

Analytik kosmetisch wirksamer Pflanzenextrakte mit der Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS)

Studien zur Stabilität in kosmetischen Mitteln
und zum in vitro Penetrationsverhalten

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

aus dem
Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
-Abteilung Lebensmittelchemie-
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Markus Frauen

aus Hemme

Hamburg 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1998 bis November 2000 unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. H. Steinhart (Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie), Dr. U. Hintze und Dr. C. Rapp in der Analytischen Forschung der Beiersdorf AG, Hamburg, durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Steinhart
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. M. Kerscher

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2001

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und das stete Interesse an dieser Arbeit sowie der Bereitstellung der hervorragenden Rahmenbedingungen möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart, Herrn Dr. U. Hintze und Herrn Dr. C. Rapp sehr bedanken.

Für die freundliche Übernahme des Koreferats danke ich Frau Prof. Dr. M. Kerscher.

Ich danke Herrn Dr. K.-P. Wittern für die Möglichkeit, dass die vorliegende Arbeit im Bereich der Analytischen Forschung der Beiersdorf AG, Hamburg, durchgeführt werden konnte.

Für die sehr gute wissenschaftliche und technische Betreuung sowie die stetige Diskussionsbereitschaft danke ich Herrn M. Straßner.

Mein Dank gilt weiterhin:

Herrn Dr. U. Schönrock und Herrn T. Rode für zwei Jahre beste Zusammenarbeit

Herrn Dr. D. Emeis und Herrn Dr. T. Sokolowski für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen

Frau Dr. M. Franzen-Hintze für das Korrekturlesen von Texten in englischer Sprache sowie Herrn Dr. J.-P. Vietzke und Frau S. Koopmann für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die konstruktiven Kommentare

Den Mitarbeitern der Analytischen Forschung der Beiersdorf AG, Hamburg

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung	3
3	Allgemeine Grundlagen	4
3.1	Camellia sinensis	4
3.1.1	Botanik und Drogengewinnung	4
3.1.2	Inhaltsstoffe	5
3.1.3	Pharmakologische Wirkungen und Anwendungen	8
3.1.4	Toxikologie	10
3.1.5	Auswahl von Leitsubstanzen	10
3.2	Calendula officinalis	11
3.2.1	Botanik und Drogengewinnung	11
3.2.2	Inhaltsstoffe	12
3.2.3	Pharmakologische Wirkungen und Anwendungen	14
3.2.4	Toxikologie	16
3.2.5	Auswahl von Leitsubstanzen	17
3.3	Glycyrrhiza glabra	18
3.3.1	Botanik und Drogengewinnung	18
3.3.2	Inhaltsstoffe	18
3.3.3	Pharmakologische Wirkungen und Anwendungen	20
3.3.4	Toxikologie	21
3.3.5	Auswahl von Leitsubstanzen	22
3.4	Terminalia sericea	23
3.4.1	Botanik und Drogengewinnung	23
3.4.2	Inhaltsstoffe	23
3.4.3	Pharmakologische Wirkungen und Anwendungen	24
3.4.4	Toxikologie	25
3.4.5	Auswahl von Leitsubstanzen	25

3.5	Echinacea purpurea	26
3.5.1	Botanik und Drogengewinnung	26
3.5.2	Inhaltsstoffe	26
3.5.3	Pharmakologische Wirkungen und Anwendungen	28
3.5.4	Toxikologie	29
3.5.5	Auswahl von Leitsubstanzen	30
3.6	Kosmetische Formulierungen	31
4	Material und Methoden	32
4.1	Untersuchungsmaterial	32
4.2	Untersuchung von Pflanzenextrakten	32
4.2.1	Lagerungsversuche	32
4.2.2	Untersuchung der Penetrationseigenschaften	33
4.2.3	Kopplung Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie	35
4.3	Methodenvalidierung und statistische Methoden	38
5	Ergebnisse	40
5.1	Camellia sinensis	40
5.1.1	Analytik	40
5.1.2	Catechingehalte in pflanzlichen Rohstoffen	52
5.1.3	Lagerstabilität in W/O-Emulsionen	53
5.1.4	Verbesserung der Lagerstabilität in W/O-Emulsionen	54
5.1.5	Lagerstabilität in O/W-Emulsionen	56
5.1.6	Einfluss der Ascorbinsäure-Konzentration auf die Lagerstabilität von Emulsionen	57
5.1.7	Ascorbinsäure-Gehalte in den Emulsionen	60
5.1.8	Penetrationseigenschaften von Camellia sinensis-Extrakten	61
5.2	Calendula officinalis	63
5.2.1	Analytik	63
5.2.2	Lagerstabilität in O/W-Emulsionen	74
5.2.3	Verbesserung der Lagerstabilität in O/W-Emulsionen	75
5.2.4	Penetrationseigenschaften von Calendula officinalis-Extrakten	76

5.3	Glycyrrhiza glabra	79
5.3.1	Analytik	79
5.3.2	Glycyrrhizinsäure- und 18 β -Glycyrrhetinsäure-Gehalte in pflanzlichen Rohstoffen	86
5.3.3	Lagerstabilität in Emulsionen	87
5.3.4	Penetrationseigenschaften von Glycyrrhiza glabra-Extrakten	88
5.4	Terminalia sericea	90
5.4.1	Analytik	90
5.4.2	Sericosid-Gehalte in pflanzlichen Rohstoffen	97
5.4.3	Lagerstabilität in Emulsionen	97
5.4.4	Penetrationseigenschaften von Terminalia sericea-Extrakten	98
5.5	Echinacea purpurea	100
5.5.1	Analytik	100
5.5.2	Cichoriensäure-Gehalte in pflanzlichen Rohstoffen	106
5.5.3	Lagerstabilität in Emulsionen	107
5.5.4	Penetrationseigenschaften von Echinacea purpurea-Extrakten	108
6	Diskussion	110
6.1	Analytik	111
6.2	Untersuchungsergebnisse	117
6.2.1	Gehalte an kosmetisch wirksamen Inhaltsstoffen in den Extrakten	117
6.2.2	Untersuchung der Lagerstabilitäten	119
6.2.3	Untersuchung der Penetrationseigenschaften	123
7	Zusammenfassung	126
8	Summary	128
9	Anhang	130
9.1	Pflanzenextrakte und kosmetische Formulierungen	130
9.1.1	Camellia sinensis	130
9.1.2	Calendula officinalis	132
9.1.3	Glycyrrhiza glabra	133

Inhaltsverzeichnis

9.1.4	Terminalia sericea	135
9.1.5	Echinacea purpurea	136
9.2	Methoden	138
9.2.1	Allgemeine Methodenparameter	138
9.2.2	Camellia sinensis	139
9.2.3	Calendula officinalis	142
9.2.4	Glycyrrhiza glabra	146
9.2.5	Terminalia sericea	148
9.2.6	Echinacea purpurea	150
9.3	Tabellenanhang	153
9.3.1	Camillia sinensis	153
9.3.2	Calendula officinalis	165
9.3.3	Glycyrrhiza glabra	168
9.3.4	Terminalia sericea	169
9.3.5	Echinacea purpurea	170
9.4	Chemikalien und Geräte	171
9.4.1	Chemikalien	171
9.4.2	Geräte und Zubehör	173
10	Literatur	174

Abkürzungsverzeichnis

amu	atomic mass unit
API	atmospheric pressure ionization
BHA	Butylhydroxyanisol
BHT	Butylhydroxytoluol
BR	Brutschrank bei +40 °C
BSG	Bestimmungsgrenze
C	(±)-Catechin
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
CE	Kapillarelektrophorese
CID	collision induced dissociation
D	Dermis
DC	Dünnschichtchromatographie
d ₄ -Methanol	deuteriertes Methanol
E	Epidermis
EC	(-)-Epicatechin
ECG	(-)-Epicatechingallat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGC	(-)-Epigallocatechin
EGCG	(-)-Epigallocatechingallat
ES	electrospray
FAB	fast atom bombardment
FIA	flow injection analysis
GCG	(-)-Gallocatechingallat
Gew.-%	Gewichtsprozent
H	Hornschicht
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
INCI	international nomenclature of cosmetic ingredients
Intens. norm.	normierte Intensität
LC/MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
LD ₅₀	letale Dosis, bei der 50 % der Versuchstiere eingehen
m/z	Masse pro Ladung

Abkürzungsverzeichnis

MG	Molekulargewicht
Mo	Monat
MS	Massenspektrometer, massenspektrometrisch
MS/MS	tandem-massenspektrometrisch
n	Anzahl der Einzelmessungen
n.	nachweisbar
n.n.	nicht nachweisbar
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NWG	Nachweisgrenze
O	Oberfläche
O/W	Öl-in-Wasser
P	statistische Sicherheit
ppm	chemische Verschiebung in parts per million
R	Rezeptorphase
Rel. Intens.	relative Intensität
Rel. Stabw.	relative Standardabweichung
RP	reversed-phase
RT	Raumtemperatur
RT+L	Raumtemperatur unter Lichteinfluss
S/N	Peak/Rausch-Verhältnis
SDS	sodium dodecyl sulfate
SIM	selected ion monitoring
Stabw.	Standardabweichung
s_x	Standardabweichung
t	STUDENT-Faktor
THF	Tetrahydrofuran
TIC	total ion current
TMS	Tetramethylsilan
UV	ultraviolett
Vertrauensber.	Vertrauensbereich
Vit C	Vitamin C, Ascorbinsäure
W/O	Wasser-in-Öl
WFR	Wiederfindungsrate
x	Mittelwert

1 Einleitung

Mit der Rückbesinnung auf die Heilkräfte der Natur haben in den letzten Jahren Pflanzenextrakte zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die Einsatzmöglichkeiten der Pflanzenextrakte reichen von therapeutischen bis hin zu kosmetischen Anwendungen [1, 2, 3, 4]. Bei den kosmetischen Mitteln stehen vor allem Produkte zur Hautpflege im Mittelpunkt. Derzeit werden ca. 800 verschiedene Pflanzen und Pflanzenteile für kosmetische Zwecke verwendet bzw. ihre Verwendung diskutiert [5].

Pflanzenextrakte sind durch Extraktion hergestellte Zubereitungen aus pflanzlichem Material. Im Gegensatz zu chemisch klar definierten kosmetischen Roh- und Wirkstoffen sind Pflanzenextrakte in der Regel komplexe Stoffgemische. Die Zusammensetzung von Pflanzenextrakten kann trotz gleicher INCI (*international nomenclature of cosmetic ingredients*)-Bezeichnung stark variieren. Die Zusammensetzung eines Extraktes ist dabei von verschiedenen Faktoren abhängig. Neben den verwendeten Pflanzenteilen spielt auch die genetische Variabilität eine wichtige Rolle. Darüber hinaus können natürliche Gegebenheiten wie Klima und Bodenbeschaffenheit sowie Erntezeit, Trocknungsbedingungen und Extraktionsmittel den Wirkstoffgehalt von Pflanzenextrakten beeinflussen [6, 7, 8].

Zur Herstellung wirksamer kosmetischer Mittel unter Verwendung von Pflanzenextrakten ist eine Charakterisierung der pflanzlichen Rohstoffe hinsichtlich ihrer Wirkstoffgehalte erforderlich [7, 9]. Die Stabilität pflanzlicher Wirkstoffe ist eine wichtige Voraussetzung für ihren Einsatz in kosmetischen Mitteln. Einerseits führt ein Wirkstoffabbau zu einer Verringerung der Wirksamkeit der Produkte, andererseits können sich Abbauprodukte negativ auf die Verträglichkeit auswirken. Kosmetische Mittel, die eine Mindesthaltbarkeit von 30 Monaten oder weniger aufweisen, dürfen nach § 5 Kosmetik-Verordnung gewerbsmäßig nur in den Verkehr gebracht werden, wenn das Mindesthaltbarkeitsdatum angegeben ist [12]. Ein weiteres Kriterium für die Auswahl geeigneter Pflanzenextrakte ist das Penetrationsverhalten der Wirkstoffe in die Haut. Während die Penetration der pflanzlichen Wirkstoffe in die lebenden Zellschichten der Epidermis zur Erzielung bestimmter Wirkungen erwünscht ist, sollte eine perkutane Absorption kosmetischer Inhaltsstoffe aus pharmakologischen und toxikologischen Gründen ausgeschlossen werden. Eine perkutane Absorption,

d. h. ein Durchgang dieser Substanzen durch die Haut verbunden mit einer möglichen Resorption, kann zu Überschneidungen mit dem Arzneimittel-Bereich führen. Nach § 2 des Arzneimittelgesetzes sind *„Arzneimittel (...) Stoffe und Zubereitungen aus Stoffen, die dazu bestimmt sind, durch Anwendung am oder im menschlichen (...) Körper (...) die Beschaffenheit, den Zustand oder die Funktionen des Körpers (...) zu beeinflussen“*, d. h. eine signifikante therapeutische bzw. systemische Wirkung am bzw. im menschlichen Körper auszuüben [10, 11].

Erkenntnisse der Stabilitäts- und Penetrationsuntersuchungen sind bei der Entwicklung von kosmetischen Mitteln von Interesse, da nur bei einer ausreichenden Stabilität und bei einem entsprechenden Penetrationsverhalten eine Wirkung zu erzielen ist. Die Wichtigkeit dieser Untersuchungen ergibt sich auch aus § 5b der Kosmetik-Verordnung [12], nach der ein Hersteller den *„(...) Nachweis der Wirkung eines kosmetischen Mittels, sofern im Verkehr oder in der Werbung darauf hingewiesen wird (...) oder sofern eine Wirkung besonders hervorgehoben wird“* bereitzuhalten hat.

Zur Charakterisierung von Pflanzenextrakten und zur Bestimmung pflanzlicher Wirkstoffe in kosmetischen Formulierungen und biologischen Proben sind selektive und empfindliche Analysenverfahren erforderlich. Die Untersuchung der Lagerstabilität und des Penetrationsverhaltens erfordert ferner den Einsatz schneller und standardisierter Methoden. Die Analytik der komplex zusammengesetzten Extrakte wird sowohl durch die geringen Konzentrationen in den kosmetischen Formulierungen als auch durch z. T. fehlende Referenzverbindungen zusätzlich erschwert [13].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Extrakte folgender Pflanzen untersucht: *Camellia sinensis* (Grüner Tee), *Calendula officinalis* (Ringelblume), *Glycyrrhiza glabra* (Süßholz), *Terminalia sericea* (Gelbholz) und *Echinacea purpurea* (Sonnenhut). Diesen fünf Extrakten wird in der Fachliteratur eine kosmetische Wirksamkeit zugesprochen. Darüber hinaus werden Leitsubstanzen benannt, die im wesentlichen für die Wirkung der Extrakte verantwortlich sind.

2 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen Extrakte folgender Pflanzen mit Hilfe der Kopplung Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS) untersucht werden: *Camellia sinensis*, *Calendula officinalis*, *Glycyrrhiza glabra*, *Terminalia sericea* und *Echinacea purpurea*. Diesen fünf Extrakten wird in der Fachliteratur eine kosmetische Wirksamkeit zugesprochen. Im Vordergrund der Untersuchungen steht die massenspektrometrische Darstellung und Quantifizierung kosmetisch wirksamer Leitsubstanzen, um die Extrakte hinsichtlich ihrer Wirkstoffgehalte charakterisieren zu können.

Darüber hinaus sollen die Lagerstabilitäten der Pflanzenextrakte in kosmetischen Formulierungen ermittelt werden. Die Verteilung der Pflanzenextrakte in der Haut soll mit Hilfe eines *in vitro* Penetrationsmodells untersucht werden.

Im einzelnen ergeben sich folgende Ziele:

- Identifizierung isolierter Leitsubstanzen durch massenspektrometrische Fragmentierungsexperimente und kernresonanzspektroskopische (*nuclear magnetic resonance*, NMR) Untersuchungen
- Charakterisierung der Leitsubstanzen mit einem *atmospheric pressure ionization-electrospray* (API-ES)-Massenspektrometer und Entwicklung von chromatographischen Trennungen (LC/MS) zur Bestimmung der Leitsubstanzen in kosmetischen Formulierungen und biologischen Proben
- Charakterisierung von Pflanzenextrakten verschiedener Lieferanten bzw. unterschiedlicher Herstellungsverfahren hinsichtlich ihrer Wirkstoffgehalte
- Ermittlung der Lagerstabilitäten der Pflanzenextrakte in unterschiedlichen kosmetischen Formulierungen unter definierten Bedingungen und gegebenenfalls Optimierung der Lagerstabilitäten durch Zusatz von Hilfsstoffen
- Untersuchung der Penetrationseigenschaften der Pflanzenextrakte mit einem *in vitro* Modell nach einmaliger Applikation der kosmetischen Formulierungen auf präparierter Schweinehaut

3 Allgemeine Grundlagen

3.1 Camellia sinensis

3.1.1 Botanik und Drogengewinnung

Die Gattung *Camellia* LINNÉ umfasst etwa 80 Arten und gehört zur Familie der Theaceae. Teeblätter werden ausschließlich von *Camellia sinensis* (L.) O. KUNTZE gewonnen. Bei dieser Art handelt es sich um eine alte Kulturpflanze, die ursprünglich aus dem südostasiatischen Bergland stammt, heute jedoch kein natürliches Vorkommen mehr hat. *C. sinensis* ist fremdbestäubend und variiert daher sowohl morphologisch als auch in den Inhaltsstoffen recht stark. Eine eindeutige Abgrenzung der Varietäten ist schwierig. In der Praxis hat sich die Unterscheidung der Varietäten *C. sinensis* var. *sinensis* und *C. sinensis* var. *assamica* bewährt. Angebaut werden heute aber fast ausschließlich deren Hybriden, die durch Schnitt eine buschartige Form von ca. 1 m Höhe erhalten. Tee wird zwischen 45 ° nördlicher und 30 ° südlicher Breite angebaut. Hauptanbaugebiete sind u. a. Indien, China, Sri Lanka, Türkei, Indonesien, ehem. GUS und Japan [14, 15].

Bei *Camellia sinensis* handelt es sich um einen immergrünen, reich verzweigten Strauch, der im wilden Zustand baumartig wächst. Die Blätter sind wechselständig, ledrig und dunkelgrün [16].

Zur Drogengewinnung werden die sehr jungen, flaumig-behaarten Blätter des Teestrauchs (*Theae folium*) verwendet. Da die jüngsten Blätter die besten Qualitätsmerkmale besitzen, wird zwischen folgenden Pflückqualitäten unterschieden

- Imperial: Pekospitze, d. h. das noch nicht entfaltete oberste Blatt allein
- Fein: Pekospitze und 2 Blätter (die übliche Pflückform: *two and a bud*)
- Grob: Pekospitze und 3 Blätter

Die Ernte erfolgt in den tropischen Gebieten das ganze Jahr über, in den gemäßigten Zonen saisonbedingt. Die Ernte wird entweder manuell oder maschinell durchgeführt, wobei manuell wesentlich selektiver gepflückt werden kann [16].

Die gewonnenen Blätter können auf verschiedene Weise aufbereitet werden. So erhält man entweder den fermentierten Schwarzen Tee (*Theae nigrae folium*), den unfermentierten Grünen Tee (*Theae viridis folium*) oder den halbfermentierten Oolong-Tee. Grüner Tee wird erhalten, indem durch Erhitzen der frischen Blätter für einige Minuten in rotierenden zylindrischen Behältern mit überhitztem Wasserdampf oder in flachen eisernen Pfannen die blatteigenen Enzyme inaktiviert werden. Anschließend werden die Blätter maschinell gerollt, der Wassergehalt durch Trocknen auf 50 % herabgesetzt, nochmals gerollt und an der Sonne getrocknet [15, 16].

3.1.2 Inhaltsstoffe

Die Hauptinhaltsstoffe der Teeblätter sind Polyphenole, Purinalkaloide (Methylxanthine), Aminosäuren, Polysaccharide, Proteine und Lipide. Zu den Minorbestandteilen zählen organische Säuren, flüchtige Stoffe, Vitamine und Mineralstoffe [17, 18, 19]. Ein Überblick über die Inhaltsstoffe von unfermentiertem Grünen Tee und fermentiertem Schwarzen Tee ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 Inhaltsstoffe von Grünem und Schwarzen Tee (% Trockengewicht) [14]

Inhaltsstoffe	Grüner Tee	Schwarzer Tee
Polyphenole, gesamt	25 - 35	~ 30
- Flavan-3-ole (Catechine)	17 - 30	~ 10
- Flavonole	3 - 4	~ 5
- Phenolsäuren, Depside	~ 5	~ 4
- Theaflavine	–	0,3 - 1,8
- Thearubigine	–	9 - 19
Coffein	3 - 4	3 - 4
Aminosäuren	~ 4	~ 4
Organische Säuren	~ 0,5	~ 0,5
Polysaccharide	~ 13	~ 13
Proteine	~ 15	~ 15
Lipide	~ 3	
Flüchtige Stoffe	~ 0,01 - 0,02	0,01

Wie in Tabelle 1 zu erkennen ist, gehören die Polyphenole mit 25 bis 35 % zu den Hauptinhaltsstoffen von Grünem Tee. Eine wichtige Untergruppe stellen die Flavonoide dar, zu denen u. a. auch die Catechine und Flavonole zählen. Mit Gehalten von 17 bis 30 % bilden die Catechine den Hauptanteil innerhalb der Polyphenole. In Grünem Tee konnten folgende Gehalte an Catechinen ermittelt werden (% Trockenmasse): (±)-Catechin (C; 0,1-1,3 %), (-)-Epicatechin (EC; 0,9-3,2 %), (-)-Epigallocatechin (EGC; 0,9-3,1 %), (-)-Epigallocatechingallat (EGCG; 2,5-10,5 %) und (-)-Epicatechingallat (ECG; 1,2-3,8 %) [14]. Neben den in Abbildung 1 dargestellten Catechinen konnten in Grüntee-Extrakten noch (-)-Catechingallat, (-)-Gallocatechin und (-)-Gallocatechingallat nachgewiesen werden [20].

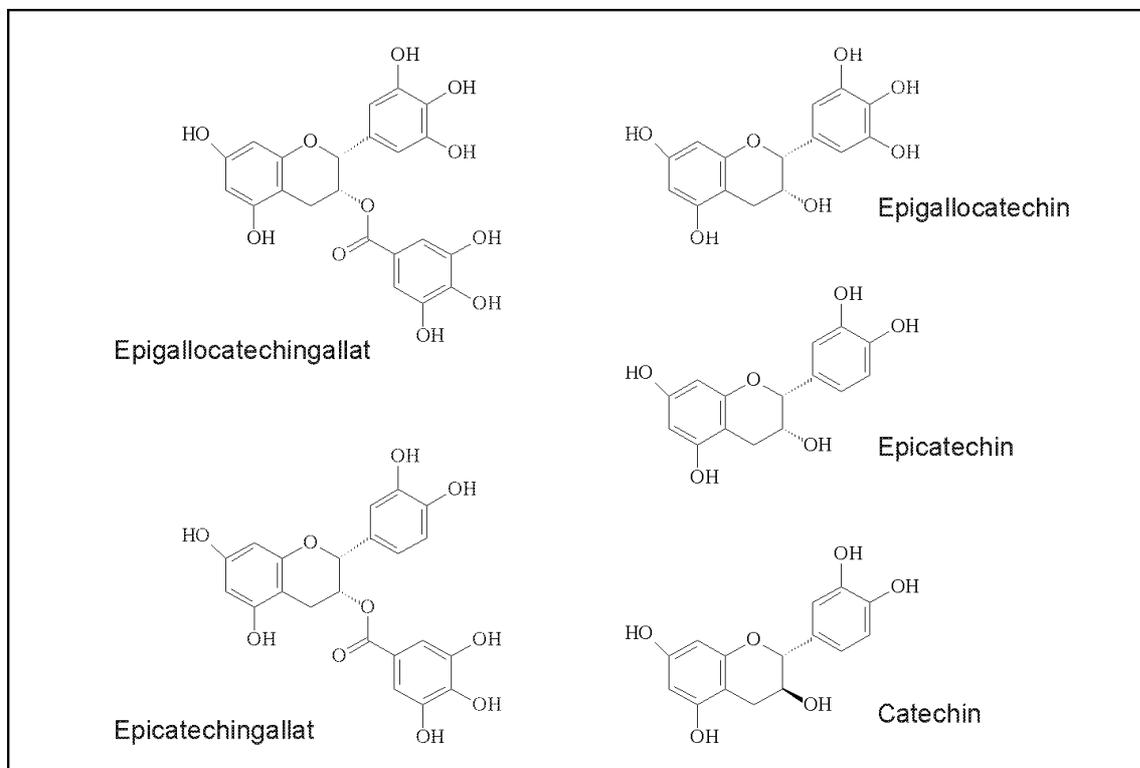


Abbildung 1 Strukturen von Catechinen aus *Camellia sinensis*

Der Catechingehalt ist entscheidend vom Entwicklungszustand der Blätter abhängig. In der Spitzenknospe ist der Gehalt mit ca. 26 % am höchsten und nimmt nach unten in der Blattfolge ab. Im unteren Teil der Sprossachse werden durchschnittlich nur noch 5 % Catechine gefunden. Dieser Rückgang des Catechingehaltes mit der Alterung wird durch Abbau von (-)-Epigallocatechingallat und (-)-Epicatechingallat verursacht [16].

