.M. Structure and rheology of semisolid o/w creams containing cetyl alcohol/non-ionic surfactant mixed emulsifier and different polymers. *Int J Cosmet Sci.* 26(2):47-59 (2004).

138. Stöckmann, H., Schwarz, K. and Huynh-Ba, T. The influence of various emulsifiers on the partitioning and antioxidant activity of hydroxybenzoic acids and their derivatives in oil-in-water emulsions. *J Am Oil Chem Soc.* 77(5):535-42 (2000).

139. Richards, M.P., Chaiyasit, W., McClements, D.J. and Decker, E.A. Ability of Surfactant Micelles to Alter the Partitioning of Phenolic Antioxidants in Oil-in-Water Emulsions. *J Agric Food Chem.* 50(5):1254-9 (2002).

140. Porter, W.L. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. *Toxicol Ind Health.* 9(1-2):93-122 (1993).

141. Fujimura, T., Sugata, K., Haketa, K. and Hotta, M. Roughness analysis of the skin as a secondary evaluation criterion in addition to visual scoring is sufficient to evaluate ethnic differences in wrinkles. *Int J Cosmet Sci.* 31(5):361-7 (2009).

142. Bastianetto, S., Dumont, Y., Duranton, A., Vercauteren, F., Breton, L. and Quirion, R. Protective action of resveratrol in human skin: possible involvement of specific receptor binding sites. *PloS one.* 5(9) (2010).

143. Jayaprakasha, G.K., Selvi, T. and Sakariah, K.K. Antibacterial and antioxidant activities of grape (Vitis vinifera) seed extracts. *Food Res Int.* 36(2):117-22 (2003).

144. Chan, M.M.Y. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochem Pharmacol.* 63(2):99-104 (2002).

145. Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W.W., et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 275(5297):218-20 (1997).

146. Bowers, J.L., Tyulmenkov, V.V., Jernigan, S.C. and Klinge, C.M. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 141(10):3657-67 (2000).

147. Gehm, B.D., McAndrews, J.M., Chien, P.-Y. and Jameson, J.L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(25):14138-43 (1997).

148. Lu, R. and Serrero, G. Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells. *J Cell Physio*. 179(3):297-304 (1999).

149. Goswami, S.K. and Das, D.K. Resveratrol and chemoprevention. *Cancer Letters*. 284(1):1-6 (2009).

150. Sreekumar, P., Narayan, M., Paton, G., Joseph, P. and Marieann, B., Cosmetic compositions containing resveratrol and retinoids. US Patent 6358517. (2002).

151. Hashem, M.A., Jun, K.Y., Lee, E., Lim, S., Choo, H.Y.P. and Kwon, Y. A Rapid and Sensitive Screening System for Human Type I Collagen with the Aim of Discovering Potent Anti-Aging or Anti-Fibrotic Compounds. *Mol Cells.* 26(6):625-30 (2008).

152. Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M., Muto, Y., Takizawa, T. and Terao, J. In Vivo Comparison of the Bioavailability of (+)-Catechin, (-)-Epicatechin and Their Mixture in Orally Administered Rats. *J Nutr.* 131(11):2885-91 (2001).

153. Buonocore, D., Lazzeretti, A., Tocabens, P., Nobile, V., Cestone, E., Santin, G., et al. Resveratrol-procyanidin blend: nutraceutical and antiaging efficacy evaluated in a placebocontrolled, double-blind study. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 5 (2012).

154. Janjua, R., Munoz, C., Gorell, E., Rehmus, W., Egbert, B., Kern, D., et al. A Two-Year, Double-Blind, Randomized Placebo-Controlled Trial of Oral Green Tea Polyphenols on the Long-Term Clinical and Histologic Appearance of Photoaging Skin. *Dermatol Surg.* 35(7):1057-65 (2009).

155. Heinrich, U., Moore, C.E., De Spirt, S., Tronnier, H. and Stahl, W. Green Tea Polyphenols Provide Photoprotection, Increase Microcirculation, and Modulate Skin Properties of Women. *J Nutr.* 141(6):1202-8 (2011).

156. Chiu, A.E., Chan, J.L., Kern, D.G., Kohler, S., Rehmus, W.E. and Kimball, A.B. Doubleblinded, placebo-controllecl trial of green tea extracts in the clinical and histologic appearance of photoaging skin. *Dermatol Surg.* 31(7):855-9 (2005).

157. Chuarienthong, P., Lourith, N. and Leelapornpisid, P. Clinical efficacy comparison of anti-wrinkle cosmetics containing herbal flavonoids. *Int J Cosmet Sci.* 32(2):99-106 (2010).

158. DGF. Determination of oxidative stability - Accelerated oxidation test to determine the Induction period. Method C-VI 6f (06). In: *Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen (DGF Standard Methods) 15 Supplement*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (2010).

159. Kivevele, T.T., Mbarawa, M.M., Bereczky, A., Laza, T. and Madarasz, J. Impact of antioxidant additives on the oxidation stability of biodiesel produced from Croton Megalocarpus oil. *Fuel Process Technol.* 92(6):1244-8 (2011).

160. Gottschalk, G. and Kaiser, R.E. *Einführung in die Varianzanalyse und Ringversuche* Mannhiem: Bibliografisches Institut (1976).