Neben den Catechinen wurden in Grünem Tee die freien Flavonole Kämpferol, Quercetin und Myricetin gefunden und, in deutlich höherer Konzentration von insgesamt 1,5 bis 1,7 %, auch deren Glykoside [21, 22]. Dabei überwiegen vor allem die Di- und Triglykoside der Flavonole.

Kuhr und Engelhardt konnten anhand von Untersuchungen in Grünem Tee freie Gallussäure und Theogallin nachweisen [23]. Während weitere Untersuchungen der Phenolsäuren und Depside in Grünem Tee nicht vorliegen, konnten in frischen Teeblättern u. a. die Phenolsäuren Kaffeesäure, p-Cumarsäure, Ellagsäure und die Depside p-Cumaroylchinasäure und Chlorogensäure nachgewiesen werden [14].

Das Hauptpurinalkaloid im Tee ist das Coffein, wobei Schwarzer Tee, Grüner Tee und Oolong-Tee etwa die gleichen Gehalte aufweisen [23]. Der Coffein-Gehalt wird hauptsächlich vom Entwicklungszustand der verwendeten Blätter beeinflusst und zeigt in den Spitzenknospen den höchsten Gehalt auf (> 4 %). Als weitere Purinalkaloide lassen sich noch Theobromin und Theophyllin in geringen Konzentrationen nachweisen [16].

Grüner Tee enthält etwa 4 % Aminosäuren, insbesondere das für *C. sinensis* charakteristische Theanin, gefolgt von Asparaginsäure, Glutaminsäure, Arginin und Asparagin [18, 24].

Weiterhin enthält Grüner Tee im Durchschnitt 0,28 % (Trockengewicht) Ascorbinsäure. Im Gegensatz zum Grünen Tee enthält Schwarzer Tee und Oolong-Tee wesentlich weniger Ascorbinsäure, da diese während der Fermentation abgebaut wird [19].

Im Grünen Tee finden sich auch flüchtige Stoffe wie Linalool, δ -Cadinen, Geraniol, Benzylalkohol, Indol und Nerolidol, wobei Linalool ca. 20 % der flüchtigen Stoffe ausmacht. Diese und weitere nur in Spuren vorkommende Stoffe sind an der Aromabildung des Tees beteiligt [16].

3.1.3 Pharmakologische Wirkungen und Anwendungen

Bei der Verwendung in kosmetischen und pharmazeutischen Formulierungen stehen die antioxidativen Eigenschaften der Grüntee-Polyphenole im Vordergrund. Weiterhin zeigt der Grüne Tee antimikrobielle und antiirritative Wirkungen [4, 25, 26, 27].

Die antioxidativen Eigenschaften der Catechine wurden in einer Vielzahl von Studien untersucht und beruhen auf unterschiedlichen Reaktionsmechanismen [17, 28, 29]. Catechine vermindern durch Komplexbildung den Anteil an freien zweiwertigen Metallionen, welche für die Bildung freier Sauerstoffradikale erforderlich sind. Catechine wirken auch als starke Radikalfänger gegenüber Sauerstoff-, Peroxy- und Hydroxyradikalen, die zu einer DNS-Schädigung und zur Schädigung anderer zellulärer Moleküle führen und die Lipidperoxidation einleiten können [25]. Grüner Tee bzw. Catechine aus Grünem Tee zeigen eine konzentrationsabhängige antioxidative Wirkung, wobei die relativen Aktivitäten der einzelnen Catechine untereinander stark von den angewendeten Tests abhängen. Grundsätzlich ist das mengenmäßig in Grünem Tee hervortretende Epigallocatechingallat die aktivste Verbindung unter den Polyphenolen, vergleichbar mit den Aktivitäten der synthetischen Antioxidationsmittel Butylhydroxytoluol (BHT) und Butylhydroxyanisol (BHA) [29, 30, 31].

Anhand von klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass topisch applizierter Grüner Tee nicht nur vor UV-Strahlen-induzierter Hautschädigung schützt, sondern auch irreversible genetische Zellveränderungen bzw. die Bildung von Tumoren verzögert. Dieser hautschützende Effekt wird hauptsächlich auf die antioxidativen Eigenschaften der Catechine zurückgeführt [32, 33, 34, 35, 36].

In einer ex vivo Studie wurde der Einfluss von Antioxidantien in einer kosmetischen Formulierung auf den Oxidationszustand der Stratum corneum Lipide untersucht. Es wurden 9 Probanden über einen Zeitraum von 12 Wochen mit einer Standardformulierung, die neben anderen Antioxidantien auch 2 % Grüntee-Extrakt enthielt, behandelt. Die Antioxidantien in der Formulierung schützten die Stratum corneum Lipide sowohl vor endogener als auch durch UVB-Strahlen-induzierter Lipidperoxidation [37]. Die Bildung von Radikalen wird durch exogene Faktoren wie zu hohe

UV-Strahlung, Smog, Zigarettenrauch, aber auch durch bestimmte Nahrungsmittel und Arzneimittel begünstigt [25]. Da freie Radikale zur Hautschädigung führen können, bietet sich eine Behandlung entsprechend geschädigter Haut mit Formulierungen an, die Polyphenole aus Grünem Tee enthalten.

Die antiirritative Wirkung von Grünem Tee untersuchten Fischer et al. mit Hilfe eines SDS (*sodium dodecyl sulfate*)-Patch-Tests. Grüntee-Extrakt reduzierte dabei die SDS-induzierten Erytheme, wenn es nach der SDS-Behandlung oder mit dem SDS appliziert wurde. Eine präventive Applikation des Grünen Tees vor der SDS-Behandlung zeigte in dieser in vivo Studie aber keinen antiirritativen Effekt [38].

Weiterhin zeigen Grüntee-Extrakte eine desodorierende Wirkung gegenüber Methylmercaptan, Trimethylamin und Zigarettenrauch. Sowohl unter Laborbedingungen als auch mittels in vivo Studien konnten die geruchsbindenden Eigenschaften der Polyphenole nachgewiesen werden. So führte nach dem Essen von Knoblauch das Kauen von Bonbons mit 0,1 % Grüntee-Extrakt zu einer Verringerung des Mundgeruchs [39].

In Verbindung mit den antibakteriellen Eigenschaften von Grünem Tee gegenüber einer Vielzahl von Bakterien und Pilzen [26] steht auch eine Antikarieswirkung. Die Polyphenole hemmen die Glycosyltransferase von Streptokokken und wirken so der Entstehung von Plaque entgegen. Innerhalb der Catechine zeigten Epigallocatechingallat und Epicatechingallat die höchste Wirksamkeit bei der Hemmung der Glycosyltransferase [40]. In einer in vivo Studie mit 26 Probanden konnte gezeigt werden, dass Grüntee-Polyphenole die Plaquebildung inhibieren und zu einer Abnahme der Streptokokken im Mundraum führen, wenn der Mund nach dem Essen mit einer Grüntee-Lösung gespült wurde [41].

Berücksichtigt man die beschriebenen Eigenschaften von Grünem Tee, so ergeben sich vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in der Kosmetik. In Sonnenschutzpräparaten, aber auch in Hautpflegecremes kann Grüner Tee aufgrund seiner antioxidativen Effekte der Bildung von freien Radikalen entgegenwirken. Seine antibakteriellen Eigenschaften begründen den Einsatz in Deoprodukten und im Bereich der Fußpflege. Weiterhin können Grüntee-Extrakte aufgrund ihrer antikariogenen

und desodorierenden Wirkung Zahn- und Mundpflegeprodukten zugesetzt werden [25, 26].

3.1.4 Toxikologie

Die letale Dosis von Polyphenolen aus Grünem Tee beträgt ca. 3 g/kg für weibliche bzw. mehr als 5 g/kg für männliche Mäuse. In einer weiteren Studie wurde Ratten eine tägliche Dosis von 15 und 75 mg/kg Polyphenolen aus Grünem Tee über einen Zeitraum von 88 Tagen zugeführt. Die Polyphenole führten jedoch zu keinen toxischen Symptomen bei den untersuchten Tieren [42]. Bei oraler Aufnahme von Tee kann es durch das Coffein zu toxischen Nebenwirkungen kommen. Es können akut ab ca. 300 mg Coffein (5 Tassen Tee) Unruhe, Tremor und gesteigerte Reflexerregbarkeit auftreten [16]. Über die Toxizität von topisch applizierten Formulierungen mit Grünem Tee liegen keine Daten vor.

3.1.5 Auswahl von Leitsubstanzen

Catechine stellen mit 17 bis 30 % der Trockenmassen die Hauptinhaltsstoffe von Grünem Tee dar. Da auch die Wirksamkeit der Catechine durch eine Vielzahl von Studien belegt wurde, bieten sich Catechine als Leitsubstanzen für die Charakterisierung bzw. Standardisierung von Grüntee-Extrakten und Formulierungen daraus an. Um eine möglichst hohe Aussagekraft zu erreichen, sollten mehrere Catechine zur Charakterisierung der Extrakte analysiert werden.

3.2 *Calendula officinalis*

3.2.1 Botanik und Drogengewinnung

Die Gattung *Calendula* LINNÉ gehört zur Familie der Asteraceae (=Compositae). Medizinisch und kosmetisch verwendet werden nur zwei Arten, die annuelle *C. arvensis* und die perennierende oder annuelle *C. officinalis*. Die Ringelblume, wie *Calendula officinalis* L. auch volkstümlich genannt wird, ist hauptsächlich im Mittelmeerraum verbreitet [43, 44]. Als Kulturpflanze wird die Ringelblume aber auch auf dem Balkan, in Osteuropa, der Niederlande und zum kleinen Teil in Deutschland angebaut [16, 45].

Calendula officinalis wird 30 bis 50 cm hoch und zeigt wechselständige Blätter, die 10 bis 15 cm lang und 3 bis 4 cm breit sind. Jeder Stängel oder Seitenzweig trägt an seiner Spitze ein Blütenköpfchen mit einem Durchmesser von 2 bis 5 cm, so dass die Pflanze bis zu 50 Infloreszenzen entwickeln kann. Die Blütezeit der Ringelblume reicht von Mai bis zum Herbst, wobei die Farbe der Blüten von hellgelb bis dunkelorange reicht. Infloreszenzen mit mehreren Kreisen von Zungenblüten werden als „gefüllt“ bezeichnet. Diese gefüllt blühenden Formen werden vorwiegend zur Drogengewinnung angebaut [43].

Die Blütenernte beginnt im Mai und dauert bis in den August, wobei alle 6 bis 8 Tage geerntet wird. Während früher manuell gepflückt wurde, werden heute überwiegend maschinelle Verfahren verwendet. Nach dem Trocknen der Blüten werden die Kelche abgerebelt, um die reinen Zungenblüten zu gewinnen. Ihr Anteil beträgt 50 bis 75 % vom Gesamtgewicht, das entspricht einem Ertrag von 900 bis 1500 kg/ha. Zur Krautgewinnung wird der Bestand bei Vollblüte geschnitten. Die Erträge an getrocknetem Kraut schwanken zwischen 2500 und 4000 kg/ha [43].

Unter der Bezeichnung *Calendulae flos cum calice* gelangen die ganzen oder teilweise zerfallenen Blütenköpfe mit zahlreichen Zungenblüten und wenigen Röhrenblüten in den Handel. Eine weitere Handelsform stellen die vom Blütenboden abgetrennten, völlig entfalteten Zungenblüten dar, die auch als *Calendulae flos sine*

calice bezeichnet werden. Der Bedarf an Ringelblumenkraut, *Herba Calendulae cum floribus*, ist vergleichsweise unbedeutend [44].

3.2.2 Inhaltsstoffe

Die Hauptinhaltsstoffe der oberirdischen Pflanzenteile von *Calendula officinalis* sind Triterpenalkohole, Triterpenglykoside, Sterole, Carotinoide, Flavonoide und Polysaccharide. Als Minorbestandteile sind noch Cumarine, Phenole, etherische Öle und Allantoin zu nennen [16, 43, 44].

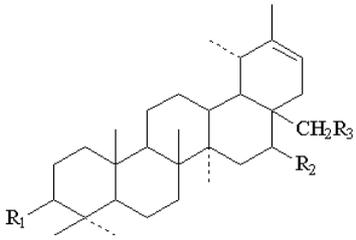
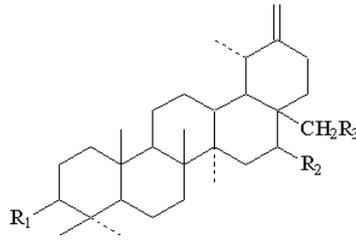
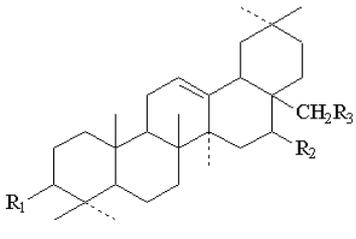
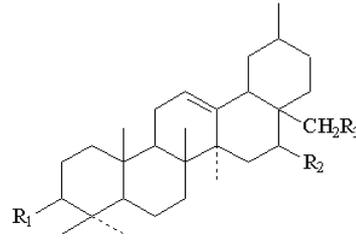
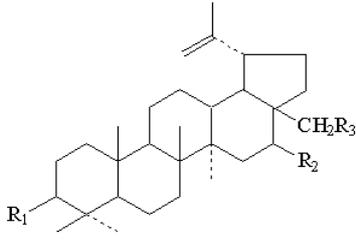
<p>Triterpenalkohole mit ψ-Taraxenstruktur</p>  <p> $R_1 = R_2 = R_3 = H$: ψ-Taraxen $R_1 = OH$; $R_2 = R_3 = H$: ψ-Taraxasterol $R_1 = R_2 = OH$; $R_3 = H$: Faradiol $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Heliantriol B₀ </p>	<p>Triterpenalkohole mit Taraxenstruktur</p>  <p> $R_1 = R_2 = R_3 = H$: Taraxen $R_1 = OH$; $R_2 = R_3 = H$: Taraxasterol $R_1 = R_2 = OH$; $R_3 = H$: Arnidiol $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Heliantriol B₁ </p>
<p>Triterpenalkohole mit Oleanenstruktur</p>  <p> $R_1 = R_2 = R_3 = H$: Oleanen $R_1 = OH$; $R_2 = R_3 = H$: β-Amyrin $R_1 = R_2 = OH$; $R_3 = H$: Maniladiol $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Longispinogenin </p>	<p>Triterpenalkohole mit Ursenstruktur</p>  <p> $R_1 = R_2 = R_3 = H$: Ursen $R_1 = OH$; $R_2 = R_3 = H$: α-Amyrin $R_1 = R_2 = OH$; $R_3 = H$: Brein $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Ursatriol </p>
<p>Triterpenalkohole mit Lupenstruktur</p>  <p> $R_1 = R_2 = R_3 = H$: Lupen $R_1 = OH$; $R_2 = R_3 = H$: Lupeol $R_1 = R_2 = OH$; $R_3 = H$: Calenduladiol $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Heliantriol B₂ </p>	

Abbildung 2 Struktur der Triterpenalkohole aus *Calendula officinalis* [43]

Calendula officinalis-Blüten sind reich an pentacyclischen Triterpenalkoholen in Form von Monohydroxy-, Dihydroxy- und Trihydroxiterpenen. Die Triterpenalkohole leiten sich vom ψ -Taraxen, Taraxen, Lupen, Oleanen und Ursen ab (Abbildung 2). Die Triterpenalkohole kommen in der Pflanze frei oder verestert vor [46]. Die Syntheserate der Triterpene ist am höchsten in Keimlingen, jungen Blättern und Blütenknospen. Die Monolester sind Biosynthesevorstufen der Diolmonoester während die freien Monole zu Diolen und Triolen hydroxyliert werden [47].

Der Monolgehalt der getrockneten Blüten beträgt etwa 0,6 %, davon sind durchschnittlich 14 % α -Amyrin, 26 % β -Amyrin, 6 % Lupeol, 2,8 % Taraxasterol und 51 % ψ -Taraxasterol. Etwa 10 % der Monole liegen in veresteter Form als Acetate vor [43, 48, 49].

In den oberirdischen Pflanzenteilen von *C. officinalis* sind 98 % der Diole verestert, hauptsächlich mit Laurin-, Myristin- und Palmitinsäure. 98 % der Diole liegen als Monoester vor, nur 2 % als Diester [50]. Der Gehalt an Triterpendiol-3-monoestern beträgt 2 bis 4 %, davon sind etwa 85 % Ester des Faradiols, 6 % Ester des Calenduladiols und 5 % Ester des Breins. Weiterhin sind noch geringe Gehalte an Estern des Maniladiols und des Arnidiols enthalten [43, 48, 46, 49, 51, 52].

Die Blüten enthalten ferner ca. 0,2 % Triterpentriole, hauptsächlich in freier Form, neben einem geringen Anteil als Monoester. Die Triterpentriole setzen sich u. a. zusammen aus Longispinogenin, Heliantriol B₀, Ursatriol, Heliantriol B₁ und Heliantriol B₂ [43].

Weiterhin enthalten die getrockneten Blüten von *C. officinalis* 2 bis 10 % Oleanolsäureglykoside, die auch Saponoside genannt werden. Das 3-OH der Oleanolsäure ist glykosidisch mit D-Glucuronsäure verbunden, die ihrerseits an β -D-Glucose und/oder an β -Galactose gebunden ist [44].

Die Farbe der Blüten ist auf einen hohen Gehalt an Carotinoiden zurückzuführen. Je nach der Farbe der Blüten lassen sich zwei Gruppen unterscheiden: die orangefarbenen Varietäten zeichnen sich durch ihren Gehalt an Carotinen aus, während in den gelb blühenden Varietäten vorwiegend Xanthophylle enthalten sind.

Die intensiv orange gefärbten Zungenblüten haben den höchsten Carotinoidgehalt, der bis zu 1,5 % betragen kann [53].

Der Flavonoidgehalt der Blütendroge liegt zwischen 0,3 und 0,8 % [54]. In den *C. officinalis*-Blüten konnten Flavonolglykoside mit Isorhamnetin oder Quercetin als Aglykon nachgewiesen werden, wobei die Gehalte klimabedingten Schwankungen unterliegen können [55].

Die in Blüten von *C. officinalis* enthaltenen Polysaccharide (ca. 30 % der getrockneten Blüte) setzen sich u. a. zusammen aus Pektinen, Hemizellulosen und wasserlöslichen Polysacchariden. Bei den wasserlöslichen Polysacchariden handelt es sich um verzweigt-kettige saure Heteroglykane, deren Struktur Rhamnoarabino- bzw. Arabinogalactanen entspricht [56, 57, 58].

3.2.3 Pharmakologische Wirkungen und Anwendungen

Aufgrund ihrer entzündungshemmenden, wundheilenden und antiirritativen Wirkung werden Formulierungen mit *Calendula officinalis* sowohl in der Kosmetik als auch in der Dermatologie verwendet [43, 44]. Neuere experimentelle und klinische Studien zeigen, dass vor allem eine Anzahl von lipophilen Verbindungen für die topisch-antiinflammatorische Wirkung verantwortlich sind, während Saponine [59] und Polysaccharide [57] von *C. officinalis* nur eine geringe antiinflammatorische Wirkung aufweisen [60, 61].

Della Loggia et al. untersuchten den Einfluss des Extraktionsmittels auf die entzündungshemmende Wirkung von lipophilen *Calendula*-Extrakten mit Hilfe des Crotonöltests am Mäuseohr [62]. Sowohl der alkoholische als auch der CO₂-Extrakt (Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid) zeigte eine dosisabhängige Wirkung, wobei der CO₂-Extrakt eine wesentlich höhere Ödemhemmung bewirkte als der alkoholische Extrakt. Noch mit einer Dosierung von 75 µg CO₂-Extrakt/Ohr wird eine statistisch signifikante Ödemhemmung erzielt [60].

Inhaltsstoffe der CO₂-Extrakte sind u. a. die freien Monole β -Amyrin, Lupeol, α -Amyrin, ψ -Taraxasterol und Taraxasterol sowie die Monoester der Diole Faradiol, Arnidiol und Calenduladiol [61].

Die entzündungshemmende Wirkung des CO₂-Extraktes ist hauptsächlich auf die Anwesenheit der Triterpendiole zurückzuführen. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, zeigen Faradiol-3-myristat und Faradiol-3-palmitat fast die gleiche Aktivität bei der Inhibition der induzierten Ödeme am Mäuseohr (Crotonöltest). Bei der Applikation eines Gemisches beider Ester sind keine synergistischen Effekte nachzuweisen. Bezogen auf die applizierte Dosis ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) besitzt das freie Monol ψ -Taraxasterol eine geringere Aktivität als die beiden Faradiolester, während freies Faradiol unter den untersuchten Substanzen die aktivste Verbindung ist, vergleichbar mit der des Indometacins [63].

Tabelle 2 Antiinflammatorische Aktivität von isolierten Inhaltsstoffen aus *Calendula officinalis* [63]

Substanz	appl. Dosis [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	appl. Dosis [$\mu\text{mol}/\text{cm}^2$]	Anzahl der Tiere	Ödem* [mg]	Inhibition [%]
Kontrolle (unbehandelt)	–	–	–	7,4 \pm 0,3	–
Faradiol-3-monoester-Gemisch	240	0,36	14	3,3 \pm 0,4**	55
	480	0,72	14	2,4 \pm 0,3**	68
Faradiol-3-myristat	240	0,37	14	4,0 \pm 0,4**	46
	480	0,74	14	2,6 \pm 0,3**	65
Faradiol-3-palmitat	240	0,35	14	4,1 \pm 0,4**	45
	480	0,70	14	2,5 \pm 0,4**	66
ψ -Taraxasterol	240	0,56	14	3,8 \pm 0,2**	49
	480	1,12	14	1,0 \pm 0,2**	86
Faradiol	120	0,27	14	2,0 \pm 0,2**	73
Indomethacin***	100	0,28	14	3,2 \pm 0,4**	75

* Mittleres Gewicht der Ödeme \pm Standardabweichung (Crotonöltest am Mäuseohr)

** Signifikanter Unterschied zur Kontrolle (t-test, $p < 0,05$)

*** Positive Kontrolle

Die hier gewonnenen Erkenntnisse stehen im Einklang mit Della Loggia et al., wonach die OH-Gruppe am C₁₆ des ψ -Taraxasterols die Aktivität erhöht und die Veresterung an Position 3 verringert. Die geringere Aktivität der Ester kann auf

kinetische Ursachen zurückgeführt werden, da die Ester aufgrund ihrer lipophileren Eigenschaften schlechter penetrieren und so nur geringe Mengen tiefere Hautschichten erreichen. Ein weiterer Hinweis dafür ist auch der nur relativ geringe Anstieg der Aktivität bei Verdopplung der applizierten Dosis [61].

Im Vordergrund der therapeutischen Verwendung von *Calendula officinalis* steht die äußerliche Anwendung bei schlecht heilenden Wunden, Hauterkrankungen, venösen Stauungen, Krampfadern und beim Dekubitus (Wundliegen). Ringelblumen-Salbe beschleunigt die Heilung von Wunden, fördert die Granulation des Gewebes und hemmt Entzündungsvorgänge. Auch regt *C. officinalis* die Durchblutung der Haut an, macht sie geschmeidiger und daher widerstandsfähiger gegen Irritationen [64].

In der Kosmetik werden Ringelblumenpräparate hauptsächlich zur topischen Applikation in Form von Cremes zur Hautpflege verwendet. Über den Einsatz in Hautpflegecremes hinaus ist *Calendula*-Extrakt auch in tonisierenden Gesichtswässern, Sonnenschutzpräparaten, After Shave Präparaten, Lippenstiften, Badepräparaten, Haarshampoos und Seifen zu finden. Weiterhin werden *Calendula*-Extrakte zu Zahnpasten zugesetzt, um den therapeutischen und prophylaktischen Effekt der Ringelblume auf das Zahnfleisch zu nutzen [43, 44].

3.2.4 Toxikologie

Extrakte aus *Calendula officinalis* können bis zu einem Zusatz von 10 % ohne gesundheitliches Risiko als Bestandteile für kosmetische Produkte wie Bäder, Hautschutzpräparate, Produkte für aufgesprungene und entzündete Haut sowie als Babypflegemittel verwendet werden [65]. *Calendula*-Extrakte besitzen eine geringe akute Toxizität, die sich in einer $LD_{50} > 4640$ mg/kg (letale Dosis, bei der 50 % der Versuchstiere eingehen) bei Ratten widerspiegelt [66]. Bedingt durch das Fehlen von Sesquiterpenlactonen ist auch das Risiko von allergischen Reaktionen gering [44].

3.2.5 Auswahl von Leitsubstanzen

Faradiol-3-myristat und Faradiol-3-palmitat sind mit einem Gehalt von ca. 19 % die Hauptbestandteile von lipophilen Extrakten [61] und neben dem Faradiol und dem ψ -Taraxasterol für die antiinflammatorische Wirkung verantwortlich. Freies Faradiol als aktivste Verbindung wurde in CO₂-Extrakten nicht nachgewiesen und ist nur nach Hydrolyse verfügbar. Die antiinflammatorische Wirkung von *Calendula officinalis* CO₂-Extrakten ist direkt proportional zu ihren Faradiol-3-monoester Gehalten. Daher kann eine Standardisierung von CO₂-Extrakten und entsprechenden Formulierungen mittels Faradiol-3-monoestern als Leitsubstanzen erfolgen [61, 63].

3.3 Glycyrrhiza glabra

3.3.1 Botanik und Drogengewinnung

Die Gattung *Glycyrrhiza* LINNÉ gehört zur Familie der Fabacea (=Leguminosae) und besteht aus etwa 20 bis 30 Arten. Zu den drogenliefernden Arten zählen *Glycyrrhiza glabra*, *G. inflata* und *G. uralensis*. Die Anbaugebiete von *Glycyrrhiza glabra*, auch Süßholz genannt, sind warmgemäßigte bis subtropische Länder des Mittelmeerraumes, ehem. GUS, West- und Mittelasien, Australien und Amerika [67].

Glycyrrhiza glabra ist eine ausdauernde, 1 bis 1,5 m hohe Staude mit einer Lebensdauer von ca. 15 Jahren, welche zunächst eine lange, kräftige Pfahlwurzel und später Nebenwurzeln und ein stark verholzendes Rhizom entwickelt. Die unterirdischen Pflanzenteile sind ca. 2 cm dick und bei älteren Pflanzen von Kork umgeben. Die Stängel und Blätter werden jährlich neu getrieben. Die Blüten sind 1 bis 1,5 cm lang, bläulich bis hellviolett gefärbt und kurz gestielt [67, 68].

Zur Drogengewinnung werden Wurzeln und Wurzeläusläufer sowie die Rhizome verwendet, wobei die Hauptwurzel in der Regel stehen bleibt. Die Ernte erfolgt vom Spätherbst bis zum Frühjahr, bevor der neue Austrieb beginnt. Geerntet wird regelmäßig in dreijährigem Turnus [69]. Als Ganzdroge gelangen geschälte oder ungeschälte Wurzel- und Wurzeläusläuferstücke in den Handel, die in der Regel 1 bis 2 cm dick und bis 30 cm lang sind. Als weitere Handelsformen sind noch die Schnitt- und Pulverdroge von Bedeutung [67].

3.3.2 Inhaltsstoffe

Die Wurzel von *Glycyrrhiza glabra* enthält als Hauptinhaltsstoffe neben Terpenverbindungen ca. 5 % Saccharose, ca. 2,5 % Glucose und 20 bis 30 % Stärke. Als Minorbestandteile sind noch Flavonoide und Cumarine sowie etherische Öle zu nennen [70].

Die bisher aus den Wurzeln von *G. glabra* isolierten Terpene gehören hauptsächlich zur Gruppe der pentacyclischen Triterpene mit einem Oleangerüst. Zu den Hauptvertretern dieser Verbindungsgruppe in den Süßholzwurzeln gehört das Saponin

Glycyrrhizinsäure (Glycyrrhetinsäure-3-O-diglucuronid), das in der Droge als Kalium-, Ammonium und Calciumsalz vorkommt. Das Gemisch dieser Salze der Glycyrrhizinsäure wird auch als Glycyrrhizin bezeichnet. Je nach Herkunft und verwendetem Pflanzenteil enthält die Droge 2 bis 15 % Glycyrrhizinsäure. Durch saure oder enzymatische Hydrolyse der Glycyrrhizinsäure erhält man ihr Aglykon, die 18 β -Glycyrrhetinsäure, die in Spuren auch in der Droge nachzuweisen ist. Neben Glycyrrhizinsäure und 18 β -Glycyrrhetinsäure (Abbildung 3) konnten noch weitere Triterpenverbindungen in Wurzelextrakten nachgewiesen werden: u. a. Desoxyglabrolid, Glabrolid, 18 α -Glycyrrhetinsäure, Glycyrrhetinsäuremethylester und Glycyrrhetol [67, 71].

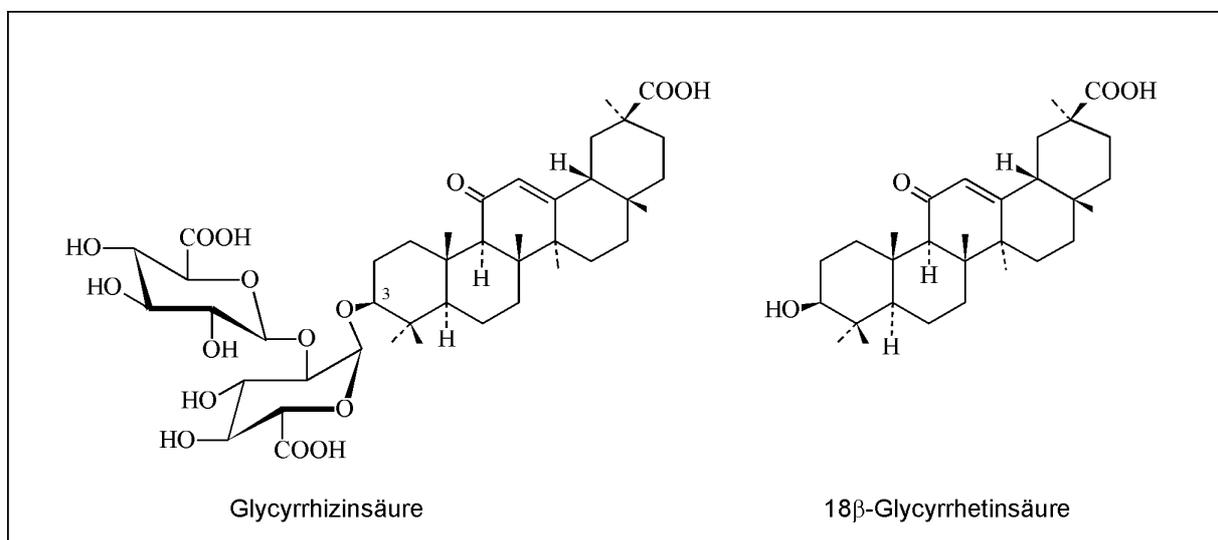


Abbildung 3 Inhaltsstoffe aus den Wurzeln von *Glycyrrhiza glabra* L.

Zu den bisher isolierten Cumarinderivaten zählen Herniarin und Umbelliferon. Reiners isolierte aus Süßholzwurzeln eine Cumarinderivate-enthaltene Fraktion, die er mit Hilfe der Papierchromatographie untersuchte. Neben den oben genannten Cumarinen konnten in der Fraktion zwei Phenolsäuren, die Ferula- und die Synapinsäure, nachgewiesen werden [72].

3.3.3 Pharmakologische Wirkungen und Anwendungen

Den Inhaltsstoffen der Süßholzwurzel, besonders den Triterpenverbindungen, werden zahlreiche Wirkungen zugeschrieben. Vor allem wegen ihrer entzündungshemmenden Wirkung finden Süßholzwurzel-Extrakte sowohl therapeutische als auch kosmetische Verwendung. Bei der topischen Anwendung von Süßholzwurzel-Extrakten bzw. deren Formulierungen spielt die Glycyrrhizinsäure sowie auch ihr Aglykon, die 18 β -Glycyrrhetinsäure, eine wichtige Rolle [73, 74].

Die entzündungshemmenden Wirkungen der Glycyrrhizinsäure und 18 β -Glycyrrhetinsäure beruhen auf einer Inhibierung verschiedener Mediatorsysteme der entzündlichen Reaktionen. In vitro Studien zeigen eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Histaminfreisetzung in Mastzellen von Ratten durch Glycyrrhizin. Bei einem Zusatz von 500 μ g/ml Glycyrrhizin betrug die Inhibierung der Histaminfreisetzung ca. 70 %. In weiteren Studien an Rattenzellen wurde eine signifikante Inhibierung der Leukotrienproduktion (LTB₄) und eine signifikante Reduzierung der Prostaglandin (PGE₂)-Produktion durch Zugabe von sowohl Glycyrrhizin als auch 18 β -Glycyrrhetinsäure beobachtet. Eine wesentliche Rolle für die entzündungshemmende Wirkung der Glycyrrhizin- und 18 β -Glycyrrhetinsäure spielt die Beeinflussung des Steroidstoffwechsels. Beide Verbindungen, vor allem aber die 18 β -Glycyrrhetinsäure, hemmen bereits in relativ geringen Konzentrationen die Δ -5 β -Steroidreduktase. Durch die Hemmung dieses Enzyms wird die metabolische Ausscheidung von Corticosteroiden verzögert und die biologische Halbwertszeit von Cortison und Aldosteron verlängert. So ist bekannt, dass Zubereitungen aus der Süßholzwurzel zur Unterstützung der Langzeitbehandlung mit Cortison verwendet werden, um so die Nebenwirkungen des Cortisons zu verringern [73, 74, 75].

In einer klinischen Studie wurde die Wirksamkeit von 18 β -Glycyrrhetinsäure bei verschiedenen Hautkrankheiten untersucht. Durch Applikation von Salbenpräparaten mit 18 β -Glycyrrhetinsäure (2 %) als Wirkstoff wurden deutliche Verbesserungen der Hautzustände im Vergleich zu einer Placebo-Formulierung beobachtet [76].

Neben der entzündungshemmenden Wirkung zeigen Süßholz-Extrakte noch geringe antioxidative und antimikrobielle Eigenschaften. Die antioxidativen Eigenschaften der Süßholz-Extrakte sind u. a. auf die Wirkstoffe Glabren und Licochalcon A und B zurückzuführen. Glabren aus Russischem Süßholz zeigt z. B. eine dreifach höhere antioxidative Wirkung als Vitamin E [67].

Zahlreiche Inhaltsstoffe der Süßholzwurzel, insbesondere phenolische Verbindungen, besitzen schwache antimikrobielle Wirksamkeit. Als Aktivstoffe wurden u. a. Glabren und Glabridin identifiziert [67].

Im Vordergrund der therapeutischen Verwendung von *Glycyrrhiza glabra* steht die äußere Anwendung bei schweren Hautentzündungen, Hautausschlägen und allergischen Hautreaktionen. Süßholzwurzel-Extrakt zeigt dabei einen entzündungshemmenden Effekt, fördert die Wundheilung und wirkt gegen Hautjucken [73].

In der Kosmetik werden Süßholzwurzel-Präparate hauptsächlich zur Vermeidung von Hautentzündungen und zur Vorbeugung von Hautirritationen verwendet. Über den Einsatz in Hautpflegemitteln hinaus werden Süßholzwurzel-Extrakte in After Sun und After Shave Präparaten eingesetzt. Weiterhin ist ein Zusatz von Glycyrrhizin oder dem Pflanzenextrakt in Zahnpasten als Antiphlogisticum und gleichzeitiger Süßstoff denkbar [73].

3.3.4 Toxikologie

Isolierte Glycyrrhizinsäure und deren Salze besitzen eine geringe akute Toxizität, die sich in einer LD_{50} oral von 8,1 g/kg bzw. LD_{50} intraperitoneal von 1,4 g/kg bei Mäusen widerspiegelt. Isolierte 18 β -Glycyrrhetinsäure zeigt interperitoneale LD_{50} Werte von 0,38 g/kg [73, 74].

Die Hautverträglichkeit von Glycyrrhizinsäure wurde in einer Studie mit Hilfe eines Patch-Tests an Humanhaut ermittelt. Hierbei wurde eine 5 % ige wässrige Lösung von Glycyrrhizinsäure 21 weiblichen Probanden auf der Innenseite des Ellenbogens aufgetragen und mit einem Pflaster abgedeckt. Nach 48 Stunden waren

auf der Haut keine Entzündungsreaktionen sichtbar. Auch nach einer Bestrahlung der Testareale wurden bei keiner Testperson entzündliche Veränderungen an den Hautarealen festgestellt [73].

Klinische Studien zeigen, dass Formulierungen mit 18 β -Glycyrrhetinsäure als Wirkstoff zu keinen negativen Hautveränderungen führen. Bei einer Langzeitbehandlung von Dermatosen mit einer 2 % igen 18 β -Glycyrrhetinsäure-haltigen Salbe konnten keine Nebenwirkungen und auch keine Sensibilisierung der Haut festgestellt werden [77].

3.3.5 Auswahl von Leitsubstanzen

Glycyrrhizinsäure ist mit Gehalten von 2 bis 15 % ein Hauptinhaltsstoff der Droge. Durch Hydrolyse der Glycyrrhizinsäure bildet sich 18 β -Glycyrrhetinsäure, die in Spuren in dem Pflanzenextrakt nachzuweisen ist. Da diese, für die Süßholzwurzel charakteristischen, Triterpenverbindungen für medizinisch-therapeutische sowie kosmetische Wirkungen verantwortlich sind, eignen sich diese Verbindungen als Leitsubstanzen zur Charakterisierung von Süßholzwurzel-Extrakten sowie Formulierungen unter Zusatz dieser Extrakte.

3.4 Terminalia sericea

3.4.1 Botanik und Drogengewinnung

Die Gattung Terminalia LINNÉ gehört zur Familie der Combretaceae und umfasst etwa 150 Arten [78]. Neben Terminalia sericea BURCH werden auch andere Terminalia-Arten zur Drogengewinnung verwendet. Die Verbreitungsgebiete von T. sericea, auch Gelbholz genannt, liegen vor allem in Südafrika, Namibia, Swaziland, Angola und Tansania [79].

Terminalia sericea wächst als Strauch oder Baum mit einer Höhe von 6 bis 9 m, die jedoch auch bis zu 23 m erreichen kann. Der Stamm hat einen Durchmesser von ca. 0,5 m und die Rinde ist stahlfarben mit tiefgehenden Längsrissen. Die Blätter sind grau-grün bis silbrig, leicht behaart, 5 bis 15 cm lang und 1,3 bis 2,5 cm breit. T. sericea hat kleine gelbe Blüten, die in Rispen am Ende der Zweige angeordnet sind. Nach der Blütezeit im späten Frühjahr entwickeln sich ovale oder rundlich abgeflachte 3 cm große Früchte, die von einem dünnen Flügel umgeben sind [79]. Zur Drogengewinnung werden neben Rinde und Wurzeln auch die Blätter verwendet [80].

3.4.2 Inhaltsstoffe

Charakteristische Stoffgruppen für Terminalia sericea, wie auch für Combretaceen allgemein, sind Polyphenole, Triterpene und Triterpensaponine sowie Schleime [81].

Bombardelli et al. untersuchten in einer Studie Triterpenoide aus den Wurzeln von Terminalia sericea. Sie konnten als Hauptverbindungen Sericinsäure (2,3,19,24-Tetrahydroxy-12-oleanen-28-säure; 0,05 %) und Sericosid (D-Glucopyranosylester der 2,3,19,24-Tetrahydroxy-12-oleanen-28-säure; 0,14 %) nachweisen [82]. Es handelt sich hierbei um eine pentacyclische Triterpensäure mit Oleanenstruktur sowie den entsprechenden Glucopyranosylester (Abbildung 4).

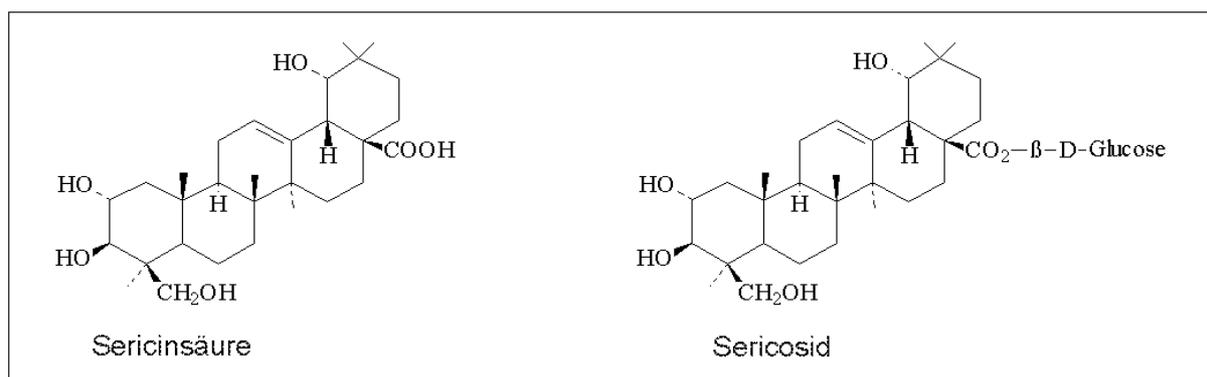


Abbildung 4 Struktur der Triterpenoide aus *Terminalia sericea* [82]

3.4.3 Pharmakologische Wirkungen und Anwendungen

Aufgrund ihrer entzündungshemmenden und wundheilenden Wirkung werden Extrakte aus *Terminalia sericea* schon seit langem in der afrikanischen Volksmedizin zur Heilung von Hautkrankheiten und Wunden verwendet [83, 84], während sich der Einsatz in der Kosmetik erst in den Anfängen befindet. Eine Arbeitsgruppe um Bombardelli und Pifferi konnte mit Hilfe von klinischen Studien zeigen, dass pentacyclische Triterpene und deren Derivate als Aktivstoffe von alkoholischen Extrakten aus Rinde und Wurzeln von *T. sericea* von Bedeutung sind. Durch Isolierungsversuche konnten sie nachweisen, dass vor allem Sericosid für die entzündungshemmende und wundheilende Wirkung von *T. sericea*-Extrakten verantwortlich ist [82, 85, 86].

In einem Carrageenin-induziertem Ödem-Test an der Rattenpfote zeigt eine 1 % ige Sericosidlösung nach topischer Applikation eine Ödemhemmung von 35 % gegenüber der Kontrollgruppe. Eine 5 % ige Sericosidlösung führt sogar zu einer 40 % igen Ödemhemmung [85].

Auch bei der Behandlung von UV-Strahlen-induzierten Hautrötungen und –verbrennungen bei Meerschweinchen zeigt eine 3 % ige Sericosidlösung eine positive Wirkung. Die mit Sericosidlösung behandelten Tiere weisen eine geringere Hautrötung als die Kontrollgruppe auf, wobei die Wirkung vergleichbar mit der einer 3 % igen Phenylbutazonlösung ist [85].

Bombardelli et al. untersuchten die wundheilende Wirkung von Sericosid an Ratten, indem sie Wunden mit einer 5 % igen Sericosidlösung behandelten. Nach einer Behandlungsdauer von zwei bzw. drei Tagen führt die Sericosidbehandlung zu einer signifikant verbesserten Wundheilung im Vergleich zu einer Kontrollgruppe [85].

Aufgrund der genannten Wirkungen bietet sich ein Einsatz von Terminalia sericea-Extrakten bzw. isoliertem Sericosid in kosmetischen Formulierungen an. Mögliche Einsatzgebiete sind u. a. Produkte zur Hautpflege, After Shave und After Sun Produkte sowie Produkte zur Babypflege.

3.4.4 Toxikologie

Isoliertes Sericosid besitzt eine geringe akute Toxizität, die sich in einer $LD_{50} > 2000$ mg/kg bei Ratten widerspiegelt. Damit besitzt Sericosid eine geringere akute Toxizität als ein alkoholischer Extrakt von Terminalia sericea ($LD_{50}=200$ mg/kg). In weiteren Studien an Kaninchen führte Sericosid bei topischer Applikation zu keinen Hautirritationen. Auch ein Hautverträglichkeitstest an Meer-schweinchen nach Hopf führte zu keiner Sensibilisierung [85, 87].

Eine Emulsion mit 0,5 % Sericosid wurde den gleichen toxikologischen Tests unterworfen, die jedoch alle negativ verliefen. In einer Studie an 16 Probanden über 4 bis 18 Tage führte die Emulsion weder zu Hautirritationen noch zu einer Sensibilisierung [85].

3.4.5 Auswahl von Leitsubstanzen

Sericosid zählt zu den wenigen bisher identifizierten Verbindungen aus Terminalia sericea und ist mit Gehalten von ca. 0,14 % in den Wurzeln ein charakteristischer Inhaltsstoff von T. sericea. Da Sericosid auch für die therapeutische sowie kosmetische Wirkung verantwortlich ist, eignet sich diese Verbindung als Leitsubstanz zur Charakterisierung von Terminalia sericea-Extrakten sowie Formulierungen unter Zusatz des Extraktes.

3.5 Echinacea purpurea

3.5.1 Botanik und Drogengewinnung

Die Gattung Echinacea MOENCH gehört zu der Familie Asteraceae (=Compositae). Nach McGregor umfasst die Gattung Echinacea neun Arten mit zwei Varietäten [88], wovon jedoch nur Echinacea angustifolia, E. purpurea und E. pallida medizinische und kosmetische Verwendung finden [89, 90, 91, 92]. Der Sonnenhut, wie Echinacea auch volkstümlich genannt wird, hat seinen Ursprung in Nordamerika. In Europa wird der Sonnenhut als Kulturpflanze u. a. in der Schweiz, Holland, Italien, Ex-Jugoslawien, Spanien und Deutschland angebaut, wobei allein Bayern eine Anbaufläche von ca. 140 ha aufweist [90, 93].

Echinacea purpurea (L.) MOENCH ist eine ausdauernde, 60 bis 180 cm hohe Pflanze mit einem aufrechten Stängel und eiförmig zugespitzten Grundblättern. Die purpurfarbenen Blütenköpfchen werden 1,5 bis 3 cm lang und 5 bis 10 mm breit. Es werden sowohl die oberirdischen Pflanzenteile als auch die Wurzeln zur Drogengewinnung verwendet [90, 93].

Die Kulturdauer für die Krautnutzung beträgt 3 bis 4 Jahre. Die Ernte des blühenden Krautes erfolgt bereits ab dem ersten Standjahr und beginnt im ersten Jahr im Oktober und ab dem zweiten Jahr im August. In Abhängigkeit von Standort, Saatgut, Anbauverfahren und Klima unterliegen die Erträge starken Schwankungen. Sie bewegen sich für E. purpurea zwischen 100 und 560 dt/ha frischem Kraut (24 bis 132 dt/ha Droge) [90].

3.5.2 Inhaltsstoffe

Zu den bisher nachgewiesenen Verbindungen aus den oberirdischen Pflanzenteilen von Echinacea purpurea zählen u. a. Kaffeesäurederivate, Flavonoide, Polyacetylene, Alkylamide, Alkaloide und Polysaccharide sowie Ascorbinsäure [94].

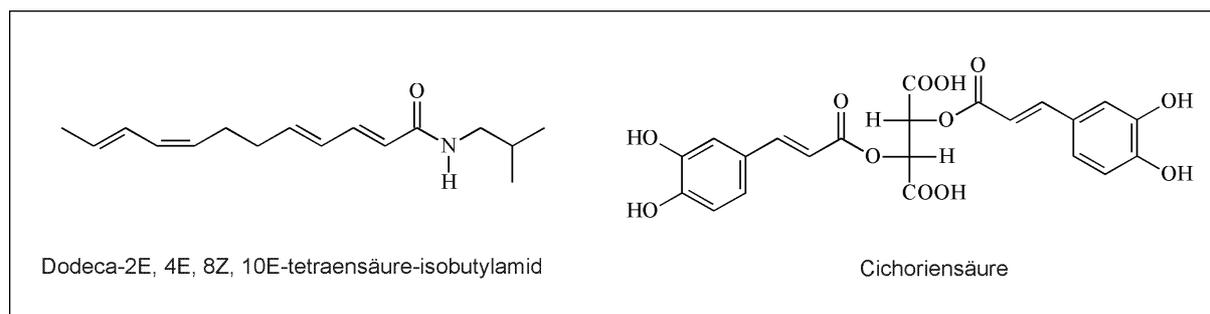


Abbildung 5 Hauptinhaltsstoffe im Kraut von *Echinacea purpurea* [90]

Die oberirdischen Teile von *E. purpurea* enthalten eine Vielzahl von Kaffeesäurederivaten. Hierzu zählen u. a. Cichoriensäure (2,3-O-Di-caffeoyl-weinsäure), Cichoriensäuremethylester, 2-O-Caffeoyl-3-O-feruloyl-weinsäure, 2,3-O-Diferuloyl-weinsäure [95] sowie Caftar Säure (2-O-Caffeoyl-weinsäure) [89]. Unter den Kaffeesäurederivaten weist die Cichoriensäure (Abbildung 5) die größten Gehalte auf, wobei Gehalte von mehr als 2 % möglich sind. Wie man in Tabelle 3 erkennt, ist der Gehalt an Cichoriensäure in *Echinacea purpurea* am höchsten und nimmt in der Reihenfolge *E. purpurea* > *E. pallida* >> *E. angustifolia* ab. Bauer et al. beobachteten bei den Pflanzenteilen eine Abnahme der Gehalte in der Reihenfolge Blüten > Blätter > Stängel [89].