Anhang



A1. Korrelationen bei den rheologischen Messungen

Abb. A.1. Korrelation zwischen elastischem (G') und komplexem (G*) Modul bei den Oszillationsmessungen von Emulsionen



Abb. A.2. Korrelation zwischen elastischem (G') und viskosem (G") Modul bei den Oszillationsmessungen von Emulsionen

A2. Lagerstabilität von Polyphenolen

Emulsion (O/W- Verhältnis)	РСА	Catechin	Rutin	Resveratrol	Quercetin	Gesamt
S1 (25/75)						
C₀* [mg/g]	0,20±0,00	0,23±0,01	0,16±0,00	0,17±0,01	0,18±0,00	0,94±0,03
Stabilität* 5 °C [%]	92,1±1,8	98,3±8,0	86,3±4,0	90,0±3,8	98,7±4,1	93,5±4,4
Stabilität* 20 °C						
[%]	92,1±1,8	98,3±8,0	86,3±4,0	90,0±3,8	98,7±4,1	93,5±4,4
Stabilität* 40 °C						
[%]	85,4±1,4	33,3±7,8	83,8±4,7	67,0±3,4	99,3±9,3	71,4±5,3
S2 (35/65)						
C ₀ [mg/g]	0,17±0,00	0,22±0,01	0,20±0,00	0,19±0,00	$0,18 \pm 0,00$	0,96±0,02
Stabilität 5 °C [%]	98,6±2,9	92,3±3,5	94,3±3,7	96,4±4,6	99,0±2,8	95,9±3,3
Stabilität 20 °C [%]	93,7±7,9	97,1±5,2	96,5±4,2	94,5±5,2	91,0±7,7	94,7±5,8
Stabilität 40 °C [%]	85,7±2,3	27,1±1,1	82,2±3,2	66,9±2,5	98,4±4,0	70,2±2,6
S3 (45/65)						
C ₀ [mg/g]	0,21±0,00	0,22±0,01	0,21±0,01	0,19±0,00	$0,17 \pm 0,00$	1,01±0,02
Stabilität 5 °C [%]	84,0±5,1	95,6±5,9	94,8±6,3	91,7±5,8	98,2±6,2	92,7±5,8
Stabilität 20 °C [%]	79,2±4,3	91,9±7,3	96,3±4,1	86,0±4,1	94,7±9,0	89,5±5,6
Stabilität 40 °C [%]	83,3±4,3	26,2±2,5	92,8±6,8	73,2±3,1	97,1±9,1	73,1±5,0
T1 (25/75)						
C ₀ [mg/g]	0,17±0,01	0,15±0,01	0,18±0,02	0,15±0,01	$0,12\pm0,01$	0,76±0,06
Stabilität 5 °C [%]	94,4±10,2	92,1±10,9	94,0±15,6	94,0±8,0	96,7±12,8	94,2±8,8
Stabilität 20 °C [%]	90,2±9,2	87,9±8,7	85,2±11,4	87,9±7,9	87,8±11,5	87,8±9,7
Stabilität 40 °C [%]	97,7±8,5	23,0±1,9	102,6±10,6	92,6±7,6	68,1±11,2	78,8±7,9
T2 (35/65)						
C ₀ [mg/g]	0,16±0,00	$0,14 \pm 0,00$	0,19±0,00	0,14±0,01	0,17±0,02	0,80±0,03
Stabilität 5 °C [%]	86,6±2,3	102,2±5,5	94,3±5,4	100,3±6,4	94,4±11,6	95,1±5,5
Stabilität 20 °C [%]	84,9±5,9	91,7±3,2	95,2±4,9	96,7±7,4	87,4±11,2	91,1±6,0
Stabilität 40 °C [%]	86,3±6,1	42,8±7,3	75,2±7,6	64,0±3,9	34,0±3,9	61,0±5,2
T3 (45/55)						
C ₀ [mg/g]	0,18±0,01	0,15±0,01	0,20±0,01	0,16±0,01	$0,18 \pm 0,00$	0,86±0,05
Stabilität 5 °C [%]	93,2±11,4	99,5±10,0	91,7±5,3	98,3±8,8	79,5±3,5	92,1±7,1
Stabilität 20 °C [%]	88,6±6,8	90,2±9,0	89,3±4,4	98,7±8,3	74,1±4,9	87,9±5,9
Stabilität 40 °C [%]	91,6±10,6	20,8±7,0	66,0±5,2	50,8±6,4	3,9±1,7	47,6±6,0

Tabelle A.1. Lagerstabilität einzelner Polyphenolen in den Emulsionen mit Gesamtpolyphenolgehalt C1 = 0,09 ± 0,01 % nach der 4-monatigen Lagerung bei 5, 20 und 40 °C