Tabelle 3 Durchschnittlicher Gehalt von Cichoriensäure [% Trockengewicht] in verschiedenen Pflanzenteilen von *Echinacea purpurea*, *E. pallida* und *E. angustifolia* [89]

Art	Blüten	Blätter	Stängel
<i>E. purpurea</i>	2,2	1,0	0,4
<i>E. pallida</i>	1,2	0,2	0,2
<i>E. angustifolia</i>	0,2	0,1	0,04

Während Malonga-Makosi im Kraut von *E. purpurea* u. a. Quercetin, Quercetin-7-glucosid, ein Kämpferol-3-monoglykosid, Kämpferol-3-rutinosid und Rutin identifizierte [96], konnten Bauer et al. mittels HPLC nur Rutin als einziges Flavonoid nachweisen [89].

E. purpurea enthält in den Blüten und in den Blättern jeweils bis zu 0,6 % etherische Öle, die sich u. a. aus Borneol, α -Pinen, β -Farnesen, Myrcen und Limonen zusammensetzen [93].

Alkylamide sind eine im Pflanzenreich relativ selten auftretende Naturstoffklasse, deren Vorkommen bisher auf die Asteraceen und wenige andere Familien beschränkt ist. Als einen Hauptinhaltsstoff lipophiler Krautextrakte von *E. purpurea* konnte von Bauer et al. Dodeca-(2E,4E,8Z,10E)-tetraen-säure-(1)-isobutylamid (Abbildung 5) identifiziert werden. Weiterhin konnten die N-Isobutylamide der Undeca-(2E,4Z)-dien-8,10-diin-säure, der Dodeca-(2E,4Z)-dien-8,10-diin-säure, der Dodeca-(2E,4E,10E)-trien-8-in-säure und der Dodeca-(2E,4E,8Z)-trien-säure nachgewiesen werden. Wie bei den Kaffeesäurederivaten war die Konzentration an Alkylamiden in den Blüten am höchsten [89].

Das Vorkommen von Pyrrolizidin-Alkaloiden in Echinacea wurde von Röder et al. untersucht. In *E. purpurea* konnte Tussilagin und Isotussilagin nachgewiesen werden. Auf die getrocknete Droge bezogen wurde ein Tussilagin-Gehalt von 0,006 % ermittelt [97].

Wagner et al. konnten aus dem Kraut von *E. purpurea* zwei Polysaccharide isolieren. Es handelt sich dabei um ein Xylan mit einem mittleren Molekulargewicht (MG) von ca. 35000 und ein Arabinorhamnogalaktan mit einem mittleren MG von 45000 [57].

3.5.3 Pharmakologische Wirkungen und Anwendungen

Extrakte aus Echinacea purpurea finden aufgrund ihrer entzündungshemmenden, wundheilenden und antiirritativen Eigenschaften therapeutische und kosmetische Anwendung. Da in den letzten Jahren zahlreiche Verbindungen aus den Echinacea-Drogen isoliert und identifiziert wurden, gelang es, die Wirksamkeit mehreren Verbindungsklassen zuzuordnen: Kaffeesäurederivate, Alkylamide und Polysaccharide.

Die vor allem in Presssaftextrakten von *E. purpurea* enthaltene Cichoriensäure besitzt bei topischer Applikation eine sehr gute Hemmwirkung auf die Hyaluronidase [98]. Das Enzym steuert den Polymerisationsgrad von Hyaluronsäure und dadurch den Flüssigkeits- und Stoffaustausch zwischen den Zellen bzw. Gefäßwänden. Es ist indirekt auch für das Haften und die Ausbreitungsmöglichkeit von Infektionserregern im Gewebe verantwortlich. Die Hemmung der Hyaluronidase steht also in

Verbindung mit einer schnelleren Regeneration von Gewebezellen bei Wunden und Hautkrankheiten. Maffei Facino et al. konnten anhand von Untersuchungen zeigen, dass Cichoriensäure auch als Radikalfänger wirkt [99]. Somit kann Cichoriensäure bzw. Echinacea-Extrakt bei topischer Applikation als Radikalfänger zum Schutz vor Hautschädigungen dienen. Weiterhin zeigt Cichoriensäure in einem in vitro Granulozyten-Test im Konzentrationsbereich von 10^{-4} bis 10^{-5} mg/ml eine gute phagozytosestimulierende Wirkung [100].

Eine weitere Wirkung von Extrakten aus *E. purpurea* beruht auf den Alkylamiden. Sie stellen z. T. Hemmstoffe der Cyclooxygenase bzw. der 5-Lipoxygenase dar und wirken somit entzündungshemmend [101]. Eine weitere aktive Inhaltsstoffgruppe bilden die Polysaccharide. Wagner et al. konnten zwei Polysacchariden aus *Echinacea purpurea*-Extrakten immunstimulierende Wirkungen zuordnen [57].

Echinacea-haltige Zubereitungen zählen derzeit zu den wichtigsten pflanzlichen Phytopharmaka. Allein in Deutschland waren 1997 ca. 820 Präparate von 172 pharmazeutischen Unternehmen auf dem Markt [90]. Der angegebene Indikationsbereich ist weit gespannt und reicht von der externen Anwendung bis hin zur internen Behandlung von Grippe und Infekten. Echinacea-Zubereitungen zur topischen Applikation werden u. a. zur Wundbehandlung, bei Verbrennungen, Ekzemen und anderen Hautkrankheiten verwendet [90, 92].

3.5.4 Toxikologie

Nach einer Studie von Mengs et al. kann der Presssaft aus *Echinacea purpurea* als nicht toxisch eingestuft werden. Nach einmaliger oraler Applikation an Mäusen bzw. Ratten konnten $LD_{50} > 30$ g/kg bzw. > 15 g/kg ermittelt werden. Der Presssaft erwies sich auch nach einmaliger intravenöser Applikation an Ratten und Mäusen als praktisch untoxisch. Nach vierwöchiger oraler Zufuhr gaben pathoanatomische Befunde keine Hinweise auf spezifische toxische Wirkungen. Sowohl Mutagenitäts- als auch Kanzerogenitätsprüfungen verliefen negativ [102].

Die in *Echinacea purpurea* vorkommenden Verbindungen Tussilagin und Isotussilagin zeigen im Gegensatz zu vielen anderen Pyrrolizidin-Alkaloiden keine toxischen Wirkungen [97, 103].

3.5.5 Auswahl von Leitsubstanzen

Cichoriensäure zählt zu den Hauptinhaltsstoffen von *E. purpurea*-Presssaftextrakten und ist neben den Alkylamiden und Polysacchariden für die medizinisch-therapeutischen und kosmetischen Wirkungen verantwortlich. Da die Cichoriensäure im Gegensatz zu den Alkylamiden und den Polysacchariden ohne besondere Probenvorbereitung bestimmt werden kann, eignet sie sich als Leitsubstanz zur Charakterisierung von *Echinacea purpurea*-Extrakten sowie Formulierungen unter Zusatz dieser Extrakte [104].

3.6 Kosmetische Formulierungen

In Abhängigkeit vom Anwendungszweck werden unterschiedliche Typen von kosmetischen Formulierungen zur Hautpflege verwendet. Man unterscheidet Emulsionen (Cremes und Lotionen), Salben, Gele, Öle und Balsame, wobei Emulsionen den wichtigsten Produkttyp der Hautpflegemittel darstellen.

Unter Emulsionen versteht man im allgemeinen ein heterogenes System, das aus zwei miteinander nicht oder nur begrenzt mischbaren Phasen besteht. Die eine liegt dabei in Form von Tröpfchen vor (disperse oder innere Phase), während die andere eine kontinuierliche (kohärente oder äußere) Phase bildet. Liegen die Öltröpfchen der Zubereitung als innere Phase in einer äußeren wässrigen Phase vor, so handelt es sich um eine Öl-in-Wasser-Emulsion (O/W-Emulsion). Bei der Wasser-in-Öl-Emulsion (W/O-Emulsion) handelt es sich um das umgekehrte Prinzip, wobei hier der Grundcharakter der Formulierung vom Öl bestimmt wird [105].

O/W-Emulsionen eignen sich u. a. als Reinigungsemulsionen und als Cremes zur Hautpflege. Sie sind mit Wasser abwaschbar, lassen sich auf der Haut leicht verteilen, ziehen schnell ein und hinterlassen keinen Fettglanz. Beim Aufbringen auf der Haut verdunstet die äußere Wasserphase und verursacht so einen Kühl-Effekt. Die innere Ölphase trägt zur Hautfettung und zur Hautbefeuchtung bei [106].

W/O-Emulsionen finden bei normalen bis trockenen Hautzuständen und bei chronischen Dermatosen Verwendung. Sie ziehen nicht so schnell ein, hinterlassen einen schützenden Fettfilm. Dieser Film reduziert den transepidermalen Wasserverlust und sorgt so für eine intensive Hautbefeuchtung. W/O-Emulsionen fördern außerdem die Einschleusung von Wirkstoffen in die Haut (okklusive Wirkung) [106].

4 Material und Methoden

4.1 Untersuchungsmaterial

Die verwendeten Pflanzenextrakte wurden von Rohstofflieferanten bezogen und ohne weitere Bearbeitung direkt zur Herstellung der kosmetischen Formulierungen eingesetzt. Die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Formulierungen erfolgte in der Abteilung Forschung Wirkstoffe, Beiersdorf AG. Eine Beschreibung der Pflanzenextrakte und der untersuchten Formulierungen erfolgt in Abschnitt 9.1.

4.2 Untersuchung von Pflanzenextrakten

Die Charakterisierung von Pflanzenextrakten bzw. deren Leitsubstanzen wurde mit Hilfe von UV-Spektren, Massenspektren, MS/MS-Fragmentspektren (MS/MS - tandem-massenspektrometrisch) und z. T. NMR-Spektren durchgeführt. Zur Quantifizierung der Leitsubstanzen wurden chromatographische Analysenverfahren mit massenselektiver Detektion verwendet. Mit diesen Methoden wurden zunächst die Wirkstoffgehalte verschiedener Pflanzenextrakt-Rohstoffe ermittelt. Anschließend wurden deren Lagerstabilitäten in verschiedenen kosmetischen Formulierungen untersucht. Die Penetration der Pflanzenextrakte in die Haut wurde mit Hilfe eines in vitro Schweinehautmodells nach einmaliger topischer Applikation bestimmt (vgl. Abschnitt 5). Die detaillierten Methodenparameter werden in Abschnitt 9.2 beschrieben.

4.2.1 Lagerungsversuche

Zur Untersuchung der Stabilität der Pflanzenextrakte in den einzelnen kosmetischen Formulierungen wurden Lagerungsversuche durchgeführt. Die Formulierungen wurden direkt nach der Herstellung in Aluminiumtuben und Klarglas-Gläschen (Raumtemperatur unter Lichteinfluss) abgefüllt und unter folgenden Bedingungen gelagert: Raumtemperatur unter Lichteinfluss, Raumtemperatur, + 6 °C und + 40 °C. Die Lagerung unter Lichteinfluss erfolgte an einem Fenster während die anderen Proben unter Lichtausschluss gelagert wurden. Die Proben wurden kurz nach der Herstellung bzw. nach 1, 3 und 6 Monaten Lagerung untersucht (Abbildung 6). Die Bestimmung der Gehalte erfolgte mittels LC/MS anhand von Leitsubstanzen.

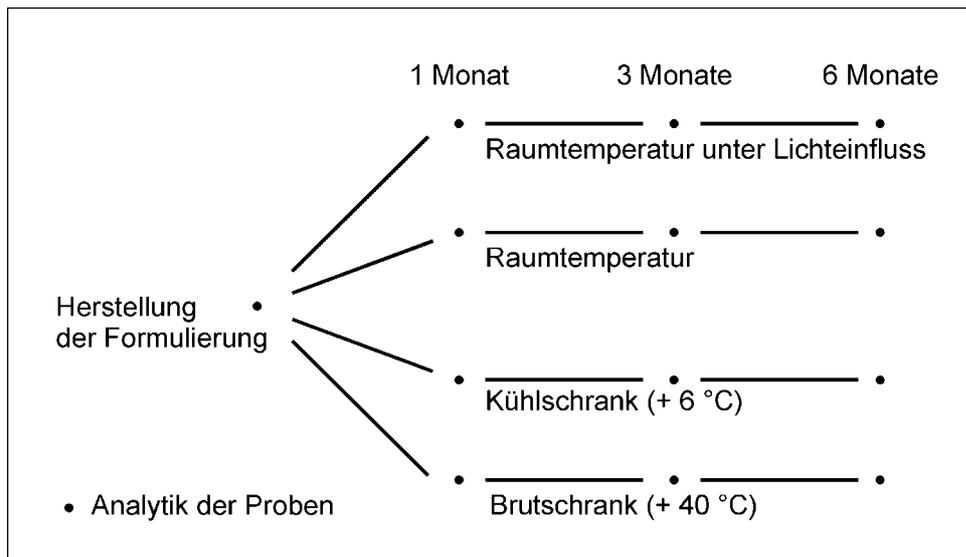


Abbildung 6 Versuchsaufbau zur Bestimmung der Lagerstabilität

4.2.2 Untersuchung der Penetrationseigenschaften

Ziel der topischen Anwendung kosmetischer Formulierungen ist in der Regel eine lokale Wirkung, die von dem jeweiligen Hautzustand und den Wirkstoffeigenschaften sowie der Rezepturbasis limitiert wird. Betrachtet man dabei den eingesetzten Wirkstoff, so hängt die kosmetische bzw. therapeutische Effektivität in erster Linie davon ab, inwieweit es gelingt, in der entsprechenden Hautschicht eine ausreichende Wirkstoffkonzentration zu erreichen [107].

Penetrationsstudien an Humanhaut unter ex vivo Bedingungen sind aus Verfügbarkeitsgründen in ihrem Ausmaß eingeschränkt und zudem durch eine gewisse intra- und interindividuelle Variabilität geprägt [108]. Da auch in letzter Zeit Tierversuche stark limitiert wurden [12], bedarf es standardisierter in vitro Modellen zur Evaluierung der Penetration von Wirkstoffen. Ein anerkanntes in vitro Modell stellt die Diffusionszelle nach Franz dar [108]. Seine Anwendung begründet sich in einer guten Korrelation der Barriereigenschaften präparierter Haut mit in vivo Verhältnissen. So stellte Franz für verschiedene organische Substanzen eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit in vivo Befunden von Feldmann und Maibach fest [109, 110].

In dieser Arbeit wurden die Studien zum Penetrationsverhalten der pflanzlichen Wirkstoffe anhand präparierter Schweinehaut in modifizierten Diffusionszellen nach Franz durchgeführt (Abbildung 7) [108]. Die Verwendung von Schweinehaut ist sinnvoll, da sie einen ähnlichen physiologischen Aufbau wie Humanhaut besitzt und in relativ gleichbleibender Qualität verfügbar ist [108, 111, 112]. Die verwendete Diffusionszelle besteht aus zwei einzelnen, doppelwandigen, temperierbaren Glaskammern. Die untere Zelle dient zur Aufnahme der Rezeptorflüssigkeit, ein Blutimitat aus Wasser, Natriumchlorid, Gentamycin und Albumin. Die obere Zelle dient zur Vermeidung von zu starkem Wasserverlust durch Verdunstung und ermöglicht so relativ konstante Hydratationsbedingungen. Die präparierte Haut wird so fixiert, dass sie mit der dermalen Seite in Kontakt zur Rezeptorphase gelangt. Die Applikation der Wirkstoffe kann in diesem Modell in kosmetisch-relevanten Konzentrationen erfolgen. So werden etwa 20 mg Formulierung pro Hautscheibe (ca. 5 cm²) appliziert.

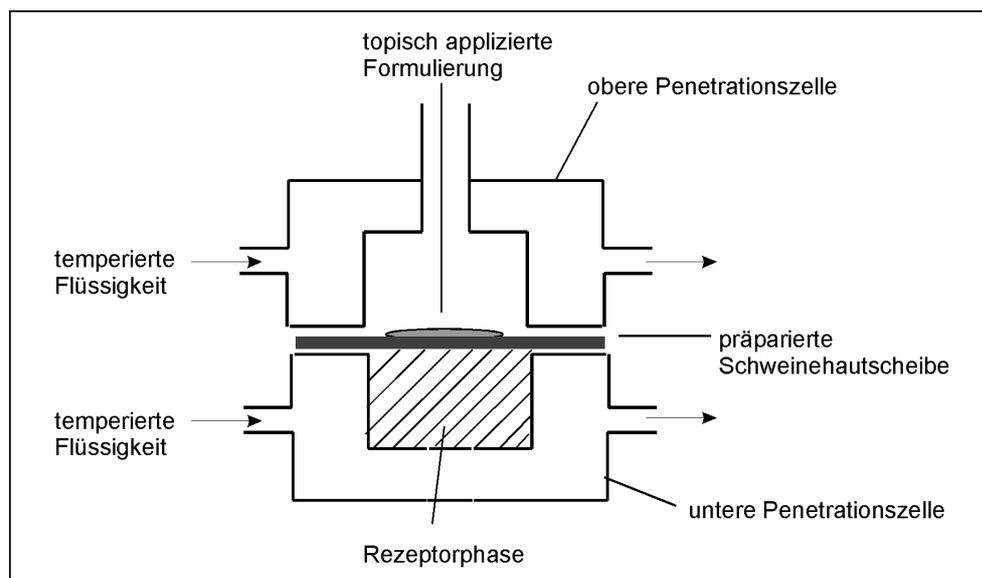


Abbildung 7 Querschnitt der verwendeten Penetrationszelle

Nach einer Penetrationsdauer ca. 20 Stunden werden folgende Schichten analysiert: Hautoberfläche, Hornschicht, Epidermis, Dermis und Rezeptorphase [108, 113]. Die Penetrationsuntersuchungen, d. h. Präparation der Schweinehaut, Applikation der kosmetischen Formulierungen und Extraktion der einzelnen Hautschichten, wurden in der Abteilung in vitro Bioverträglichkeit/Screening, Beiersdorf AG, durchgeführt. Die einzelnen Methodenparameter sind in Abschnitt 9.2 aufgeführt. Die verwendeten kosmetischen Formulierungen sind in Abschnitt 9.1 beschrieben.

4.2.3 Kopplung Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie

Die Kopplung Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie verbindet die Trennleistung flüssigchromatographischer Verfahren mit dem Informationsgehalt massenspektrometrischer Darstellungen. Die Anwendung dieser Technik ist speziell bei der Untersuchung nichtflüchtiger, polarer oder thermolabiler Substanzen interessant, die der Gaschromatographie nicht zugänglich sind. Hierzu zählen u. a. eine Vielzahl von Pflanzeninhaltsstoffen sowie pharmazeutischen und kosmetischen Wirkstoffen [114, 115].

In dieser Arbeit wurde die API-ES (*atmospheric pressure ionization-electrospray*)-Technik verwendet, bei der die Analyten unter Atmosphärendruck ionisiert werden [116]. In einer API-ES-Ionenquelle werden die Analytmoleküle selektiv ionisiert und durch elektrostatische Potentiale unter Abtrennung neutraler Lösungsmittelmoleküle in den Hochvakuumbereich des Massenspektrometers geleitet. Durch die Möglichkeit des Umpolens der elektrostatischen Potentiale können sowohl positive als auch negative Ionen erzeugt werden.

Bei dieser Technik wird der Flüssigkeitsstrom unter Atmosphärendruck innerhalb eines starken elektrostatischen Potentialgefälles von ca. 3 bis 6 kV (Kapillarspannung) versprüht. Bei höheren Flußraten, wie z. B. bei der Kopplung mit der HPLC (Hochleistungs-Flüssigchromatographie), wird der Vorgang pneumatisch mit Stickstoff als Sprühgas (*nebulizer*) unterstützt. Durch die Kombination des starken elektrostatischen Feldes und der Scherkräfte des Sprühgases wird der Flüssigkeitsstrom in kleine Tröpfchen gebrochen. Unter Einwirkung eines geheizten Stickstoff-Trockengasstromes (*drying gas*) verdampfen neutrale Lösungsmittelmoleküle aus den Tröpfchen. Dieser sogenannte „*gas curtain*“ wirkt auch Clusterbildungen von Lösungsmittel- und Analytionen entgegen, die bei Expansion von Analytionen und Lösungsmittelmolekülen im Vakuum durch die Abkühlung entstehen würden. Wenn die Ladungsdichte bei hinreichender Verkleinerung der Tröpfchen die Oberflächenspannung übersteigt, wird das „Rayleigh-Limit“ erreicht, was in einer „Coulomb-Explosion“ resultiert. Es wird so eine Vielzahl geladener Mikrotröpfchen erzeugt, die nach entsprechender Verkleinerung erneut explodieren. Wenn das letzte neutrale

Lösungsmittelmolekül verdampft ist, geht die Ladung auf den Analyten über. Diese Modellvorstellung wird auch als *charge residue model* bezeichnet [117]. Eine weitere Modellvorstellung, das *ion evaporation model*, beschreibt, dass ab einer Tröpfchengröße von ca. 10 nm geladene Analytionen aus den Tröpfchen herausgeschleudert werden [118, 119]. Der Aufbau einer API-ES-Ionenquelle und ein Modell der Ionisierung ist in Abbildung 8 dargestellt.

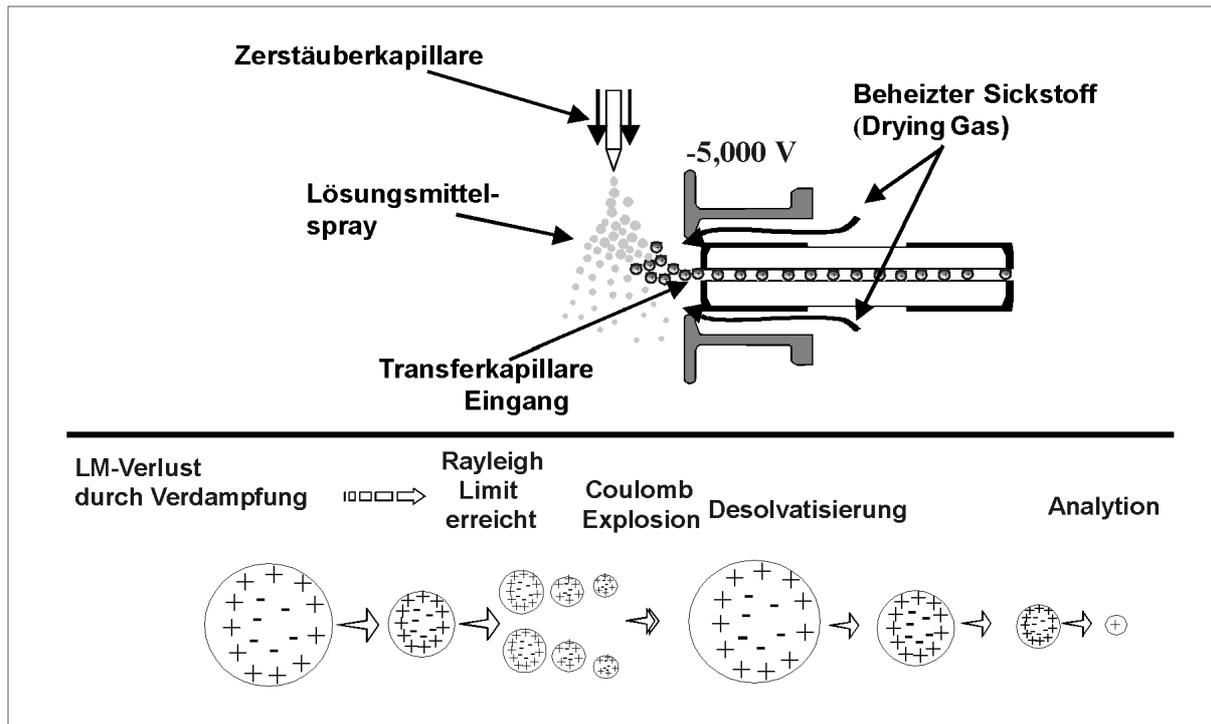


Abbildung 8: API-ES (*atmospheric pressure ionization-electrospray*)-Technik [120]

Bei der API-ES-Ionisation handelt es sich um eine schonende Ionisierungs-Technik, die hohe Empfindlichkeit bei der Kopplung von HPLC und MS aufweist. Neben einfach geladenen können auch mehrfach geladene Ionen erzeugt werden (z. B. bei Proteinen) [121]. Die mobile Phase der HPLC hat einen starken Einfluss auf das Ionisierungsverhalten, wobei neben der Flussrate auch die chemische Beschaffenheit von Bedeutung ist. Hohe Polarität und geringe Oberflächenspannung des Lösungsmittels fördern die Ionisierung bei der API-Technik [122].