*Mittelwerte ± SD, n = 3

Emulsion (O/W- Verhältnis)	РСА	Catechin	Rutin	Resveratrol	Quercetin	Gesamt
S1 (25/75)						
C₀* [mg/g]	0,98±0,01	1,11±0,02	0,79±0,01	0,87±0,00	0,90±0,01	4,65±0,06
Stabilität* 5 °C [%]	94,2±1,6	88,8±2,3	97,2±2,5	96,0±2,9	99,7±4,2	94,8±2,5
Stabilität* 20 °C						
[%]	94,2±1,6	88,8±2,3	97,2±2,5	96,0±2,9	99,7±4,2	94,8±2,5
Stabilität* 40 °C						
[%]	89,3±1,7	51,6±2,0	93,6±2,8	93,8±2,3	99,0±6,3	83,7±2,9
S2 (35/65)						
C ₀ [mg/g]	0,95±0,00	1,12±0,01	$1,04 \pm 0,00$	0,98±0,01	0,89±0,01	4,98±0,04
Stabilität 5 °C [%]	86,8±8,3	87,8±2,6	93,8±7,4	96,5±8,8	99,8±11,6	92,7±7,5
Stabilität 20 °C [%]	85,8±3,9	88,9±6,9	91,2±3,6	97,7±3,0	94,2±7,1	91,5±4,9
Stabilität 40 °C [%]	90,9±5,0	57,4±1,8	91,5±5,0	91,9±4,8	99,6±10,7	85,2±5,2
S3 (45/65)						
C ₀ [mg/g]	0,92±0,01	1,07±0,01	1,06±0,01	1,01±0,02	0,96±0,01	5,03±0,06
Stabilität 5 °C [%]	98,9±2,9	91,9±1,5	95,9±8,2	97,1±5,8	99,2±10,2	96,5±5,7
Stabilität 20 °C [%]	98,3±6,2	90,6±3,5	94,3±10,0	97,6±10,8	98,0±4,9	95,6±7,1
Stabilität 40 °C [%]	101,3±1,7	56,2±0,9	93,2±7,4	93,3±7,2	98,8±6,7	87,9±4,7
T1 (25/75)						
C ₀ [mg/g]	0,90±0,02	0,79±0,01	0,90±0,01	0,81±0,03	0,86±0,02	4,28±0,08
Stabilität 5 °C [%]	96,2±2,2	98,7±2,2	96,2±1,2	102,7±4,1	94,0±2,8	97,4±2,4
Stabilität 20 °C [%]	91,7±3,9	90,8±3,2	94,1±3,6	98,7±7,4	93,5±4,6	93,7±4,5
Stabilität 40 °C [%]	96,2±3,0	77,2±7,9	86,9±15,6	99,7±17,3	93,2±12,9	90,8±11,2
T2 (35/65)						
C ₀ [mg/g]	0,83±0,01	0,75±0,01	0,90±0,01	0,80±0,02	0,83±0,01	4,10±0,05
Stabilität 5 °C [%]	98,7±1,4	100,5±1,6	99,9±0,8	100,4±2,1	94,5±0,7	98,8±1,3
Stabilität 20 °C [%]	97,2±1,4	99,1±1,6	100,0±0,8	97,8±2,0	95,7±0,7	98,0±1,3
Stabilität 40 °C [%]	96,1±5,4	69,9±1,8	95,7±13,6	98,4±13,5	100,0±13,5	92,4±9,7
T3 (45/55)						
C ₀ [mg/g]	0,83±0,01	0,78±0,02	0,93±0,03	0,84±0,01	0,87±0,00	4,25±0,08
Stabilität 5 °C [%]	93,7±4,3	97,2±6,8	92,6±3,4	99,7±1,8	84,4±2,2	93,4±3,5
Stabilität 20 °C [%]	88,4±9,7	96,9±12,5	93,7±6,7	97,6±5,8	85,4±7,7	92,3±8,3
Stabilität 40 °C [%]	82,7±9,4	57,9±3,7	91,8±8,0	78,8±7,3	73,4±6,5	77,5±7,0

Tabelle A.2. Lagerstabilität einzelner Polyphenolen in den Emulsionen mit Gesamtpolyphenolgehalt C2 = 0,45 \pm 0,04 % nach der 4-monatigen Lagerung bei 5, 20 und 40 °C

*Mittelwerte ± SD, n = 3

$ \begin{array}{c} \textbf{S1 (25/75)} \\ \hline C_0^* [mg/g] & 1,86 \pm 0,01 & 2,18 \pm & 0,01 & 1,39 \pm & 0,01 & 1,58 \pm & 0,01 & 1,75 \pm & 0,03 & 8,76 \pm 0,07 \\ \hline Stabilität* 5 ^{\circ}C [\%] & 100,6 \pm & 0,8 & 94,9 \pm & 1,6 & 98,7 \pm & 1,5 & 99,6 \pm & 1,0 & 99,0 \pm & 4,2 & 98,4 \pm & 1,8 \\ \hline Stabilität* 20 ^{\circ}C \\ \hline [\%] & 100,6 \pm & 0,8 & 94,9 \pm & 1,6 & 98,7 \pm & 1,5 & 99,6 \pm & 1,0 & 99,0 \pm & 4,2 & 98,4 \pm & 1,8 \\ \hline Stabilität* 40 ^{\circ}C \\ \hline [\%] & 102,2 \pm & 1,1 & 61,9 \pm & 1,7 & 97,8 \pm & 1,3 & 99,4 \pm & 1,3 & 101,8 \pm & 5,3 & 90,9 \pm & 2,1 \\ \hline \textbf{S2 (35/65)} \\ \hline C_0 [mg/g] & 1,87 \pm 0,01 & 2,04 \pm & 0,02 & 1,98 \pm & 0,02 & 1,86 \pm & 0,02 & 1,73 \pm & 0,03 & 9,48 \pm 0,09 \\ \hline \textbf{Stabilität 5 ^{\circ}C [\%] & 99,9 \pm & 6,1 & 88,5 \pm & 2,6 & 99,5 \pm & 4,4 & 99,7 \pm & 5,6 & 99,7 \pm & 10,9 & 97,3 \pm & 5,7 \\ \hline \textbf{Stabilität 5 ^{\circ}C [\%] & 98,9 \pm & 4,9 & 93,3 \pm & 3,8 & 98,4 \pm & 4,0 & 98,0 \pm & 4,8 & 99,7 \pm & 4,9 & 97,5 \pm & 4,5 \\ \hline \textbf{Stabilität 40 ^{\circ}C [\%] & 101,6 \pm & 4,6 & 59,0 \pm & 2,0 & 99,8 \pm & 5,5 & 100,7 \pm & 5,4 & 100,6 \pm & 7,4 & 91,7 \pm & 4,9 \\ \hline \textbf{Stabilität 5 ^{\circ}C [\%] & 98,2 \pm & 1,7 & 82,8 \pm & 2,2 & 97,2 \pm & 2,9 & 98,4 \pm & 4,6 & 99,9 \pm & 4,7 & 95,1 \pm & 3,1 \\ \hline \textbf{Stabilität 20 ^{\circ}C [\%] & 97,3 \pm & 3,9 & 91,0 \pm & 1,8 & 98,5 \pm & 3,4 & 98,6 \pm & 2,6 & 97,4 \pm & 6,0 & 96,5 \pm & 3,4 \\ \hline \textbf{Stabilität 20 ^{\circ}C [\%] & 98,6 \pm & 1,7 & 56,6 \pm & 1,8 & 94,6 \pm & 4,3 & 95,5 \pm & 5,4 & 99,6 \pm & 7,6 & 88,4 \pm 3,9 \\ \hline \textbf{T1 (25/75)} \\ \hline C_0 [mg/g] & 1,83 \pm 0,00 & 1,58 \pm & 0,03 & 1,85 \pm & 0,05 & 1,69 \pm & 0,01 & 1,65 \pm & 0,01 & 8,59 \pm 0,09 \\ \hline \end{array}$
$\begin{array}{c} C_0^* [mg/g] & 1,86 \pm 0,01 & 2,18 \pm & 0,01 & 1,39 \pm & 0,01 & 1,58 \pm & 0,01 & 1,75 \pm & 0,03 & 8,76 \pm 0,07 \\ \text{Stabilität* 5 }^\circ C [\%] & 100,6 \pm & 0,8 & 94,9 \pm & 1,6 & 98,7 \pm & 1,5 & 99,6 \pm & 1,0 & 99,0 \pm & 4,2 & 98,4 \pm & 1,8 \\ \text{Stabilität* 20 }^\circ C & & & & & & & & & & & & & & & & & & $
$\begin{array}{c} \mbox{Stabilität}^{*} 5 \ {}^{\circ} C \ [\%] \ 100, 6 \pm \ 0, 8 \ 94, 9 \pm \ 1, 6 \ 98, 7 \pm \ 1, 5 \ 99, 6 \pm \ 1, 0 \ 99, 0 \pm \ 4, 2 \ 98, 4 \pm \ 1, 8 \ 500 \ 100, 6 \pm \ 0, 8 \ 94, 9 \pm \ 1, 6 \ 98, 7 \pm \ 1, 5 \ 99, 6 \pm \ 1, 0 \ 99, 0 \pm \ 4, 2 \ 98, 4 \pm \ 1, 8 \ 500 \ 100, 6 \pm \ 0, 0 \ 100, 6 \pm \ 0, 0 \ 90, 9 \pm \ 1, 0 \ 99, 0 \pm \ 4, 2 \ 98, 4 \pm \ 1, 8 \ 1, 8 \ 1, 100, 9 \ 1, 1$
$\begin{array}{c} \mbox{Stabilität* 20 °C} \\ [\%] 100,6\pm 0,8 & 94,9\pm 1,6 & 98,7\pm 1,5 & 99,6\pm 1,0 & 99,0\pm 4,2 & 98,4\pm 1,8 \\ \mbox{Stabilität* 40 °C} \\ [\%] 102,2\pm 1,1 & 61,9\pm 1,7 & 97,8\pm 1,3 & 99,4\pm 1,3 & 101,8\pm 5,3 & 90,9\pm 2,1 \\ \hline \mbox{S2 (35/65)} \\ \mbox{C}_0 [mg/g] & 1,87\pm 0,01 & 2,04\pm 0,02 & 1,98\pm 0,02 & 1,86\pm 0,02 & 1,73\pm 0,03 & 9,48\pm 0,09 \\ \mbox{Stabilität 5 °C [\%] } 99,9\pm 6,1 & 88,5\pm 2,6 & 99,5\pm 4,4 & 99,7\pm 5,6 & 99,7\pm 10,9 & 97,3\pm 5,7 \\ \mbox{Stabilität 20 °C [\%] } 98,9\pm 4,9 & 93,3\pm 3,8 & 98,4\pm 4,0 & 98,0\pm 4,8 & 99,7\pm 4,9 & 97,5\pm 4,5 \\ \mbox{Stabilität 40 °C [\%] } 101,6\pm 4,6 & 59,0\pm 2,0 & 99,8\pm 5,5 & 100,7\pm 5,4 & 100,6\pm 7,4 & 91,7\pm 4,9 \\ \hline \mbox{Stabilität 5 °C [\%] } 98,2\pm 1,7 & 82,8\pm 2,2 & 97,2\pm 2,9 & 98,4\pm 4,6 & 99,9\pm 4,7 & 95,1\pm 3,1 \\ \mbox{Stabilität 20 °C [\%] } 98,2\pm 1,7 & 82,8\pm 2,2 & 97,2\pm 2,9 & 98,4\pm 4,6 & 99,9\pm 4,7 & 95,1\pm 3,1 \\ \mbox{Stabilität 20 °C [\%] } 98,6\pm 1,7 & 56,6\pm 1,8 & 94,6\pm 4,3 & 95,5\pm 5,4 & 99,6\pm 7,6 & 88,4\pm 3,9 \\ \mbox{T1 (25/75)} \\ \mbox{C}_0 [mg/g] & 1,83\pm 0,00 & 1,58\pm 0,03 & 1,85\pm 0,05 & 1,69\pm 0,01 & 1,65\pm 0,01 & 8,59\pm 0,09 \\ \mbox{C}_0 [mg/g] & 1,83\pm 0,00 & 1,58\pm 0,03 & 1,85\pm 0,05 & 1,69\pm 0,01 & 1,65\pm 0,01 & 8,59\pm 0,09 \\ \mbox{C}_0 [mg/g] & 1,83\pm 0,00 & 1,58\pm 0,03 & 1,85\pm 0,05 & 1,69\pm 0,01 & 1,65\pm 0,01 & 8,59\pm 0,09 \\ \mbox{C}_0 [mg/g] & 1,83\pm 0,00 & 1,58\pm 0,03 & 1,85\pm 0,05 & 1,69\pm 0,01 & 1,65\pm 0,01 & 8,59\pm 0,09 \\ \mbox{C}_0 [mg/g] & 1,83\pm 0,00 & 1,58\pm 0,03 & 1,85\pm 0,05 & 1,69\pm 0,01 & 1,65\pm 0,01 & 8,59\pm 0,09 \\ \mbox{C}_0 [mg/g] & 1,83\pm 0,00 & 1,58\pm 0,03 & 1,85\pm 0,05 & 1,69\pm 0,01 & 1,65\pm 0,01 & 8,59\pm 0,09 \\ \mbox{C}_0 [mg/g] & 1,83\pm 0,00 & 1,58\pm 0,03 & 1,85\pm 0,05 & 1,69\pm 0,01 & 1,65\pm 0,01 & 8,59\pm 0,09 \\ \mbox{C}_0 [mg/g] & 1,83\pm 0,00 & 1,58\pm 0,03 & 1,85\pm 0,05 & 1,69\pm 0,01 & 1,65\pm 0,01 & 8,59\pm 0,09 \\ \mbox{C}_0 [mg/g] & 1,83\pm 0,00 & 1,58\pm 0,03 & 1,85\pm 0,05 & 1,69\pm 0,01 & 1,65\pm 0,01 & 8,59\pm 0,09 \\ \mbox{C}_0 [mg/g] & 1,83\pm 0,00 & 1,58\pm 0,03 & 1,85\pm 0,05 & 1,69\pm 0,01 & 1,65\pm 0,01 & 8,59\pm 0,09 \\ \mbox{C}_0 [mg/g] & 1,83\pm 0,00 & 1,58\pm 0,03 & 1,85\pm 0,05 & 1,69\pm 0,01 & 1,65\pm 0,01 \\ \mbox{C}_0 [mg/$
$ \begin{bmatrix} \% \end{bmatrix} 100,6 \pm 0,8 & 94,9 \pm 1,6 & 98,7 \pm 1,5 & 99,6 \pm 1,0 & 99,0 \pm 4,2 & 98,4 \pm 1,8 \\ Stabilität * 40 °C \\ \hline \begin{tabular}{lllllllllllllllllllllllllllllllllll$
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
$ \begin{bmatrix} \% \end{bmatrix} 102,2 \pm 1,1 & 61,9 \pm 1,7 & 97,8 \pm 1,3 & 99,4 \pm 1,3 & 101,8 \pm 5,3 & 90,9 \pm 2,1 \\ \textbf{52 (35/65)} \\ \hline C_0 [mg/g] & 1,87 \pm 0,01 & 2,04 \pm & 0,02 & 1,98 \pm & 0,02 & 1,86 \pm & 0,02 & 1,73 \pm & 0,03 & 9,48 \pm 0,09 \\ \hline Stabilität 5 ^{\circ}C [\%] & 99,9 \pm 6,1 & 88,5 \pm 2,6 & 99,5 \pm & 4,4 & 99,7 \pm & 5,6 & 99,7 \pm & 10,9 & 97,3 \pm & 5,7 \\ \hline Stabilität 20 ^{\circ}C [\%] & 98,9 \pm 4,9 & 93,3 \pm & 3,8 & 98,4 \pm & 4,0 & 98,0 \pm & 4,8 & 99,7 \pm & 4,9 & 97,5 \pm & 4,5 \\ \hline Stabilität 40 ^{\circ}C [\%] & 101,6 \pm & 4,6 & 59,0 \pm & 2,0 & 99,8 \pm & 5,5 & 100,7 \pm & 5,4 & 100,6 \pm & 7,4 & 91,7 \pm & 4,9 \\ \hline \textbf{53 (45/65)} \\ \hline C_0 [mg/g] & 1,96 \pm 0,03 & 2,11 \pm & 0,03 & 2,04 \pm & 0,04 & 1,93 \pm & 0,04 & 1,84 \pm & 0,05 & 9,89 \pm 0,19 \\ \hline Stabilität 20 ^{\circ}C [\%] & 98,2 \pm & 1,7 & 82,8 \pm & 2,2 & 97,2 \pm & 2,9 & 98,4 \pm & 4,6 & 99,9 \pm & 4,7 & 95,1 \pm & 3,1 \\ \hline Stabilität 20 ^{\circ}C [\%] & 97,3 \pm & 3,9 & 91,0 \pm & 1,8 & 98,5 \pm & 3,4 & 98,6 \pm & 2,6 & 97,4 \pm & 6,0 & 96,5 \pm & 3,4 \\ \hline Stabilität 40 ^{\circ}C [\%] & 98,6 \pm & 1,7 & 56,6 \pm & 1,8 & 94,6 \pm & 4,3 & 95,5 \pm & 5,4 & 99,6 \pm & 7,6 & 88,4 \pm & 3,9 \\ \hline \textbf{T1 (25/75)} \\ \hline C_0 [mg/g] & 1,83 \pm 0,00 & 1,58 \pm & 0,03 & 1,85 \pm & 0,05 & 1,69 \pm & 0,01 & 1,65 \pm & 0,01 & 8,59 \pm 0,09 \\ \hline \end{bmatrix}$