Quadrupol-Massenspektrometer bieten in der Regel eine gute quantitative Reproduzierbarkeit bei einfacher Handhabung. Ionenfallen-Massenspektrometer zeichnen sich durch ihre hohe Empfindlichkeit und die Möglichkeit zu wiederholten Fragmentierungsexperimenten der „getrapten“ Ionen (MS^n) aus. Im Gegensatz zur

Triple-Quadrupol-Technik finden in der Ionenfalle die Schritte der Ionenisolierung, Fragmentierung und Produktionenanalyse nicht räumlich getrennt, sondern in zeitlicher Abfolge statt. Die interessierenden Ionen werden in der Ionenfalle isoliert und anschließend selektiv fragmentiert. Neben der selektiven Fragmentierung unterscheidet man die massenunabhängige Fragmentierung, die auch mit einem Single-Quadrupole-Massenspektrometer möglich ist. Die Spannungsdifferenz zwischen Transferkapillare und Skimmer 1, auch als Fragmentorspannung bezeichnet, bestimmt bei den verwendeten Massenspektrometern die sogenannte *collision induced dissociation* (CID). Während eine gewisse CID der Cluster- bzw. Adduktbildung von Analytionen entgegenwirkt und daher für intensive Massensignale der Quasimolekülonen unerlässlich ist, induziert eine zu starke CID massenunabhängige Fragmentierung und bewirkt so eher das Gegenteil [122].

Zur Analytik der pflanzlichen Wirkstoffe wurden in dieser Arbeit ein HPLC-System (Hewlett-Packard 1100, Fa. Agilent, Waldbronn) gekoppelt mit einem Single-Quadrupole-Massenspektrometer (Hewlett-Packard 1100 MSD, Fa. Agilent, Waldbronn) sowie ein Ionenfallen-Massenspektrometer (ESQUIRE~LC, Fa. Bruker Daltonik, Bremen) verwendet. Die beiden Massenspektrometer waren jeweils mit einer API-ES-Ionenquelle (Fa. Agilent, Waldbronn) ausgerüstet. Die einzelnen Methodenparameter sind in Abschnitt 9.2 aufgeführt.

4.3 Methodvalidierung und statistische Methoden

Aufgrund des hohen Probenvolumens bei den Untersuchungen zur Lagerstabilität der Pflanzenextrakte sollten von den Proben nur Einmalbestimmungen durchgeführt werden. Um dennoch repräsentative Analysenergebnisse zu generieren, war eine Validierung der verwendeten Meßmethoden erforderlich. Hierzu wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie die Wiederfindungsraten und relativen Standardabweichungen für die einzelnen Leitsubstanzen untersucht. In dieser Arbeit wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der einzelnen Leitsubstanzen anhand des Peak/Rausch-Verhältnisses mit Hilfe von Standardlösungen ermittelt. Die Nachweisgrenzen wurden als dreifaches Peak/Rausch-Verhältnis, die Bestimmungsgrenzen als 10-faches Peak/Rausch-Verhältnis definiert. Die Wiederfindungsraten wurden mit Hilfe von dotierten Placebos (kosmetische Formulierung ohne entsprechenden Wirkstoff) ermittelt, indem isolierte Leitsubstanzen vor der Probenaufarbeitung mit den Placebos vermengt wurden. Bei Wiederfindungsraten um 100 % war eine Quantifizierung mittels Standardkalibrierung möglich, andernfalls wurde eine Matrixkalibrierung durchgeführt. Zur Charakterisierung der Streuung der Einzelmeßwerte wurde die relative Standardabweichung herangezogen. Die relative Standardabweichung wurde mit Hilfe von Wiederholbestimmungen ermittelt, indem die jeweiligen kosmetischen Formulierungen (mit pflanzlichem Wirkstoff) mehrfach extrahiert und analysiert wurden. Da die entwickelten LC/MS Methoden gute Reproduzierbarkeiten aufwiesen und die kosmetischen Formulierungen eine homogene Matrix darstellten und auch während der Lagerung keine Phasentrennung auftrat, war eine Mehrfachbestimmung der Proben nicht erforderlich. Darüber hinaus handelte es sich bei den eingesetzten Pflanzenextrakten um homogene Gemische einer Charge, so dass keine Schwankungen in der Zusammensetzung der Pflanzenextrakte zu erwarten waren.

Im Gegensatz zu den kosmetischen Formulierungen unterliegen die Penetrationsproben gewissen individuellen Variabilitäten bezüglich Hautbeschaffenheit, Hautdicke und Anzahl der extrahierten Zellschichten. Weiterhin können keine definierten Untersuchungen zur Bestimmung der Wiederfindungsraten durchgeführt werden, da nicht zwischen der Extraktion/Bestimmung und dem Abbau der Leitsubstanzen in der

Haut differenziert werden kann. Um dennoch aussagekräftige Analyseergebnisse zu erzielen, waren Wiederholmessungen erforderlich.

Die Angabe der Meßwerte erfolgte jeweils mit den Stammkenndaten Mittelwert, Standardabweichung, relativer Standardabweichung und Vertrauensbereich des Mittelwertes. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde der Mittelwert und der Vertrauensbereich des Mittelwertes herangezogen. Die Berechnung des Vertrauensbereiches erfolgte mit einer statistischen Sicherheit von $P = 95 \%$. Aufgrund des geringen Zahlenmaterials wurde weder eine Prüfung auf Ausreißer noch eine Prüfung auf Normalverteilung durchgeführt. Eine Prüfung auf Normalverteilung ist nach Kaiser und Gottschalk bei geringem Zahlenmaterial nicht erforderlich, da „die Testdaten (...) nämlich so unscharf (...) bzw. die Entscheidungsbereiche (...) so breit“ ausfallen „daß es auf tatsächlich vorhandene Normalverteilung nicht ankommt“ [123].

Zur Berechnung der statistischen Kenndaten wurden folgende Parameter herangezogen:

Relative Standardabweichung:
$$\text{Resultat} = \frac{s_x \times 100}{x}$$

Vertrauensbereich:
$$\text{Resultat} = \pm \frac{s_x \times t}{\sqrt{n}}$$

x: Mittelwert

s_x : Standardabweichung (ausgehend von einer Stichprobe)

n: Anzahl der Einzelmessungen

t: STUDENT-Faktor (ausgehend von einer statistischen Sicherheit von $P=95 \%$)

5 Ergebnisse

5.1 Camellia sinensis

5.1.1 Analytik

Photometrische Untersuchungen

Zur Charakterisierung der Catechine wurden zunächst wässrig-methanolische Lösungen (MeOH/H₂O 50:50, v:v) von Catechin, Epicatechin, Epigallocatechin, Epigallocatechingallat, Gallocatechingallat und Epicatechingallat photometrisch vermessen (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.2). In Abbildung 9 sind die einzelnen UV-Spektren der untersuchten Catechine dargestellt. Die UV-Spektren zeigen spezifische Maxima um 230 nm und um 280 nm. Das UV-Maximum bei 205-210 nm ist auf das verwendete Lösungsmittel Methanol zurückzuführen. Wie man aus der Abbildung erkennt, ist eine Differenzierung der einzelnen Catechine mittels UV-Spektren nicht möglich. Beim Vergleich der Spektren von Catechin, Epicatechin und Epigallocatechin mit den Gallaten (Epigallocatechingallat, Gallocatechingallat, Epicatechingallat) ist jedoch erkennbar, dass die Veresterung mit Gallussäure eine stärkere Absorption bei 280 nm hervorruft. Die Ursache liegt in dem Absorptionsmaximum der estergebundenen Gallussäure von 280 nm.

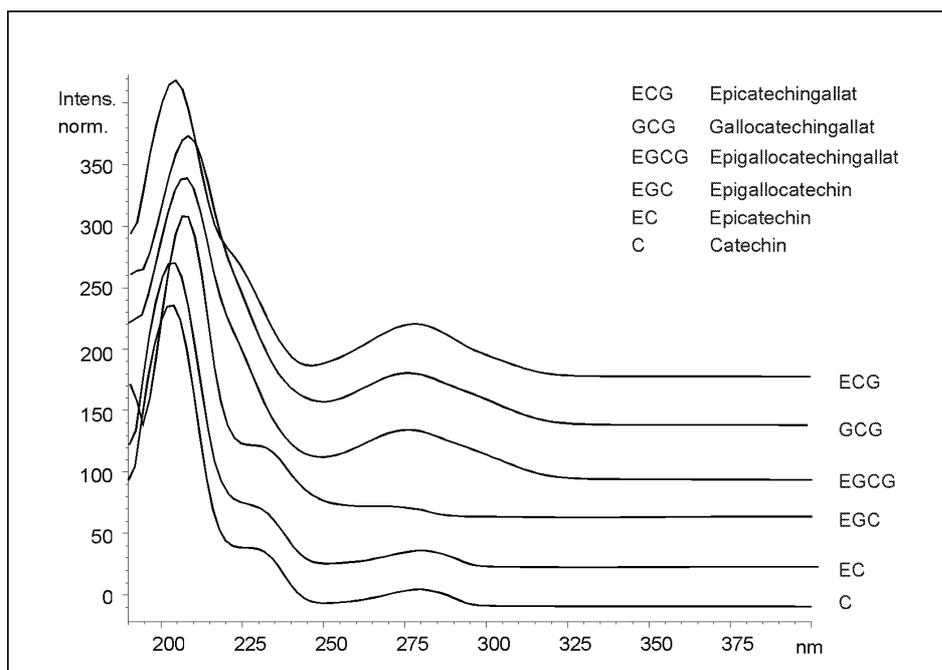


Abbildung 9 UV-Spektren von Grüntee-Catechinen

Massenspektrometrische Untersuchungen

Die massenspektrometrische Darstellbarkeit der Catechine wurde anhand folgender Catechine untersucht: Catechin, Epicatechin, Epigallocatechin, Epigallocatechingallat, Gallocatechingallat und Epicatechingallat. Als Lösungsmittel und Eluent wurde ein wässrig-methanolisches Lösungsmittelgemisch (MeOH/H₂O 20:80, v:v) verwendet (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.2). Polare Lösungsmittel (z. B. Wasser, Methanol) unterstützen bei der API-ES Ionenquelle den Ionisierungsprozess und ermöglichen eine gute Analytioneausbeute. Die Catechin-Lösungen wurden mittels FIA (*flow injection analysis*)-Probenaufgabemethodik in das Quadrupol-Massenspektrometer injiziert, d. h. es erfolgte eine Probenaufgabe ohne vorherige chromatographische Trennung. Auf diese Weise können die Ionisierungsparameter der einzelnen Verbindungen auf eine große Ionenausbeute und damit intensive Massensignale optimiert werden. Mit 35 psi als Sprühgas und 10 l/min als Trockengas wurden dem Wasseranteil entsprechend hohe Stickstoff-Gasströme gewählt. Aufgrund der Thermolabilität der Catechine erwies sich eine Trockengastemperatur von 250 °C als optimal. Es wurde eine Fragmentorspannung von 90 V gewählt, die für eine gleichzeitige Bestimmung der 6 Grüntee-Catechine geeignet ist. Die in den FIA-Analysen ermittelten Geräteparameter wurden auch in der späteren Kopplung LC/MS verwendet (vgl. Abschnitt 9.2.2).

In Abbildung 10 sind die Massenspektren von 6 Catechinen dargestellt. Im negativen Ionenmodus werden die Catechine als $[M-H]^-$ Quasimolekülionen ionisiert. Im Gegensatz zu Catechin, Epicatechin und Epigallocatechin ist bei den Gallaten ein weiteres Signal in den Massenspektren vorhanden. Hierbei handelt es sich um $[M-H+22]^-$ Addukte, deren Bildung bisher noch nicht geklärt werden konnte. Die Untersuchung mittels MS/MS-Fragmentierungsexperimenten führte zu keiner weitergehenden Charakterisierung der $[M-H+22]^-$ Addukte. Die Intensität dieser Addukte ist von der angelegten Fragmentorspannung abhängig. Eine Erhöhung der Fragmentorspannung führte einerseits zu einer Verringerung der Adduktbildung bei den Gallaten, andererseits aber auch zu einer Verringerung der Signalintensität bei Catechin, Epicatechin und Epigallocatechin. Catechine lassen sich auch im positiven Ionenmodus als $[M+Na]^+$ ionisieren. Im Vergleich zum negativen Ionenmodus ist dies

aber mit einer wesentlich geringeren Signalintensität und damit einer geringeren Nachweisempfindlichkeit verbunden.

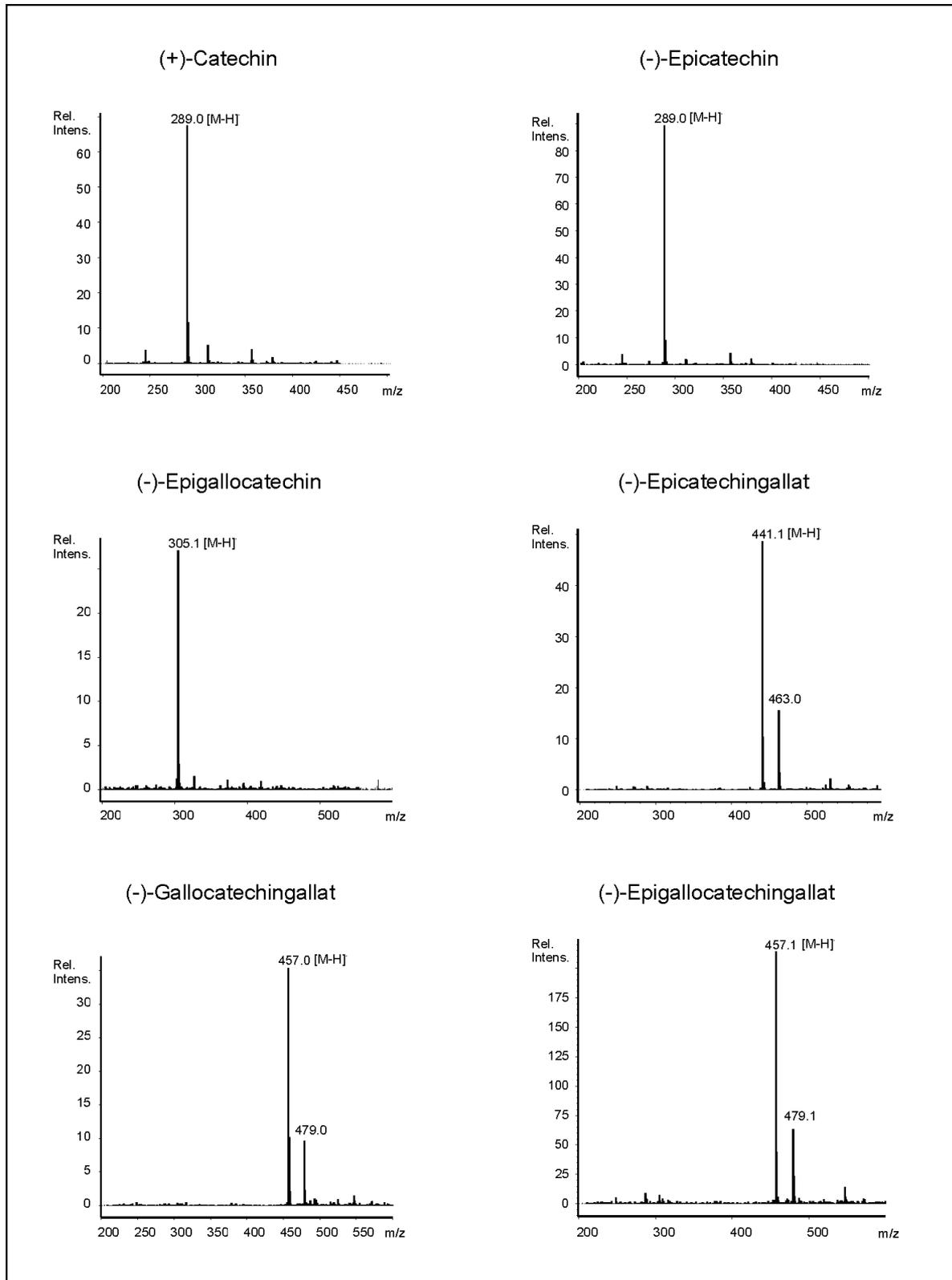


Abbildung 10 API-ES Massenspektren von Grüntee-Catechinen (neg. Ionenmodus)

MS/MS-Fragmentierungsexperimente

Zur Durchführung der MS/MS-Fragmentierungsexperimente wurde die Analyt-Lösung kontinuierlich mit einer Spritzenpumpe in das Massenspektrometer injiziert, wobei Epicatechingallat exemplarisch für die Grüntee-Catechine ausgewählt wurde (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.2).

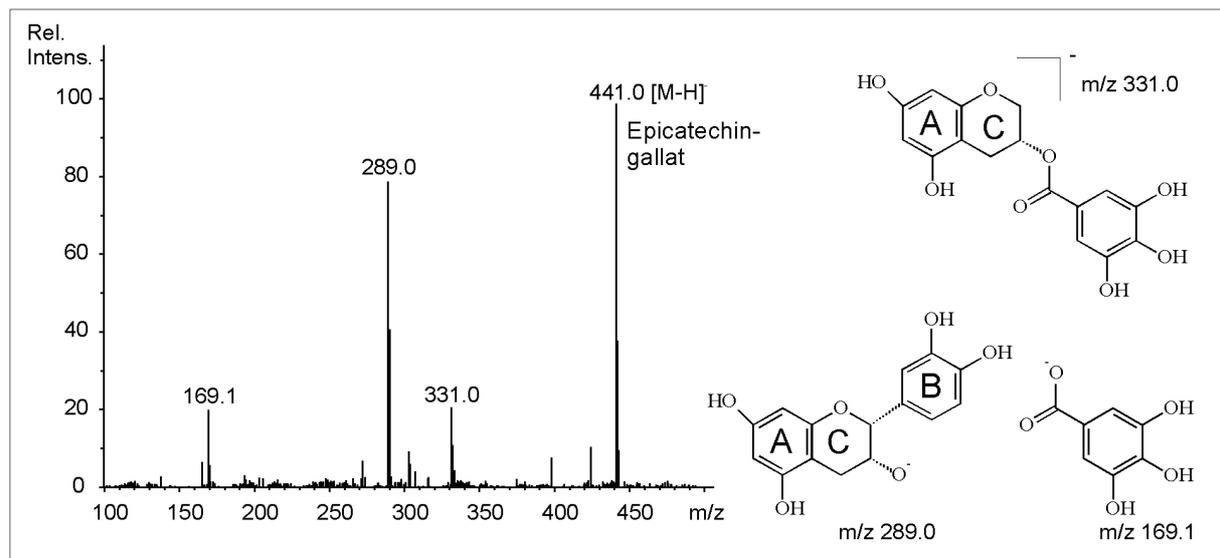


Abbildung 11 API-ES MS/MS Fragmentierungsexperiment von Epicatechingallat (neg. Ionenmodus)

In Abbildung 11 ist ein Fragmentspektrum von Epicatechingallat im negativen Ionenmodus dargestellt. Bei diesem Fragmentierungsexperiment wurden zunächst die [M-H] Ionen in der Ionenfalle isoliert und anschließend selektiv mit einer Amplitude von 0,90 V fragmentiert. Im rechten Teil der Graphik sind mögliche Fragmente dargestellt. Das Fragment mit einer Molekülmasse von 331 amu entsteht durch Verlust des B-Rings vom Flavangerüst. Die durch Spaltung der Esterbindung erhaltenen Fragmente lassen sich dem Epicatechin (m/z 289) und der Gallussäure (m/z 169) zuordnen.

Kopplung LC/MS

Die Quantifizierung von Grüntee-Polyphenolen wurde mit Hilfe der Kopplung Flüssigchromatographie und API-ES Quadrupol Massenspektrometrie durchgeführt. Zur chromatographischen Trennung wurde ein *reversed-phase* (RP) Trennsystem verwendet. Der Trennmechanismus beruht hier hauptsächlich auf hydrophoben

Wechselwirkungen des alkylierten Kieselgels in der Trennsäule mit unpolaren Gruppen der Polyphenole. Die in der RP-Chromatographie verwendeten polaren Lösungsmittel unterstützen den Ionisierungsprozess in der API-ES Ionenquelle des Massenspektrometers. Zur Entwicklung der chromatographischen Trennung wurden Einzel- und Mischstandardlösungen von Grüntee-Catechinen und der Gallussäure untersucht (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.2).

Um eine Überlastung der API-ES Ionenquelle zu vermeiden, wurde eine Trennsäule mit 2 mm Innendurchmesser (*microbore*) verwendet. Eine Säule dieser Dimension ermöglicht gute Trennleistungen bei der verwendeten Flußrate von 200 µl/min, was eine Flußteilung des Eluenten bei der Kopplung mit dem Massenspektrometer erübrigt. Durch die Verwendung kurzer Säulen mit einer Länge von 6 cm werden die Equilibrierungszeiten verkürzt und somit auch der Zeitbedarf pro Analyse verringert. Als stationäre Phase wurde modifiziertes Kieselgel (RP-8, *encapsulated*) gewählt. Bei diesem Füllmaterial sind die freien nichtalkylierten Silanolgruppen des Kieselgels vollständig abgeschirmt, wodurch eine besonders inerte Trennphase erhalten wird. Als mobile Phase wurde ein Gradient aus Methanol und 0,1 % iger wässriger Ameisensäure verwendet. Die Ameisensäure dient zur Protonierung der Catechine. Zur Entwicklung der chromatographischen Trennung wurde zunächst die Gesamtzahl der durch den Analysator tretenden Ionen, der Totalionenstrom (*total ion current*, TIC), aufgezeichnet. Auf diese Weise kann bei der Kopplung mit chromatographischen Trenntechniken zu jeder Stelle im Chromatogramm ein Massenspektrum abgerufen und Aussagen über Matrixeinflüsse und Peakreinheit getroffen werden. Wenn nur einzelne Ionen in einem Chromatogramm dargestellt werden, wird dies als *extracted ion chromatogram* bzw. Massenspur bezeichnet. Durch Aufzeichnung einzelner Massen, dem *selected ion monitoring* (SIM), kann in der Quadrupol-Massenspektrometrie die Empfindlichkeit sowie die Reproduzierbarkeit bei Wiederholmessungen gesteigert werden.

In Abbildung 12 ist ein SIM Chromatogramm einer Polyphenol-Mischstandardlösung abgebildet. Die einzelnen Verbindungen sind jeweils mit ihren Massenspuren [M-H]⁻ dargestellt.