$\begin{array}{c} \textbf{S2 (35/65)} \\ \hline C_0 \ [mg/g] & 1,87 \pm 0,01 & 2,04 \pm & 0,02 & 1,98 \pm & 0,02 & 1,86 \pm & 0,02 & 1,73 \pm & 0,03 & 9,48 \pm 0,09 \\ \hline Stabilität 5 ^{\circ}C \ [\%] & 99,9 \pm & 6,1 & 88,5 \pm & 2,6 & 99,5 \pm & 4,4 & 99,7 \pm & 5,6 & 99,7 \pm & 10,9 & 97,3 \pm & 5,7 \\ \hline Stabilität 20 ^{\circ}C \ [\%] & 98,9 \pm & 4,9 & 93,3 \pm & 3,8 & 98,4 \pm & 4,0 & 98,0 \pm & 4,8 & 99,7 \pm & 4,9 & 97,5 \pm & 4,5 \\ \hline Stabilität 40 ^{\circ}C \ [\%] & 101,6 \pm & 4,6 & 59,0 \pm & 2,0 & 99,8 \pm & 5,5 & 100,7 \pm & 5,4 & 100,6 \pm & 7,4 & 91,7 \pm & 4,9 \\ \hline \textbf{S3 (45/65)} \\ \hline C_0 \ [mg/g] & 1,96 \pm 0,03 & 2,11 \pm & 0,03 & 2,04 \pm & 0,04 & 1,93 \pm & 0,04 & 1,84 \pm & 0,05 & 9,89 \pm 0,19 \\ \hline Stabilität 5 ^{\circ}C \ [\%] & 98,2 \pm & 1,7 & 82,8 \pm & 2,2 & 97,2 \pm & 2,9 & 98,4 \pm & 4,6 & 99,9 \pm & 4,7 & 95,1 \pm & 3,1 \\ \hline Stabilität 20 ^{\circ}C \ [\%] & 97,3 \pm & 3,9 & 91,0 \pm & 1,8 & 98,5 \pm & 3,4 & 98,6 \pm & 2,6 & 97,4 \pm & 6,0 & 96,5 \pm & 3,4 \\ \hline \textbf{Stabilität 40 ^{\circ}C \ [\%] & 98,6 \pm & 1,7 & 56,6 \pm & 1,8 & 94,6 \pm & 4,3 & 95,5 \pm & 5,4 & 99,6 \pm & 7,6 & 88,4 \pm & 3,9 \\ \hline \textbf{T1 (25/75)} \\ \hline C_0 \ [mg/g] \ 1,83 \pm 0,00 & 1,58 \pm & 0,03 & 1,85 \pm & 0,05 & 1,69 \pm & 0,01 & 1,65 \pm & 0,01 & 8,59 \pm 0,09 \\ \hline \end{array}$
$\begin{array}{c} C_0 \left[mg/g \right] & 1,87 \pm 0,01 & 2,04 \pm & 0,02 & 1,98 \pm & 0,02 & 1,86 \pm & 0,02 & 1,73 \pm & 0,03 & 9,48 \pm 0,09 \\ \text{Stabilität 5 }^\circ C \left[\%\right] & 99,9 \pm & 6,1 & 88,5 \pm & 2,6 & 99,5 \pm & 4,4 & 99,7 \pm & 5,6 & 99,7 \pm & 10,9 & 97,3 \pm & 5,7 \\ \text{Stabilität 20 }^\circ C \left[\%\right] & 98,9 \pm & 4,9 & 93,3 \pm & 3,8 & 98,4 \pm & 4,0 & 98,0 \pm & 4,8 & 99,7 \pm & 4,9 & 97,5 \pm & 4,5 \\ \text{Stabilität 40 }^\circ C \left[\%\right] & 101,6 \pm & 4,6 & 59,0 \pm & 2,0 & 99,8 \pm & 5,5 & 100,7 \pm & 5,4 & 100,6 \pm & 7,4 & 91,7 \pm & 4,9 \\ \hline \textbf{S3 (45/65)} \\ \hline C_0 \left[mg/g \right] & 1,96 \pm 0,03 & 2,11 \pm & 0,03 & 2,04 \pm & 0,04 & 1,93 \pm & 0,04 & 1,84 \pm & 0,05 & 9,89 \pm 0,19 \\ \text{Stabilität 5 }^\circ C \left[\%\right] & 98,2 \pm & 1,7 & 82,8 \pm & 2,2 & 97,2 \pm & 2,9 & 98,4 \pm & 4,6 & 99,9 \pm & 4,7 & 95,1 \pm & 3,1 \\ \text{Stabilität 20 }^\circ C \left[\%\right] & 97,3 \pm & 3,9 & 91,0 \pm & 1,8 & 98,5 \pm & 3,4 & 98,6 \pm & 2,6 & 97,4 \pm & 6,0 & 96,5 \pm & 3,4 \\ \text{Stabilität 40 }^\circ C \left[\%\right] & 98,6 \pm & 1,7 & 56,6 \pm & 1,8 & 94,6 \pm & 4,3 & 95,5 \pm & 5,4 & 99,6 \pm & 7,6 & 88,4 \pm & 3,9 \\ \hline \textbf{T1 (25/75)} \\ \hline C_0 \left[mg/g \right] & 1,83 \pm 0,00 & 1,58 \pm & 0,03 & 1,85 \pm & 0,05 & 1,69 \pm & 0,01 & 1,65 \pm & 0,01 & 8,59 \pm 0,09 \\ \hline \end{array}$
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
$\begin{tabular}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$
T1 (25/75) $C_0 \text{ [mg/g]}$ 1,83±0,00 1,58± 0,03 1,85± 0,05 1,69± 0,01 1,65± 0,01 8,59±0,09
$C_0 [mg/g]$ 1,83±0,00 1,58± 0,03 1,85± 0,05 1,69± 0,01 1,65± 0,01 8,59±0,09
Stabilität 5 °C [%] 100,4±13,2 94,2± 10,5 97,8± 10,9 100,4± 12,3 100,3± 10,7 98,7±11,5
Stabilität 20 °C [%] 98,2 ± 4,4 90,0 ± 8,2 94,6 ± 8,7 101,0 ± 8,7 93,6 ± 6,3 95,6 ± 7,2
Stabilität 40 °C [%] 85,8± 1,3 79,0± 1,8 87,4± 3,0 87,6± 1,5 96,7± 1,5 87,3± 1,8
T2 (35/65)
C ₀ [mg/g] 1,70±0,11 1,47± 0,10 1,75± 0,12 1,59± 0,10 1,69± 0,14 8,20±0,57
Stabilität 5 °C [%] 99,4± 6,6 99,1± 6,8 98,9± 6,7 99,4± 6,3 99,1± 8,1 99,2± 6,9
Stabilität 20 °C [%] 99,2± 6,5 100,2± 6,9 99,7± 6,8 98,7± 6,2 99,4± 8,1 99,4± 6,9
Stabilität 40 °C [%] 98,3 ± 7,0 90,3 ± 8,3 99,5 ± 10,8 98,1 ± 9,7 96,3 ± 10,2 96,7 ± 9,1
T3 (45/55)
C ₀ [mg/g] 1,74±0,09 1,57± 0,09 1,82± 0,13 1,64± 0,08 1,70± 0,09 8,48±0,49
Stabilität 5 °C [%] 87,8± 4,7 100,7± 7,2 88,4± 7,2 92,4± 6,6 85,4± 6,0 90,7± 6,3
Stabilität 20 °C [%] 95,7± 5,1 96,8± 5,8 97,2± 7,2 103,7± 5,5 91,2± 5,2 96,9± 5,8
Stabilität 40 °C [%] 97,3± 6,7 73,2± 5,7 103,8± 9,9 99,8± 8,3 91,7± 6,0 93,6± 7,3