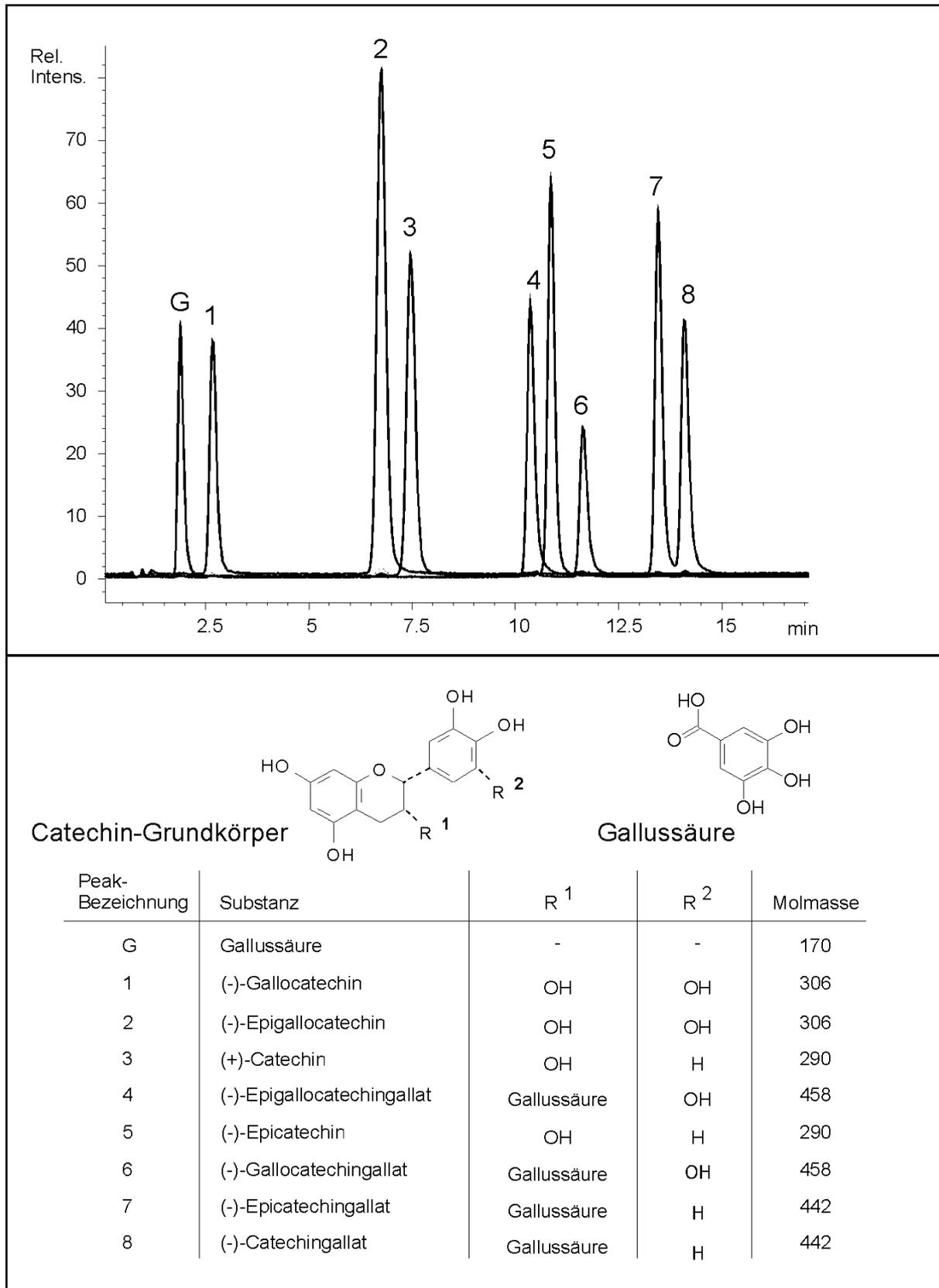


Abbildung 12 HPLC API-ES MS Trennung von Grüntee-Catechinen und Gallussäure (neg. Ionenmodus), Darstellung einzelner Massenspuren [M-H]⁻

Im unteren Teil der Graphik sind die untersuchten Verbindungen und deren Struktur aufgeführt. Mit dem entwickelten System lassen sich auch die massengleichen Epimere Catechin/Epicatechin, Gallocatechin/Epigallocatechin, Gallocatechingallat/Epigallocatechingallat sowie Catechingallat/Epicatechingallat trennen. Insgesamt wird durch die Kopplung HPLC und massenselektive Detektion die Bestimmung von 8 Grüntee-Catechinen und der Gallussäure ermöglicht.

Stabilität der Catechine während der Analysen

Für weitere Untersuchungen wurden repräsentativ für alle Grüntee-Catechine folgende 5 Catechine ausgewählt: Catechin, Epicatechin, Epigallocatechin, Epigallocatechingallat und Epicatechingallat. Um die Catechine mit Hilfe eines Autosamplers (automatischer Probengeber) in Probenserien über mehrere Stunden zu bestimmen, ist eine ausreichende Stabilität der Catechine in der Messlösung erforderlich. Zur Ermittlung der Stabilität wurde eine wässrig-methanolische Mischstandardlösung in Klarglas-Vials über einen Zeitraum von 17 Stunden bei Raumtemperatur mittels LC/MS vermessen. In Abbildung 13 sind die Gehalte an Catechinen nach 6, 11 und 17 Stunden bezogen auf den Anfangsgehalt dargestellt.

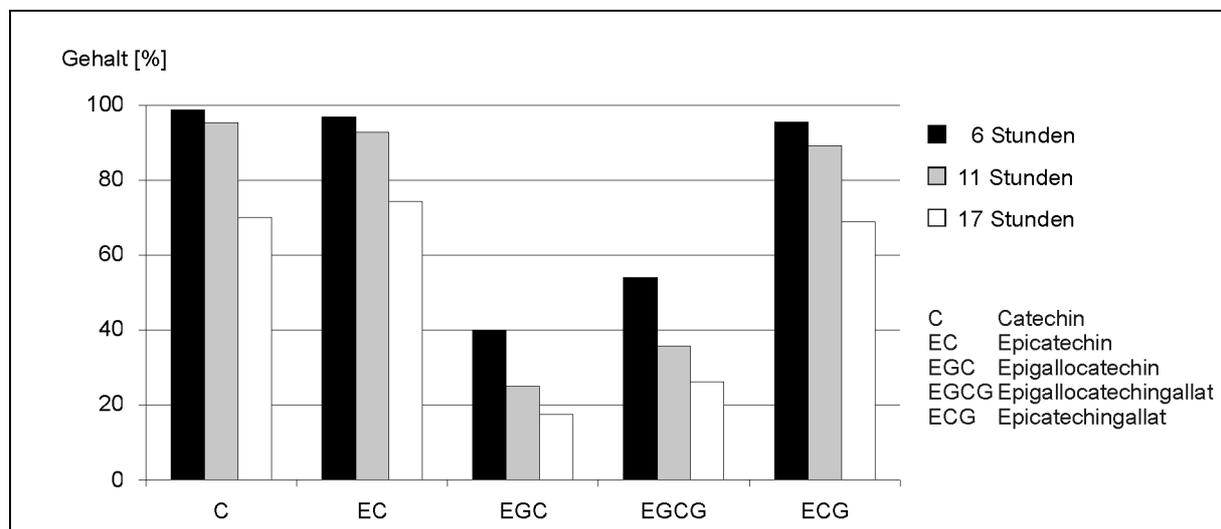


Abbildung 13 Stabilität von Catechinen in einer wässrig-methanolischen Lösung bei Raumtemperatur nach 6, 11 und 17 Stunden (Gehalte bezogen auf den Anfangsgehalt)

Bei den untersuchten Catechinen wurde ein deutlicher Abbau bei Raumtemperatur ermittelt. Insbesondere Epigallocatechin und Epigallocatechingallat unterliegen starken Abbaureaktionen, so dass nach 17 Stunden nur noch rund 20 % der Anfangsgehalte gemessen werden konnten. Catechin, Epicatechin und Epicatechingallat zeigten bei dieser Versuchsanordnung eine höhere Stabilität, die sich in Wiederfindungsraten von über 60 % widerspiegeln. Wie man anhand der Graphik erkennt, ist eine reproduzierbare Bestimmung der Catechine ohne eine zusätzliche Stabilisierung über einen längeren Zeitraum nicht möglich.

Verbesserung der Stabilität von Catechinen durch Zusätze

Zur Verbesserung der Stabilität während einer Messserie wurden verschiedene Ansätze untersucht, wobei Epigallocatechin, das in der vorherigen Versuchsreihe die geringste Stabilität aufwies, als Markersubstanz gewählt wurde. Nachdem die alleinige Verwendung von Braunglas-Vials zu keiner deutlichen Verbesserung der Stabilität führte, wurde der Einfluss von zugesetzten Antioxidantien und Komplexbildnern untersucht. Eine wässrig-methanolische Epigallocatechin-Standardlösung wurde hierbei mit unterschiedlichen Konzentrationen an BHT, BHA, Ascorbinsäure (Vitamin C – Vit C) und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) versetzt. Die einzelnen Lösungen wurden kurz nach der Herstellung sowie nach 6, 12 und 18 Stunden mittels LC/MS vermessen. Das Ergebnis der Stabilisierungsversuche ist in Abbildung 14 dargestellt. Die angegebenen Gehalte beziehen sich auf den Anfangsgehalt an Epigallocatechin.

Während Zusätze an BHT, BHA und EDTA von 10 bzw. 100 µg/ml zur Standardlösung nur zu mäßigen Stabilitätsverbesserungen führten, zeigten die mit Vit C versetzten Lösungen die besten Wiederfindungsraten. Ein Zusatz von 10 µg/ml Vit C verbessert die Wiederfindungsrate nach 18 Stunden Raumtemperatur auf rund 70 %. Erhöht man die Konzentration an Vit C auf das 10-fache, ergibt sich eine Wiederfindungsrate von über 80 % des ursprünglichen Gehaltes. Ein Vit C-Zusatz hatte bei der Bestimmung von Epigallocatechin keinen negativen Einfluss auf die chromatographische Trennung und den Ionisierungsprozess.

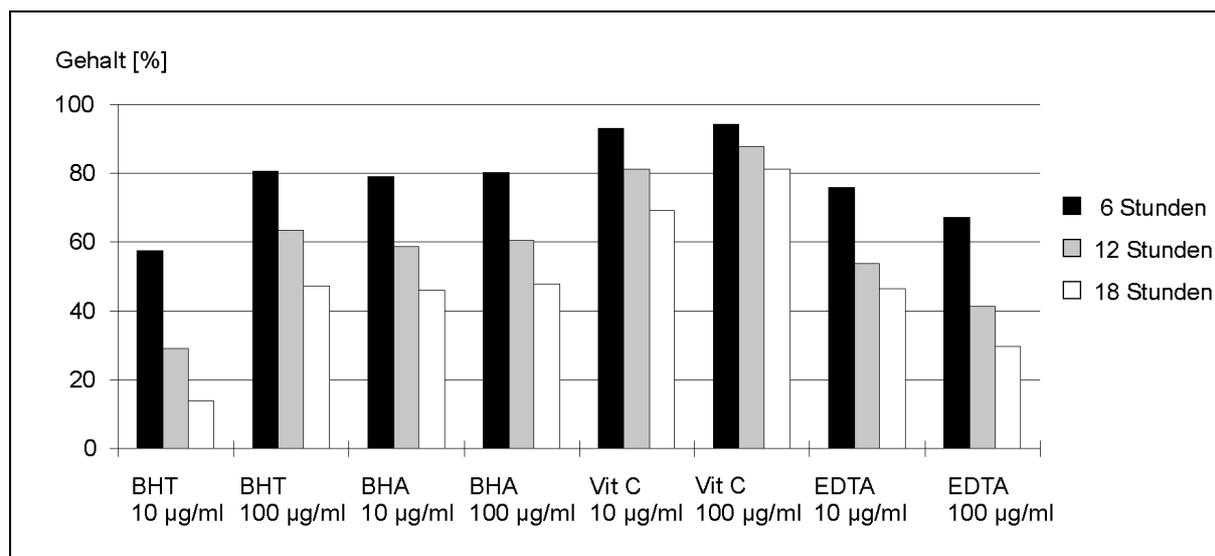


Abbildung 14 Stabilität von (-)-Epigallocatechin in einer wässrig-methanolischen Lösung mit Zusatz von Antioxidantien bzw. Komplexbildnern bei Raumtemperatur nach 6, 12 und 18 Stunden (Gehalte bezogen auf den Anfangsgehalt)

Stabilisierung der Catechine mit Vit C

Der Einfluss von Vit C auf die Stabilität der anderen interessierenden Catechine wurde in einer weiteren Versuchsreihe untersucht. Um den stabilisierenden Effekt zu verstärken, wurde die verwendete Konzentration auf 200 µg/ml verdoppelt.

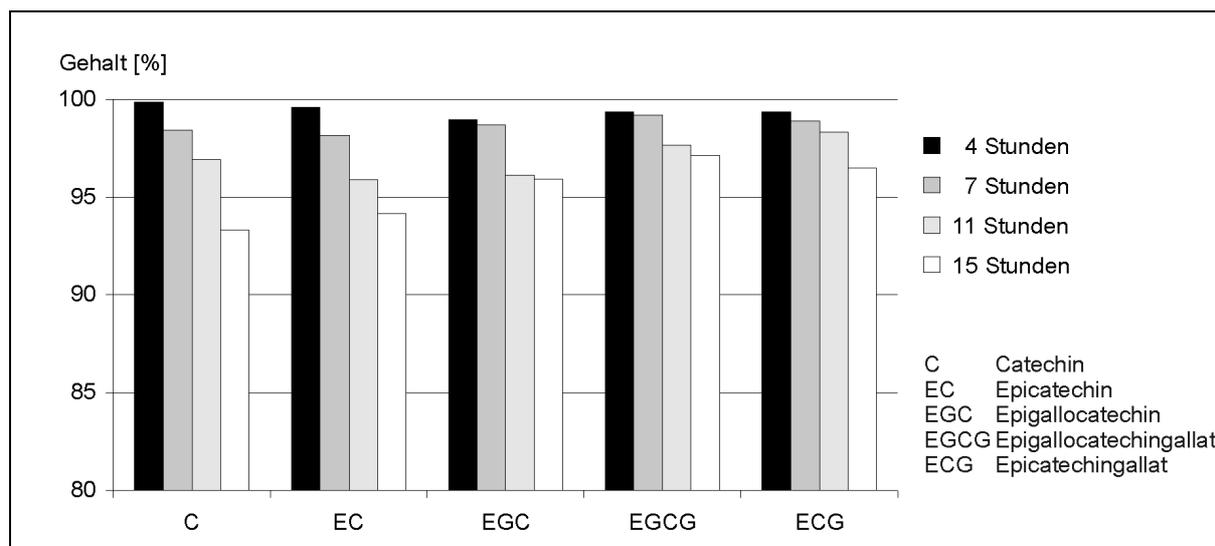


Abbildung 15 Stabilität von Catechinen in einer mit Vit C (0,2 mg/ml) stabilisierten wässrig-methanolischen Lösung bei Raumtemperatur nach 4, 7, 11 und 15 Stunden (Gehalte bezogen auf den Anfangsgehalt)

Wie in Abbildung 15 zu erkennen ist, werden für die Catechine Wiederfindungsraten von über 90 % nach 15 Stunden bei Raumtemperatur ermittelt. Durch den Zusatz von 200 µg/ml Vit C konnte demnach die Stabilität der Catechine in der Messlösung stark verbessert werden. Eine weitere Erhöhung der Vit C-Konzentration führte zu keiner erkennbaren Stabilitätsverbesserung.

Durch den Zusatz von 200 µg/ml Vit C zur Messlösung und der Verwendung von Braunglas-Vials konnte die Stabilität der oxidationsempfindlichen Catechine bei Raumtemperatur gesteigert werden, so dass nach 15 Stunden noch über 90 % der Anfangsgehalte ermittelt werden konnte. Durch die Stabilisierungsmaßnahmen wurden Voraussetzungen geschaffen, um reproduzierbare Catechin-Bestimmungen in großen Probenserien bei Raumtemperatur durchführen zu können.

Bestimmung der Catechine in Emulsionen

Die Bestimmung von Pflanzenextrakten anhand von Leitsubstanzen in kosmetischen Formulierungen erfordert eine möglichst vollständige Extraktion der Leitsubstanzen. Im Fall des grünen Tees wurde die Analytik anhand der zuvor genannten 5 Catechine durchgeführt. Zur Entwicklung einer geeigneten Extraktionsmethode wurden zunächst mit Catechinen dotierte W/O- und O/W-Emulsionen mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen extrahiert und mit der zuvor entwickelten LC/MS Methode analysiert. Die Verwendung von Tetrahydrofuran (THF), Methanol, Vit C und Wasser zeigte dabei die besten Resultate. Bei dieser Methode entfallen weitere Extraktions- und Aufreinigungsschritte, so dass die extrahierte Analytlösung ohne weitere Probenvorbereitung direkt zur LC/MS Analyse eingesetzt werden kann.

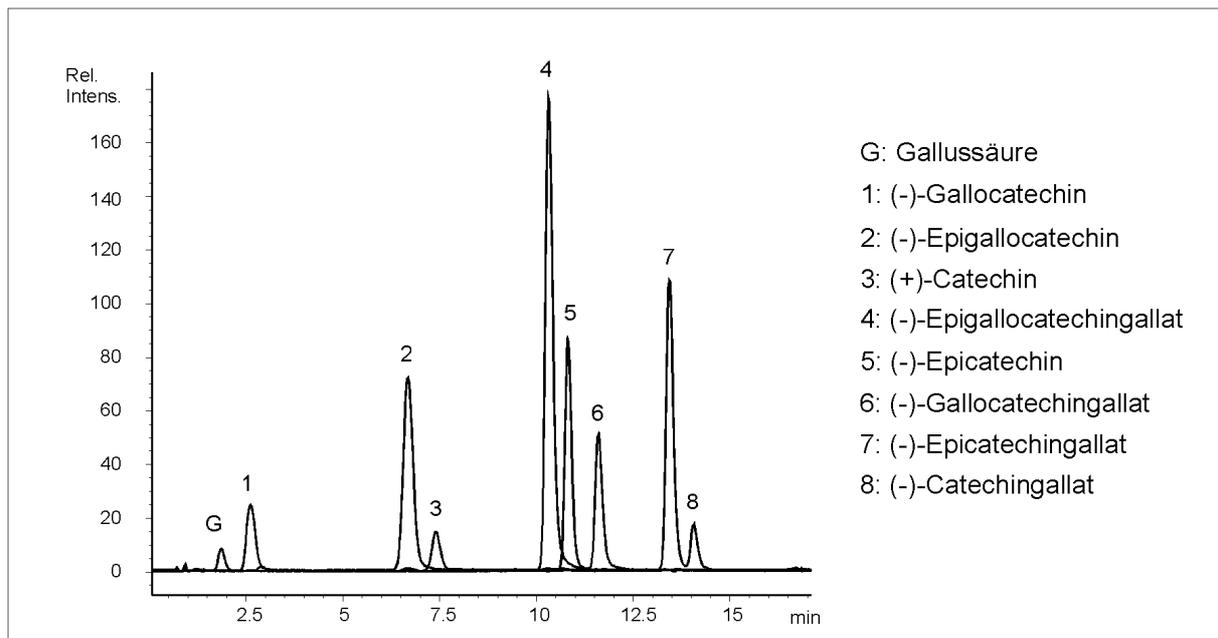


Abbildung 16 HPLC API-ES MS Trennung einer W/O-Emulsion mit 0,1 % Grüntee-Extrakt (N 27) (neg. Ionenmodus), Darstellung einzelner Massenspuren [M-H]⁻

In Abbildung 16 ist ein SIM Chromatogramm der aus einer W/O-Emulsion mit 0,1 % Grüntee-Extrakt extrahierten Catechine abgebildet. Im Chromatogramm sind die einzelnen Massenspuren im negativen Ionenmodus dargestellt. Neben 8 Catechinen konnte auch die Gallussäure in dem Extrakt der kosmetischen Formulierung nachgewiesen werden. Wie man anhand der Graphik erkennen kann, kommt es zu keiner Beeinträchtigung der chromatographischen Trennung durch mitextrahierte Matrixbestandteile. Die Elution lipophiler Matrixbestandteile von der RP-8 Säule wird durch einen Spülschritt im Gradienten der mobilen Phase ermöglicht. In gleicher Weise stellt sich die Bestimmung von Catechinen in O/W-Emulsionen mit 0,1 % Grüntee-Extrakt dar.

Bei der Bestimmung von Grüntee-Catechinen in W/O- und O/W-Emulsionen wird eine empfindliche Ionisierung erreicht, da der Elektrospray-Ionisierungsprozess in der Ionenquelle des Massenspektrometers nicht durch gleichzeitige Elution anderer Bestandteile der Extrakte negativ beeinflusst wird.

Methodenvalidierung

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden anhand von Standardlösungen mittels Peak/Rausch-Verhältnis (*signal/noise* S/N) für die einzelnen Catechine ermittelt. Die Bestimmung der Wiederfindungsraten erfolgte mit Hilfe dotierter Placebos, indem Formulierungen ohne Grüntee-Extrakt bzw. Catechine mit einer bestimmten Menge einer Catechin-Mischstandardlösung versetzt und untersucht wurden. Die relativen Standardabweichungen der Einzelmessungen wurden anhand von Formulierungen mit 0,1 % Grüntee-Extrakt bestimmt. Die Untersuchungen zur Ermittlung der Wiederfindungsraten und der Reproduzierbarkeiten wurden sowohl mit W/O- als auch mit O/W-Emulsionen durchgeführt. Die ermittelten Validierungsparameter sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4 Validierungsparameter der LC/MS Bestimmung von Grüntee-Catechinen in kosmetischen Formulierungen

	NWG [ng/ml]	BSG [ng/ml]	WFR [%]	Rel. Stabw. [%]
Catechin	5	15	105	1,25
Epicatechin	5	15	98	1,13
Epigallocatechin	10	30	105	1,72
Epigallocatechingallat	15	45	103	2,65
Epicatechingallat	10	30	102	2,22

NWG Nachweisgrenze (S/N 3:1)

BSG Bestimmungsgrenze (S/N 10:1)

WFR Wiederfindungsrate, Mittelwert O/W- und W/O-Emulsionen (n=6)

Rel. Stabw. Relative Standardabweichung, Mittelwert O/W- und W/O-Emulsionen (n=6)

Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, werden Nachweisgrenzen von 5-15 ng/ml und Bestimmungsgrenzen von 15-45 ng/ml erreicht. Die Wiederfindungsrate für Catechine in W/O- und O/W-Emulsionen beträgt im Mittel rund 100 % bezogen auf eine Mischstandardlösung ohne Matrix. Da die Probenmatrix keinen negativen Einfluss auf den Ionisierungsprozess ausübt, ist es möglich, Catechine in kosmetischen Formulierungen mittels externer Standardkalibrierung zu quantifizieren. Die Auswertung der Bestimmungen erfolgt mit Hilfe von Kalibrierreihen und den daraus ermittelten Kalibrierfunktionen. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit der Methode mit relativen Standardabweichungen von unter 5 % sind Wiederholbestimmungen nicht erforderlich.

5.1.2 Catechingehalte in pflanzlichen Rohstoffen

Mit Hilfe der beschriebenen LC/MS Methode wurden Grüntee-Extrakte unterschiedlicher Herstellungsverfahren bzw. verschiedener Hersteller auf ihre Catechin-Gehalte untersucht (vgl. Abschnitt 9.1.1). Es wurden bei dieser und den anschließenden Untersuchungen folgende 5 Leitsubstanzen bestimmt: Catechin, Epicatechin, Epigallocatechin, Epigallocatechingallat und Epicatechingallat.

Tabelle 5 Ermittelte Gehalte an Catechinen in verschiedenen Grüntee-Extrakten

Gehalte [%]	Extrakt G 1	Extrakt G 2	Extrakt G 3	Extrakt G 4
(±)-Catechin	0,7	0,2	n.	1,2
(-)-Epicatechin	3,7	1,4	n.	5,8
(-)-Epigallocatechin	5,6	4,3	0,8	16,8
(-)-Epigallocatechingallat	23,5	4,9	0,2	24,7
(-)-Epicatechingallat	7,4	0,9	n.	5,0

n. nachweisbar

Wie man in Tabelle 5 erkennt, weisen die Grüntee-Extrakte erhebliche Unterschiede in ihren Catechin-Gehalten auf. Bei den Extrakten G 1 – G 3 handelt es sich um sprühgetrocknete wässrige Extrakte von einem Rohstofflieferanten, wobei Extrakt G 1 mit Catechinen angereichert, G 2 der Gesamtextrakt und G 3 der Rückstand nach Extraktion der Catechine ist. Extrakt G 4 ist ein mit Catechinen angereicherter Grüntee-Extrakt eines anderen Lieferanten. Die Extrakte enthalten demnach je nach Herstellungsart und Rohstofflieferant einen Catechingehalt von ungefähr 1 % bis über 50 %. Da es sich bei den Grüntee-Extrakten um nicht standardisierte Rohstoffe handelt, wurden auch verschiedene Chargen des gleichen Extraktes untersucht.