Tabelle A.3. Lagerstabilität einzelner Polyphenolen in den Emulsionen mit Gesamtpolyphenolgehalt C3 = 0,89 ± 0,06 % nach der 4-monatigen Lagerung bei 5, 20 und 40 °C

*Mittelwerte ± SD, n = 3

A3. Muster Einverständniserklärung für Humanuntersuchung

Untersuchung: Evaluierung der Anti-Aging Wirksamkeit Polyphenol-haltiger kosmetischer Produkte

Zeitraum: 16. Januar 2013 – 22. März 2013

Ich erkläre:

- 1. Die Zielsetzung des Versuchs, die Einzelheiten seiner Durchführung und die mir zugedachte Rolle als Proband wurden mir detailliert erläutert und von mir verstanden.
- 2. Den Beiblatt "Probandeninformation" habe ich erhalten und zur Kenntnis genommen.
- 3. Ich wurde eingehend über alle Risiken belehrt, die für mich durch die Teilnahme an den experimentellen Untersuchungen auftreten können, wie beispielsweise eine allergische Kontaktdermatitis, die mit Hilfe eines Epikutantestes (Patchtest) zu Beginn der Studie verifiziert wird.
- 4. Ich bin belehrt worden, dass ich jederzeit den Abbruch meiner Teilnahme an der Studie verlangen kann.
- 5. Der beschriebene Versuch endet erst mit der entsprechenden formellen Erklärung des Studienleiters.
- 6. Mir ist bekannt und ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser Studie personenbezogene Daten über mich erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die erhobene Daten dürfen anonymisiert statistisch ausgewertet und veröffentlicht werden.
- 7. Informationen, die mir im Rahmen des Versuchs zugänglich geworden sind, halte ich geheim und gebe diese nicht an Dritte weiter, sofern dies nicht zur Wahrung meiner schutzwürdigen Interessen notwendig ist.
- 8. Die Fraunhofer-Gesellschaft darf die produzierten Bilder ohne jede zeitliche, örtliche und inhaltliche Einschränkung publizistisch verwenden.
- 9. Ich erkläre abschließend, dass ich <u>freiwillig</u> an der genannten Studie teilnehme und dass mein Einverständnis für den gesamten Studienzeitraum gültig ist.

Name: _____

Ort, Datum:_____

Unterschrift: _____

A4. Beiblatt "Probandeninformation"

Probandennummer_____

Im Rahmen dieser Studie wird die Auswirkung einer kosmetischen Emulsion, die Resveratrol enthält, auf die biophysikalischen Hautparameter getestet, wie Hautelastizität, Feuchtigkeit, Rauheit.

Zu Beginn der Studie wird ein Patch-Test auf die allergische Kontaktdermatitis durchgeführt. Hierzu wird das Produkt auf den Unterarm appliziert, mit einem Pflaster zugeklebt und für 24 h auf der Haut belassen. Im Falle einer allergischen Reaktion können Sie an der Studie leider nicht teilnehmen.

Am ersten Tag der Studie werden die Ausgangswerte Ihrer biophysikalischen Hautparameter ermittelt. Daher bitten wir Sie, am Tag der Messung keine Hautpflegeprodukte und kein Make-up zu verwenden.

Sie bekommen 2 Cremedosen. Bitte benutzen Sie diese Cremes innerhalb von acht Wochen unter Beachtung folgender Punkte:

Auftragen jeden Tag morgens und abends auf den linken bzw. rechten Unterarm und die Stirn. Dabei wird eine Creme stets links, und die andere stets rechts aufgetragen:

Probe Nr._____links; Probe Nr._____rechts.

- Auftragsmenge: ca. 0,1 g (ca. 1 mm) für den Unterarm, halbe Menge für die Stirn, die Creme so lange einreiben, bis sie eingezogen ist.