Tabelle 6 Ermittelte Gehalte an Catechinen in verschiedenen Chargen des Grüntee-Extraktes G 2

Gehalte [%]	Charge 1	Charge 2	Charge 3	Charge 4
(±)-Catechin	0,2	0,2	0,3	0,4
(-)-Epicatechin	1,4	1,6	1,9	1,8
(-)-Epigallocatechin	4,3	5,4	6,1	6,0
(-)-Epigallocatechingallat	4,9	4,5	5,4	4,7
(-)-Epicatechingallat	0,9	0,9	1,2	1,0

Wie in Tabelle 6 dargestellt, weisen verschiedene Chargen des Extraktes G 2 geringe Unterschiede auf. So wurden Catechin-Gehalte von ungefähr 12 bis 15 % ermittelt, wobei die größten Schwankungen innerhalb der Chargen beim Epigallocatechin auftraten. Anhand der Untersuchungsergebnisse wird deutlich, dass eine Charakterisierung der pflanzlichen Rohstoffe bezüglich ihrer Wirkstoffgehalte erforderlich ist, um entsprechende kosmetische Formulierungen in gleichbleibender Qualität herstellen zu können.

5.1.3 Lagerstabilität in W/O-Emulsionen

Nach der Charakterisierung der pflanzlichen Rohstoffe wurde die Lagerstabilität von Grüntee-Extrakten in kosmetischen Formulierungen untersucht. Hierbei wurde eine handelsübliche W/O-Emulsion mit 0,1 % Grüntee-Extrakt G 1 hergestellt (vgl. Abschnitt 9.1.1) und für 6 Monate (Mo) bei +6 °C, +40 °C, bei Raumtemperatur und bei Raumtemperatur unter Lichteinfluss gelagert. Die Formulierungen wurden nach 1, 3 bzw. 4 und 6 Monaten Lagerung auf ihre Catechin-Gehalte untersucht. In Abbildung 17 und den darauffolgenden Abbildungen sind zur übersichtlicheren Darstellung die Gehalte der oxidationsempfindlicheren Catechine Epigallocatechin und Epigallocatechingallat sowie die der oxidationsstabileren Catechine (Catechin, Epicatechin und Epicatechingallat) zusammengefasst. Da die Proben nicht kurz nach der Herstellung untersucht wurden, sind die ermittelten Catechin-Gehalte auf die Menge im eingesetzten Extrakt bzw. den theoretischen Anfangsgehalt bezogen. Die einzelnen Messwerte sind in Abschnitt 9.3.1 angegeben.

Wie die in Abbildung 17 dargestellten Ergebnisse zeigen, unterliegen die Catechine einem starken Abbau während der Lagerung. Epigallocatechin und Epigallocatechingallat als oxidationsempfindlichere Substanzen weisen in dieser Studie erwartungsgemäß wesentlich geringere Gehalte auf als Catechin, Epicatechin und Epicatechingallat. Dieser Trend konnte über die gesamte Lagerzeit von 6 Monaten beobachtet werden. Während nach einer Lagerzeit von einem Monat bei Raumtemperatur rund 60 bzw. 30 % der Catechine aus dem eingesetzten Grüntee-Extrakt nachweisbar waren, konnten nach 6 Monaten bei +40 °C im Brutschrank nur noch Spuren nachgewiesen werden. Wie man anhand der Studie erkennt, ist eine

Stabilisierung der Catechine erforderlich, wenn die kosmetischen Mittel ohne Mindesthaltbarkeitsdatum gewerbsmäßig vertrieben werden sollen.

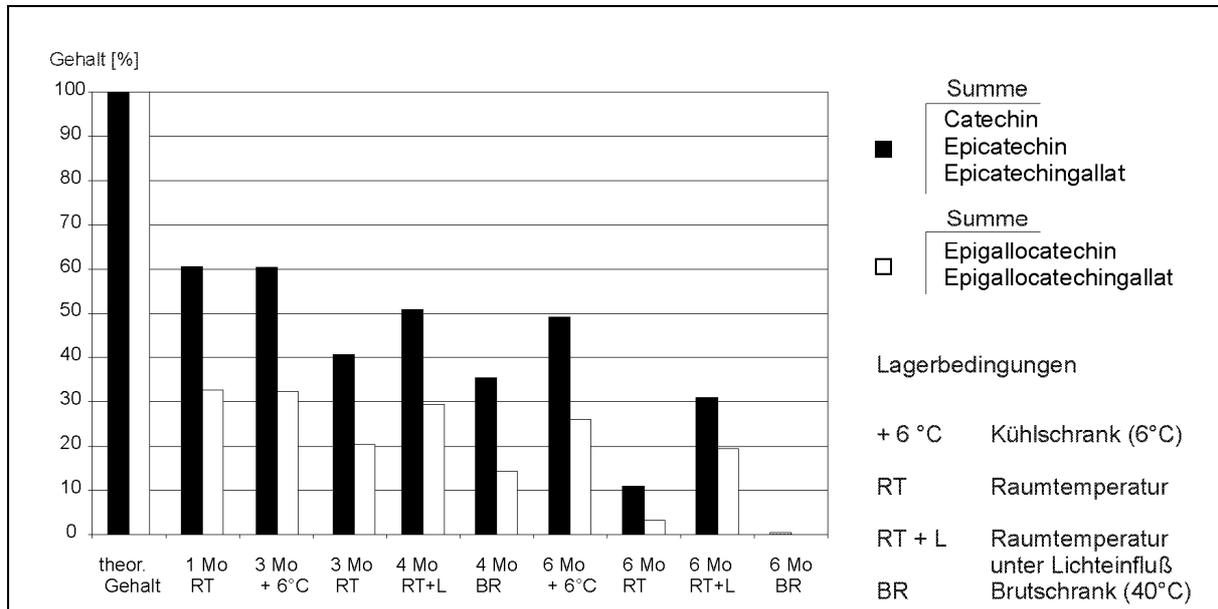


Abbildung 17 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer nicht stabilisierten W/O-Emulsion mit 0,1 % Grüntee-Extrakt (N 27) während einer Lagerzeit von 6 Monaten (Mo); der theoretische Anfangsgehalt wurde mit Hilfe des eingesetzten Grüntee-Extraktes berechnet

5.1.4 Verbesserung der Lagerstabilität in W/O-Emulsionen

Zur Verbesserung der Lagerstabilität wurde eine handelsübliche W/O-Emulsion mit 0,1 % Grüntee-Extrakt G 1 und 0,2 % Vit C versetzt, da ein Vit C-Zusatz schon bei der Stabilisierung der Messlösungen zu guten Ergebnissen geführt hat. Zum Vergleich wurde auch ein Ansatz mit 0,1 % Grüntee-Extrakt G 1 und 0,05 % BHT untersucht. Diese beiden Formulierungen wurden wiederum für 6 Monate bei +6 °C, +40 °C, bei Raumtemperatur und bei Raumtemperatur unter Lichteinfluss gelagert und in regelmäßigen Abständen auf ihre Catechin-Gehalte untersucht. In Abbildung 18 sind die Untersuchungsergebnisse der stabilisierten Emulsionen N 28 und N 31 im Vergleich mit der nicht stabilisierten Emulsion N 27 dargestellt (vgl. Abschnitt 9.1.1).

Während ein BHT-Zusatz zu einer Stabilitäts-erhöhung bei den +6 °C-, Raumtemperatur- und Raumtemperatur unter Lichteinfluss-Mustern führte, wirkt BHT bei den +40 °C-Mustern prooxidativ. Der Zusatz von 0,2 % Vit C führt dagegen während der Lagerung zu einer deutlichen Stabilitätsverbesserung im Vergleich zur nicht stabilisierten Formulierung. So waren nach einer Lagerzeit von 6 Monaten bei +40 °C noch über 30 % der eingesetzten Grüntee-Catechine in der Probe nachweisbar. Ein Vit C-Zusatz führt demnach sowohl zu einer Stabilitätsverbesserung der Catechine in Lösung als auch in der untersuchten kosmetischen Formulierung.

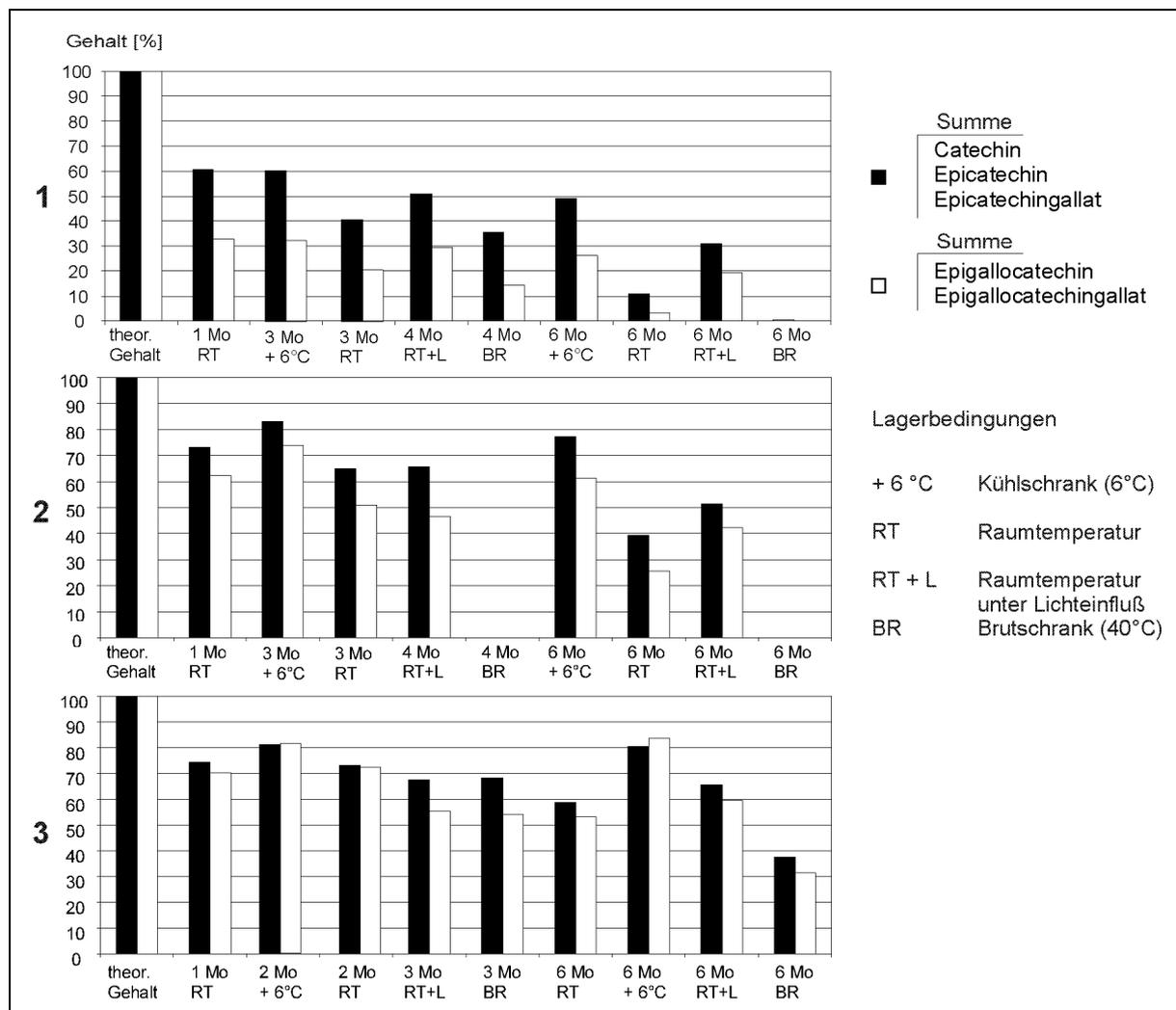


Abbildung 18 Stabilität von Grüntee-Catechinen in verschiedenen W/O-Emulsionen während einer Lagerzeit von 6 Monaten: 1. nicht stabilisiert (N 27), 2. mit BHT stabilisiert (N 28), 3. mit Vit C stabilisiert (N 31); der theoretische Anfangsgehalt wurde mit Hilfe des eingesetzten Grüntee-Extraktes berechnet

5.1.5 Lagerstabilität in O/W-Emulsionen

Wie bei den W/O-Emulsionen wurde der Zusatz von BHT und Vit C zu einer handelsüblichen O/W-Emulsion mit 0,1 % Grüntee-Extrakt G 1 und 1 % EDTA untersucht. Mit Hilfe einer dritten Formulierung wurde der Einfluss von Lichtschutzfiltern (Kombination aus UVA- und UVB-Lichtschutzfiltern) auf die Catechin-Gehalte analysiert (vgl. Abschnitt 9.1.1). Die Formulierungen wurden wiederum unter definierten Bedingungen für 6 Monate gelagert und in regelmäßigen Abständen auf ihre Catechin-Gehalte untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abbildung 19 dargestellt.

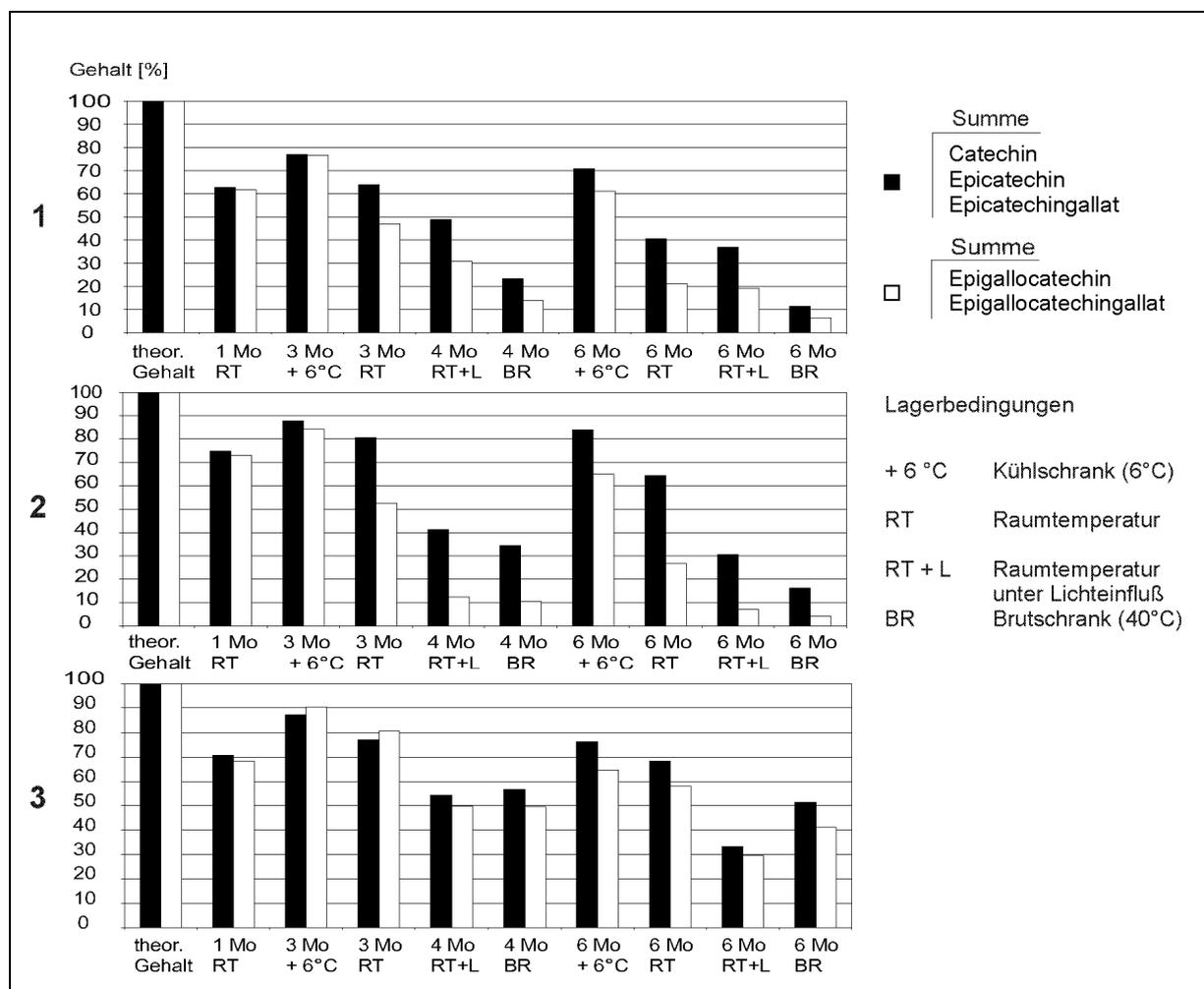


Abbildung 19 Stabilität von Grüntee-Catechinen in verschiedenen O/W-Emulsionen während einer Lagerzeit von 6 Monaten: 1. mit EDTA und Lichtschutzfiltern stabilisiert (N 24), 2. mit EDTA und BHT stabilisiert (N 30), 3. mit EDTA und Vit C stabilisiert (N 29); der theoretische Anfangsgehalt wurde mit Hilfe des eingesetzten Grüntee-Extraktes berechnet

Wie man beim Vergleich der Ergebnisse erkennt, weist die mit Vit C versetzte Formulierung N 29 wesentlich höhere Grüntee-Catechin-Gehalte auf als die mit Lichtschutzfiltern (N 24) und BHT (N 30) versetzten Formulierungen. Während in den Proben mit Vit C-Zusatz Catechin-Gehalte von mehr als 40 % nach 6 Monaten Lagerung bei +40 °C ermittelt wurden, enthielten die beiden anderen Formulierungen im Durchschnitt nur noch ungefähr 10 % Catechine. Die bei Raumtemperatur gelagerte Probe mit Vit C enthielt nach 6 Monaten noch fast 60 % der oxidationsempfindlichen Verbindungen Epigallocatechin und Epigallocatechingallat. So führt ein Zusatz von 0,2 % Vit C sowohl bei den untersuchten W/O-Emulsionen als auch bei den O/W-Emulsionen zu einer Stabilitätserhöhung der Grüntee-Catechine während einer definierten Lagerung über 6 Monate.

5.1.6 Einfluss der Ascorbinsäure-Konzentration auf die Lagerstabilität von Emulsionen

Um den Einfluss der Vit C-Konzentration auf die Lagerstabilität der Grüntee-Catechine näher zu betrachten, wurden handelsübliche W/O- und O/W-Emulsionen mit 0,1 % Grüntee-Extrakt G 2 und verschiedenen Konzentrationen an Vit C untersucht. Es wurden jeweils 4 Formulierungen mit 0,2, 0,4 und 0,6 % Vit C sowie eine Referenzformulierung ohne Vit C hergestellt (vgl. Abschnitt 9.1.1). Um einen Einschluss von Luftsauerstoff in der Formulierung und einen damit verbundenen inhomogenen Abbau der Grüntee-Catechine zu vermeiden, wurden die Formulierungen unter Stickstoffbegasung hergestellt. In Abbildung 20 sind die Stabilitäten der Grüntee-Catechine in den W/O-Emulsionen dargestellt.

Während bei dem Referenzmuster E 26 nach 6 Monaten nur in der bei +6 °C gelagerten Probe Catechine nachweisbar waren, führte der Vit C-Zusatz wiederum zu einer deutlichen Stabilitätserhöhung. Eine Erhöhung der Vit C-Konzentration von 0,2 % auf 0,4 % und 0,6 % verbesserte die Stabilität der Catechine jedoch nicht. Eine Erhöhung der Vit C-Konzentration von 0,2 auf 0,6 % führte bei den Formulierungen nach 6 Monaten Lagerung bei +40 °C sogar zu einer Verringerung der Catechin-Gehalte von 40 % auf ca. 30 % der eingesetzten Menge.

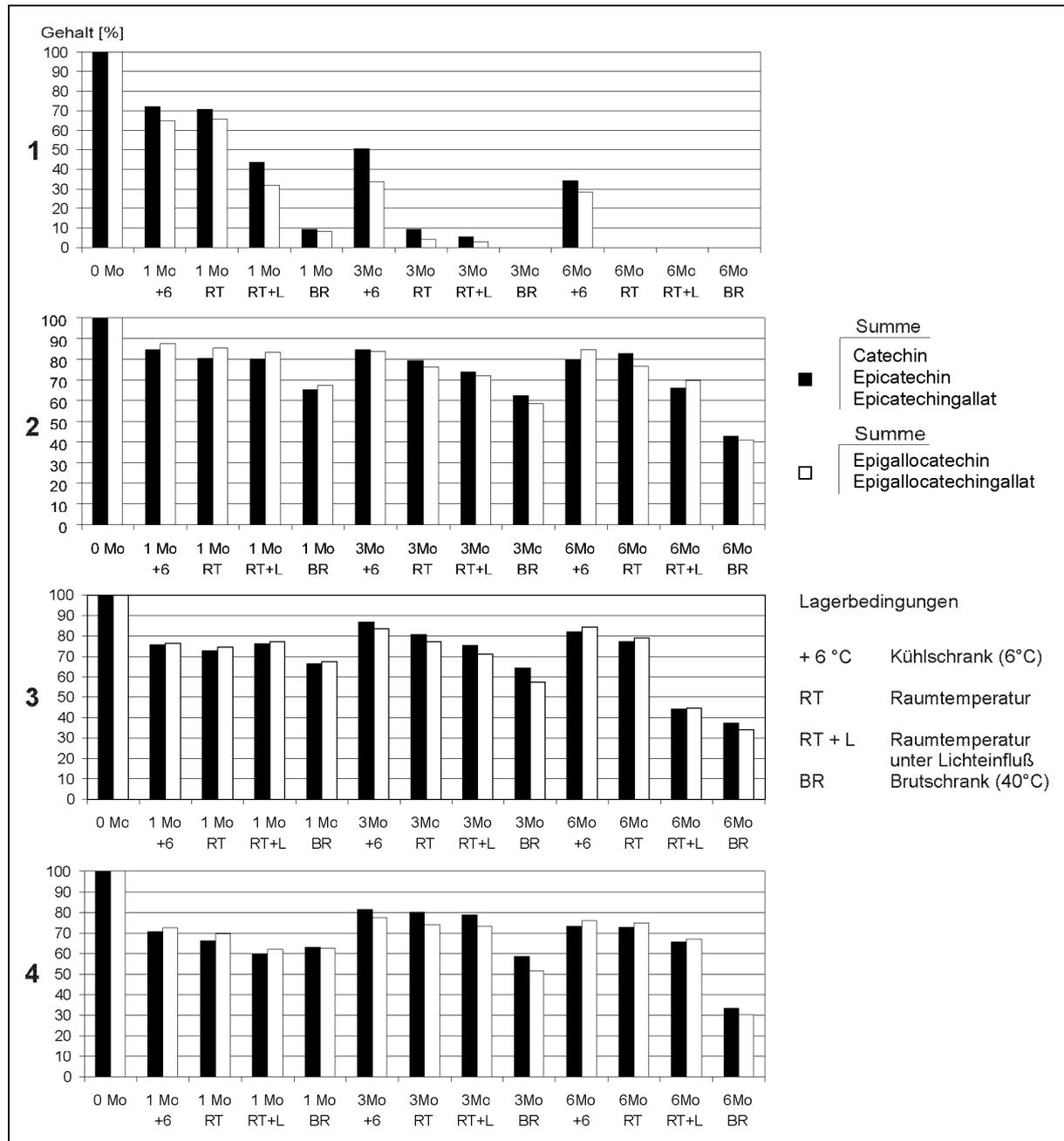


Abbildung 20 Stabilität von Grüntee-Catechinen in verschiedenen W/O-Emulsionen während einer Lagerzeit von 6 Monaten: 1. nicht stabilisiert (E 26), 2. mit 0,2 % Vit C stabilisiert (E 27), 3. mit 0,4 % Vit C stabilisiert (E 29), 4. mit 0,6 % Vit C stabilisiert (E 30)

In gleicher Art und Weise wurden die O/W-Emulsionen mit 0,1 % Grüntee-Extrakt G 2 nach definierter Lagerung auf ihre Catechin-Gehalte untersucht (vgl. Abschnitt 9.1.1). In Abbildung 21 sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe dargestellt.

Eine Erhöhung der Vit C-Konzentration von 0,2 auf 0,4 % führte zu einer geringen Stabilitätsverbesserung der untersuchten Catechine, wobei eine weitere Erhöhung

der Konzentration auf 0,6 % lediglich bei dem Lichtmuster geringe Auswirkungen zeigte. In der Formulierung E 24 mit 0,4 % Vit C konnten nach 6 Monaten Lagerung Catechin-Gehalte von ungefähr 80 % der eingesetzten Menge bei Raumtemperatur bzw. 60 % bei +40 °C ermittelt werden.