- Übliche Hautreinigungsprodukte verwenden; die Testcremes erst ca. 10 min nach der Reinigung (Duschen) applizieren.

- Keine anderen Hautpflegeprodukte an den getesteten Arealen verwenden.

- Cremes am besten im Kühlschrank lagern.

Jede Woche erfolgt eine erneute Evaluierung Ihrer Hautparameter. Bitte an den Messungstagen kein Make-up auftragen und die Testcremes spätestens 2 h vor der Messung applizieren.

Falls während der Anwendung die Hautirritationen auftreten sollten, geben Sie bitte der Studienleiterin umgehend Bescheid.

Falls Sie während der Studie krank werden, eine medizinische (z.B. eine OP) oder kosmetische (wie z.B. Tätoovierung, Tiefenpeeleng) Behandlung bekommen, oder neue Medikamente einnehmen müssen, informieren Sie bitte die Studienleiterin.

Ihre persönlichen Messtermine: Wochentag:_____

1.	0.Tag:
2	Nach 2 Wacha

Ζ.		

3. Nach 4 Wochen_____

4. Nach 8 Wochen_____





Abb. A.3. Flächenrauheit von Unterarmen vor (Tag 0), während (2, 4 Wochen) und nach der Applikation der Creme. Sq, quadratischer Rauwert, 95 % Konfidenzinderval. Rsv, Resveratrol-haltige Formulierung, Plac, Placebo. *Signifikante Unterschiede zu dem Tag 0, # Signifikante Unterschiede zwischen den Formulierungen, zweifaktorielle ANOVA, paarweiser Vergleich mittels Tukey-Tests, $\alpha = 0,05$, N = 15



Abb. A.4. Sternrauheit von Unterarmen vor (Tag 0), während (2, 4 Wochen) und nach der Applikation der Creme. Rq, quadratischer Rauwert, 95 % Konfidenzinderval. Rsv, Resveratrol-haltige Formulierung, Plac, Placebo. *Signifikante Unterschiede zu dem Tag 0, # Signifikante Unterschiede zwischen den Formulierungen, zweifaktorielle ANOVA, paarweiser Vergleich mittels Tukey-Tests, $\alpha = 0,05$, N = 15



Abb. A.5. Flächenrauheit der Stirn vor (Tag 0), während (2, 4 Wochen) und nach der Applikation der Creme. Sq, quadratischer Rauwert, 95 % Konfidenzinderval. Rsv, Resveratrol-haltige Formulierung, Plac, Placebo. *Signifikante Unterschiede zu dem Tag 0, # Signifikante Unterschiede zwischen den Formulierungen, zweifaktorielle ANOVA, paarweiser Vergleich mittels Tukey-Tests, $\alpha = 0,05$, N = 12



Abb. A.6. Sternrauheit der Stirn vor (Tag 0), während (2, 4 Wochen) und nach der Applikation der Creme. Ra, arithmetischer Rauwert, 95 % Konfidenzinderval. Rsv, Resveratrol-haltige Formulierung, Plac, Placebo. *Signifikante Unterschiede zu dem Tag 0, # Signifikante Unterschiede zwischen den Formulierungen, zweifaktorielle ANOVA, paarweiser Vergleich mittels Tukey-Tests, $\alpha = 0,05$, N = 12



Abb. A.7. Sternrauheit der Stirn vor (Tag 0), während (2, 4 Wochen) und nach der Applikation der Creme. Rq, quadratischer Rauwert, 95 % Konfidenzinderval. Rsv, Resveratrol-haltige Formulierung, Plac, Placebo. *Signifikante Unterschiede zu dem Tag 0, # Signifikante Unterschiede zwischen den Formulierungen, zweifaktorielle ANOVA, paarweiser Vergleich mittels Tukey-Tests, $\alpha = 0,05$, N = 12



Abb. A.8. Mittlere Tiefe der größten gemessenen Falte vor (Tag 0), während (2, 4 Wochen) und nach der Applikation der Creme (8 Wochen), 95% Konfidenzintervall. Rsv, Resveratrol-haltige Formulierung, Plac, Placebo. * Signifikante Unterschiede zu dem Tag 0, # Signifikante Unterschiede zwischen den Formulierungen, zweifaktorielle ANOVA, paarweiser Vergleich mittels Tukey-Tests, $\alpha = 0,05$; N = 12



Abb. A.9. Maximale Tiefe der größten gemessenen Falte vor (Tag 0), während (2, 4 Wochen) und nach der Applikation der Creme (8 Wochen), 95% Konfidenzintervall. Rsv, Resveratrol-haltige Formulierung, Plac, Placebo. * Signifikante Unterschiede zu dem Tag 0, # Signifikante Unterschiede zwischen den Formulierungen, zweifaktorielle ANOVA, paarweiser Vergleich mittels Tukey-Tests, $\alpha = 0,05$; N = 12

Danksagung

Ich möchte allen danken, ohne die diese Arbeit nicht hätte entstehen können, insbesondere den Gutachtern Prof. Martina Kerscher und Prof. Horst-Christian Langowski, meinen Betreuern am Fraunhofer-Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung in Freising Dr. Peter Eisner und Dr. Ute Weisz, den freiwilligen Probanden, die an der Humanuntersuchung teilgenommen haben, Birgit Kern, Sandrina Lange und Ljubov Bodasin für die praktische Unterstützung im Labor und allen Kollegen aus der Abteilung VP/VL für die hervorragende Zusammenarbeit. Und natürlich danke ich meiner Familie und ganz besonders meinem Mann Matthias für die Unterstützung, Motivierung und Geduld.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben.

Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Datum _____ Unterschrift _____