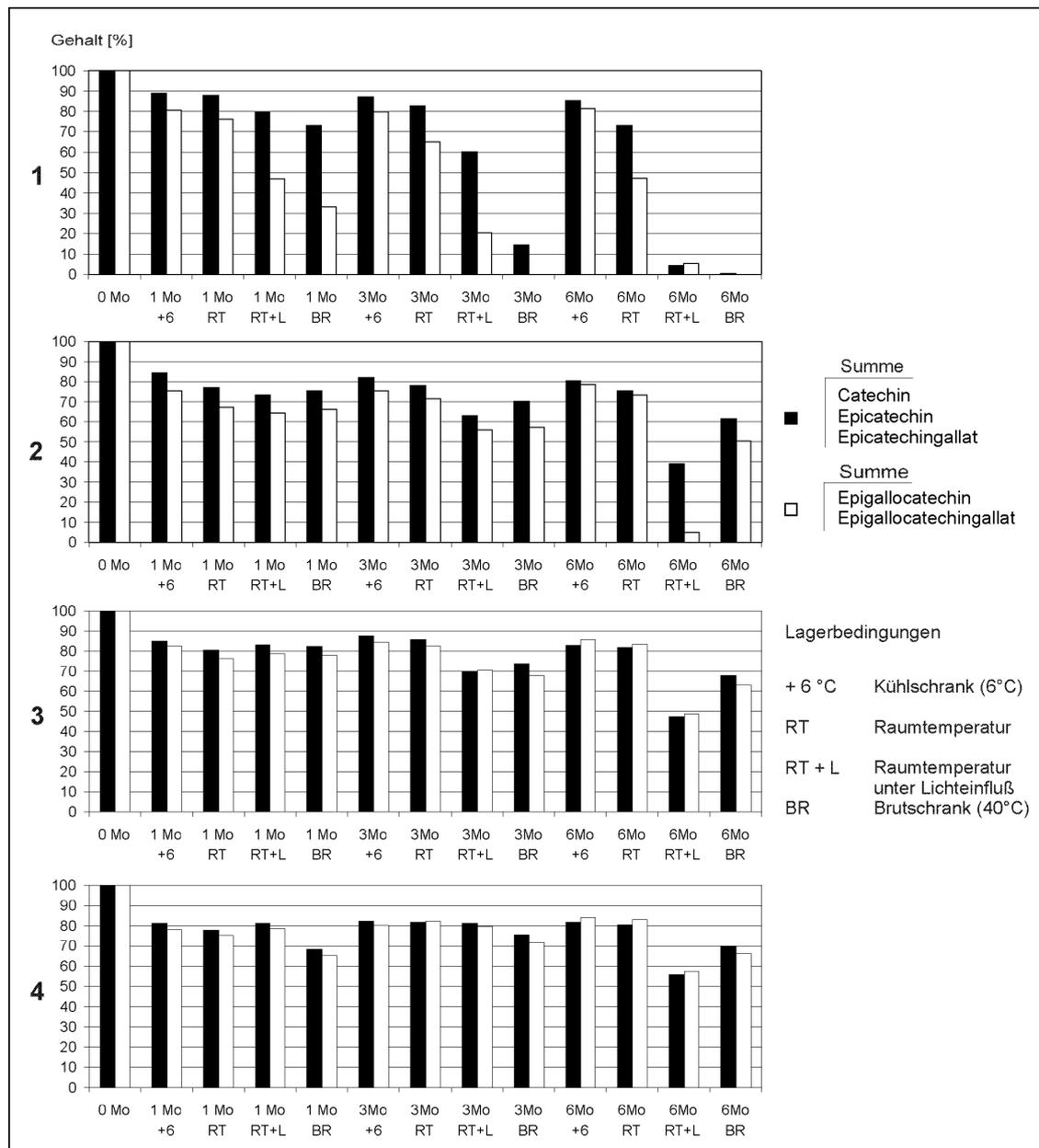


Abbildung 21 Stabilität von Grüntee-Catechinen in verschiedenen O/W-Emulsionen während einer Lagerzeit von 6 Monaten: 1. mit EDTA stabilisiert (E 32), 2. mit EDTA und 0,2 % Vit C stabilisiert (E 21), 3. mit EDTA und 0,4 % Vit C stabilisiert (E 24), 4. mit EDTA und 0,6 % Vit C stabilisiert (E 25)

Aus den Untersuchungsergebnissen geht hervor, dass ein Vit C-Zusatz von 0,2 bzw. 0,4 % zu einer deutlichen Verbesserung der Lagerstabilität von Grüntee-Catechinen in den untersuchten W/O- und O/W-Emulsionen führt. Eine Erhöhung der Vit C-Konzentration auf 0,6 % bewirkte keine weitere Stabilitätsverbesserung der Catechine.

5.1.7 Ascorbinsäure-Gehalte in den Emulsionen

Nach einer Lagerzeit von 6 Monaten wurden die O/W- und W/O-Emulsionen auf ihren noch vorhandenen Vit C-Gehalt untersucht. Die Bestimmung erfolgte nach wässriger Extraktion mittels HPLC und UV-Detektion (vgl. Abschnitt 9.2.2). In Abbildung 22 sind die Catechin-Gehalte in den Emulsionen graphisch dargestellt.

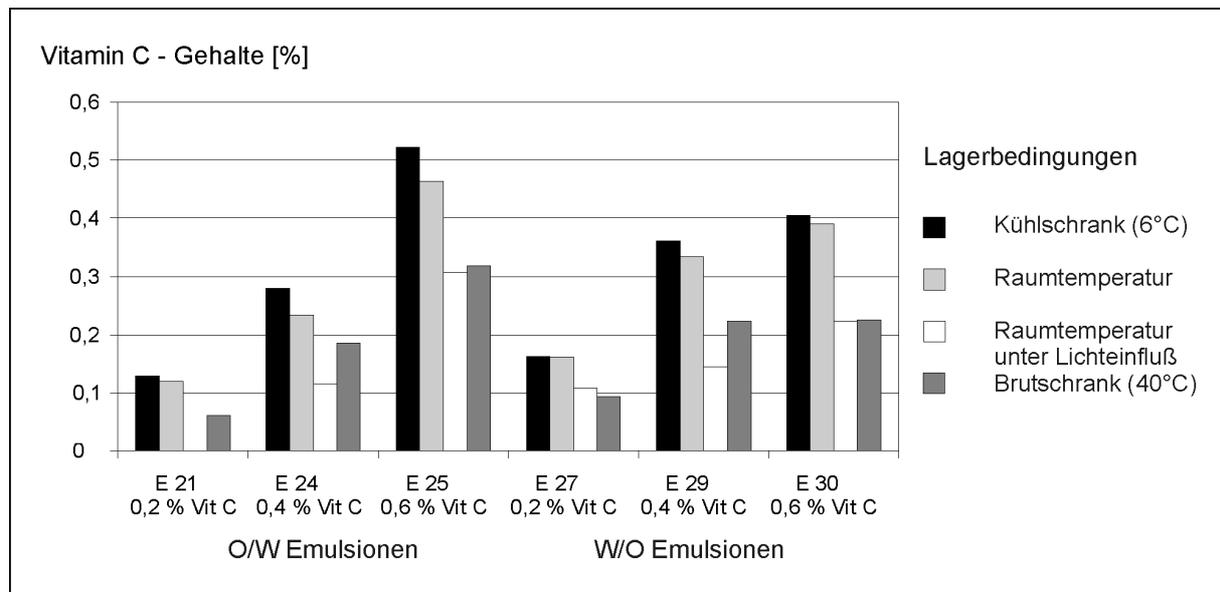


Abbildung 22 Vit C-Gehalte [%] in Emulsionen mit 0,1 % Grüntee-Extrakt und unterschiedlichen Vit C-Zusätzen nach einer Lagerzeit von 6 Monaten

Mit Ausnahme des Lichtmusters der O/W-Emulsion E 21 enthielten alle untersuchten Proben nach 6 monatiger Lagerung noch Vit C. In den O/W-Emulsionen wurden während der Lagerung bei +6 °C und Raumtemperatur ungefähr 0,1 bis 0,2 % Vit C abgebaut, so dass auch in den Proben der Formulierungen E 21 noch die Hälfte der eingesetzten 0,2 % nachgewiesen werden konnte. Vergleicht man die Vit C-Gehalte in den Lichtmustern der Emulsionen E 21 und E 24 mit den Catechin-Gehalten derselben Formulierungen, zeigt sich eine gute Korrelation zwischen dem Vit C-Gehalt

und der Stabilität der Grüntee-Catechine. Gerade die O/W-Emulsion E 21, in der nach 6 Monaten Lagerung unter Lichteinfluss kein Vit C mehr nachgewiesen werden konnte, enthielt weniger als 10 % der ursprünglichen Menge an den oxidationsempfindlichen Verbindungen Epigallocatechin und Epigallocatechingallat. Bei den W/O-Emulsionen wurde in allen Proben 0,1 % und mehr Vit C bestimmt. Im Gegensatz zu den O/W-Emulsionen konnte in allen W/O-Emulsionen mit Vit C-Zusatz nach 6 Monaten noch mindestens 30 % der eingesetzten Grüntee-Catechine nachgewiesen werden. Vergleicht man die Vit C-Gehalte der Emulsionen E 25 und E 30, zeigt sich ein höherer Abbau in den W/O-Emulsionen.

5.1.8 Penetrationseigenschaften von *Camellia sinensis*-Extrakten

Die Penetrationseigenschaft von Grüntee-Extrakten wurde mit Hilfe eines in vitro Schweinehautmodells anhand von Leitsubstanzen untersucht (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.2). Nach Applikation einer O/W-Emulsion mit 3 % Grüntee-Extrakt (Formulierung E 31, vgl. Abschnitt 9.1.1) und einer Penetrationsdauer von 20 Stunden wurden die einzelnen Hautschichten mit Hilfe der LC/MS Methode auf Gehalte an Catechinen untersucht. Die Angabe der Ergebnisse erfolgt in Abbildung 23 als Mittelwerte (n=4) mit den berechneten Vertrauensbereichen der Mittelwerte (Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %). Die jeweils applizierte Menge an Grüntee-Catechinen entspricht einem Gehalt von 100 %.

Die Leitsubstanzen zeigen auf der Oberfläche, in der Hornschicht und Epidermis ähnliche Penetrationseigenschaften. Von den applizierten Catechinen verblieben 20 bis 28 % auf der Oberfläche, 26 bis 43 % penetrierten in die Hornschicht und ca. 1 bis 3 % in die lebenden Zellschichten der Epidermis. In der Dermis waren nur Epigallocatechin und Epicatechin in geringen Spuren nachweisbar, während in der Rezeptorphase keine Catechine detektiert wurden. Ca. 50 bis 70 % der applizierten Catechine wurden nach der Penetrationsstudie wiedergefunden, wobei die oxidationsempfindlicheren Verbindungen Epigallocatechin und Epigallocatechingallat erwartungsgemäß die geringsten Wiederfindungsraten aufwiesen. Die ermittelten Wiederfindungsraten können dadurch erklärt werden, dass die Formulierung kein stabilisierendes Vit C enthielt und daher auch die oxidationsempfindlicheren Verbindungen stärker abgebauten.

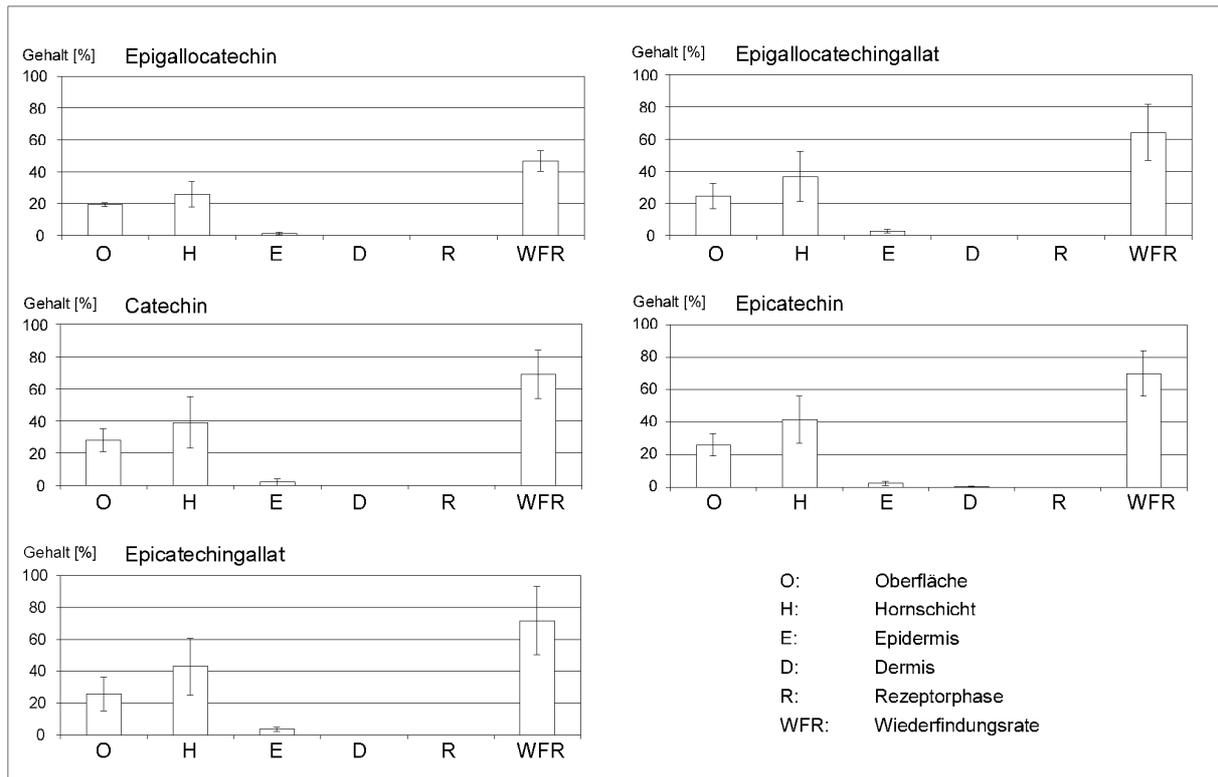


Abbildung 23 Ergebnisse der in vitro Penetrationsstudie; Verteilung von Grüntee-Catechinen auf bzw. in der Haut

Anhand der Penetrationsstudie konnte gezeigt werden, dass die Grüntee-Catechine nach topischer Applikation in die Haut penetrieren und in analytisch messbaren Gehalten bis in die lebenden Zellschichten vordringen. Weiterhin konnten in der Rezeptorphase keine unveränderten Wirkstoffe nachgewiesen werden, d. h. die Studie gibt keine Hinweise auf eine perkutane Absorption der Catechine.

5.2 Calendula officinalis

5.2.1 Analytik

Präparative Dünnschichtchromatographie (DC) der Faradiolester

Die Bestimmung von Calendula CO₂-Extrakt in kosmetischen Formulierungen erfolgte anhand der Faradiolester als kosmetisch wirksame Leitsubstanzen. Da keine Referenzsubstanzen kommerziell erhältlich waren, wurden die Faradiolester aus dem ausgewählten Extrakt isoliert und anschließend charakterisiert. Dazu wurde der Calendula CO₂-Extrakt mittels präparativer DC auf Kieselgelplatten aufgetrennt [63] (vgl. Abschnitt 9.2.3). Das Trennprinzip beruht dabei auf den hydrophilen Wechselwirkungen der freien Silanolgruppen des Kieselgels mit polaren Gruppen der Faradiolester. Die Detektion der DC-Platten wurde in zwei Schritten durchgeführt, wobei die Platten zuerst unter UV-Licht betrachtet wurden. Im zweiten Schritt erfolgte die Detektion mit einem Anisaldehyd-Sprühreagenz (vgl. Abschnitt 9.4.1). Da dieses eine Zerstörung der Faradiolester-Moleküle bewirkt, wurde nur ein kleiner Teil der Platte auf diese Weise detektiert. In Abbildung 24 ist eine DC-Trennung des Calendula CO₂-Extraktes dargestellt.

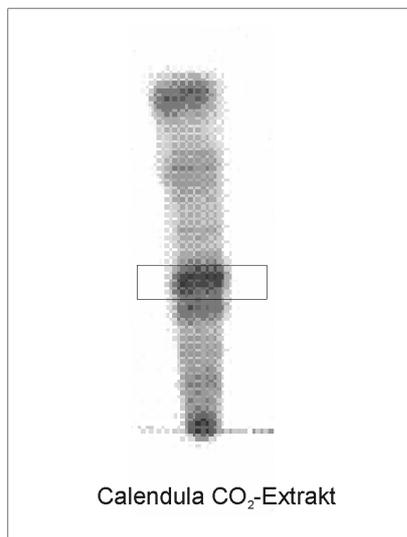


Abbildung 24 DC-Trennung eines Calendula-Extraktes nach Detektion mit Anisaldehyd-Sprühreagenz. Zur Isolierung der Faradiolester wurde die gekennzeichnete Fläche ausgekratzt und mittels semipräparativer HPLC weiter fraktioniert

Zur weiteren Isolierung der Faradiolester wurden die einzelnen, nicht besprühten Banden ausgekratzt und anschließend mit Chloroform extrahiert. Chloroform ermöglicht die Elution/Extraktion der Faradiolester, verhindert aber gleichzeitig, dass größere Mengen an Kieselgel mitgelöst werden. Gelöstes Kieselgel würde als nicht flüchtiger Bestandteil Probleme bei der anschließenden LC/MS Analyse ergeben. In

dem Extrakt der markierten Bande (Abbildung 24) konnten mittels LC/MS Faradiolaurat, -myristat und -palmitat identifiziert werden.

Semipräparative HPLC

Der Extrakt der markierten DC-Bande wurde zur Isolierung der einzelnen Faradiolester mittels semipräparativer HPLC weiter fraktioniert (vgl. Abschnitt 9.2.3). Hierbei wurde eine semipräparative *reversed-phase* Trennsäule mit 8 mm Innendurchmesser bei einer Flußrate von 3 ml/min verwendet. Als stationäre Phase wurde modifiziertes Kieselgel (RP-18, *encapsulated*) gewählt. Der Trennmechanismus beruht hier hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen des alkylierten Kieselgels in der Trennsäule mit den unpolaren Alkylketten der Faradiolester, wodurch eine Auftrennung nach Kettenlänge möglich ist. Als Eluent kam ein wasserfreier Methanol (incl. 2 mM NH₄Ac)-tert-Butylmethylether-Gradient zur Anwendung [124]. Ein Zusatz von Ammoniumacetat fördert die Ionisierung der unpolaren Faradiolester in der verwendeten Electrospray-Ionenquelle durch Ladungsübertragungen während des Ionisierungsprozesses. Zur Online-Detektion der eluierten Verbindungen erfolgte eine Flußteilung des Eluenten, wobei 0,2 ml/min in das Massenspektrometer und 2,8 ml/min in den Fraktionssammler geleitet wurden. In Abbildung 25 ist ein Totalionenstrom Chromatogramm der extrahierten DC-Bande mit einem Scanbereich von 500 bis 800 amu dargestellt. Die Massenspektren der drei gekennzeichneten Faradiolester-Peaks sind im unteren Teil der Graphik abgebildet.

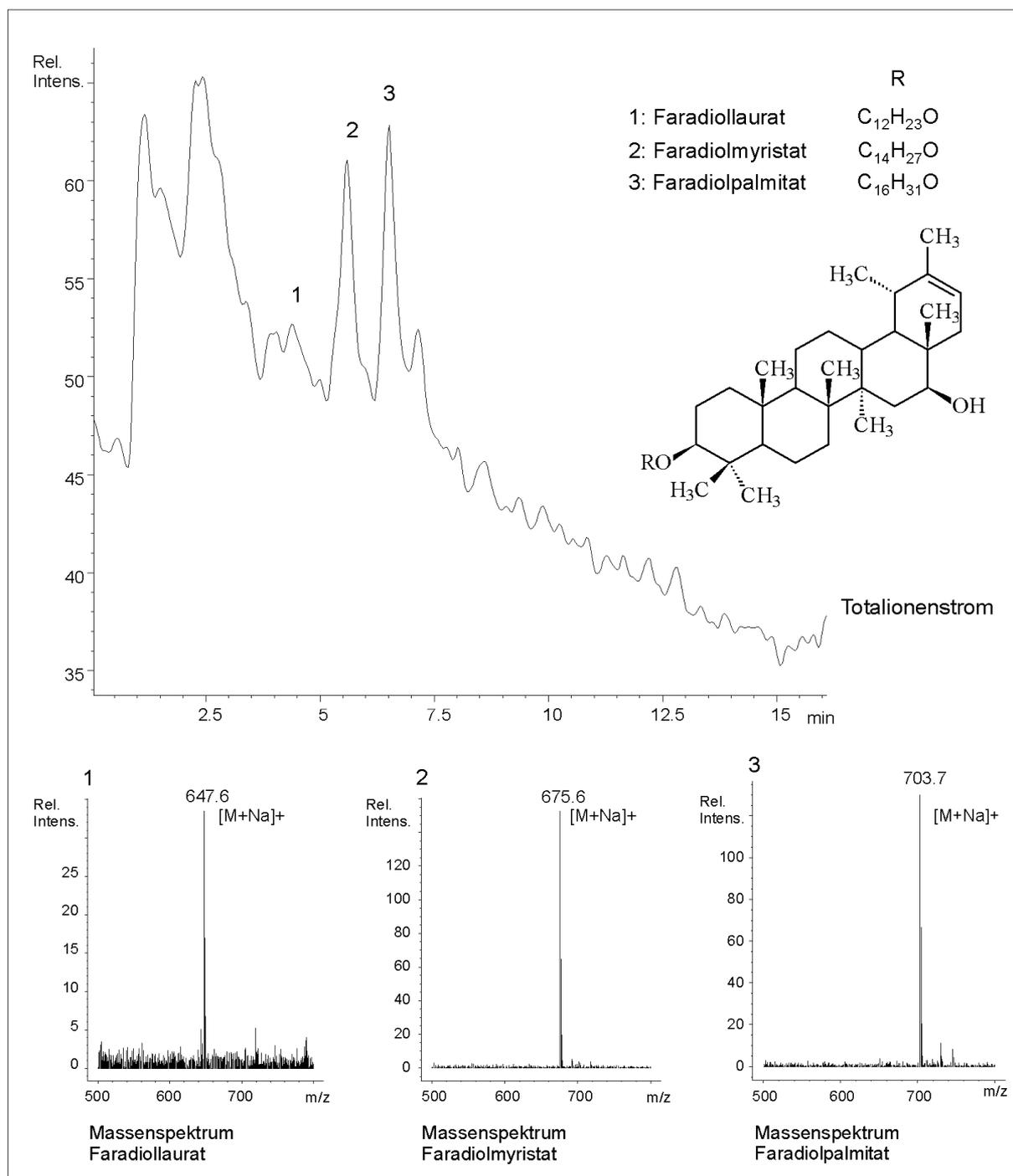


Abbildung 25 Semipräparative HPLC API-ES MS Trennung der ausgekratzten und extrahierten DC-Banden (pos. Ionenmodus), Darstellung des Totalionenstroms (Scan 500-800 amu) und der Massenspektren der Faradiolester-Peaks

Im positiven Ionenmodus werden die Faradiolester massenspektrometrisch als [M+Na]⁺ dargestellt. Es konnten Faradiollaurat, Faradiolmyristat und Faradiolpalmitat von anderen Bestandteilen des Extraktes abgetrennt werden. Mit Hilfe eines Fraktionssammlers wurde der Eluent aufgefangen, um die so aufgereinigten

Faradiolester zu charakterisieren. Um eine ausreichende Menge an isoliertem Probenmaterial zu erhalten, wurden Fraktionen von mehreren semipräparativen HPLC-Läufen gesammelt. Auf diese Weise konnten bis zu 3 mg der Faradiolester isoliert werden, wobei die Ausbeute an Faradiollaurat aufgrund des geringen Gehaltes in dem Calendula CO₂-Extrakt geringer ausfiel.

MS/MS-Fragmentierungsexperimente

Zur Charakterisierung der isolierten Faradiolester wurden Electrospray-Ionenfallen MS/MS-Fragmentierungsexperimente durchgeführt (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.3). Bei diesen Fragmentierungsexperimenten wurden zunächst die $[M+Na]^+$ Ionen in der Ionenfalle isoliert und anschließend selektiv mit einer Amplitude von 0,75 V fragmentiert. In Abbildung 26 sind die Fragmentspektren der drei Faradiolester dargestellt.

Im positiven Ionenmodus entstehen zwei Gruppen von Fragmenten: der Triterpengrundkörper (447,3 amu), der für alle drei Faradiolester charakteristisch ist, sowie die jeweilige estergebundene Fettsäure. Die Fettsäuren werden als $[M+Na]^+$ ionisiert; die erhaltenen Signale lassen sich Laurin-, Myristin- und Palmitinsäure zuordnen. Die Fragmentspektren ermöglichen so zwar die Identifizierung der jeweiligen Fettsäure, erlauben darüber hinaus aber keine komplette Identifizierung des Triterpengrundkörpers.

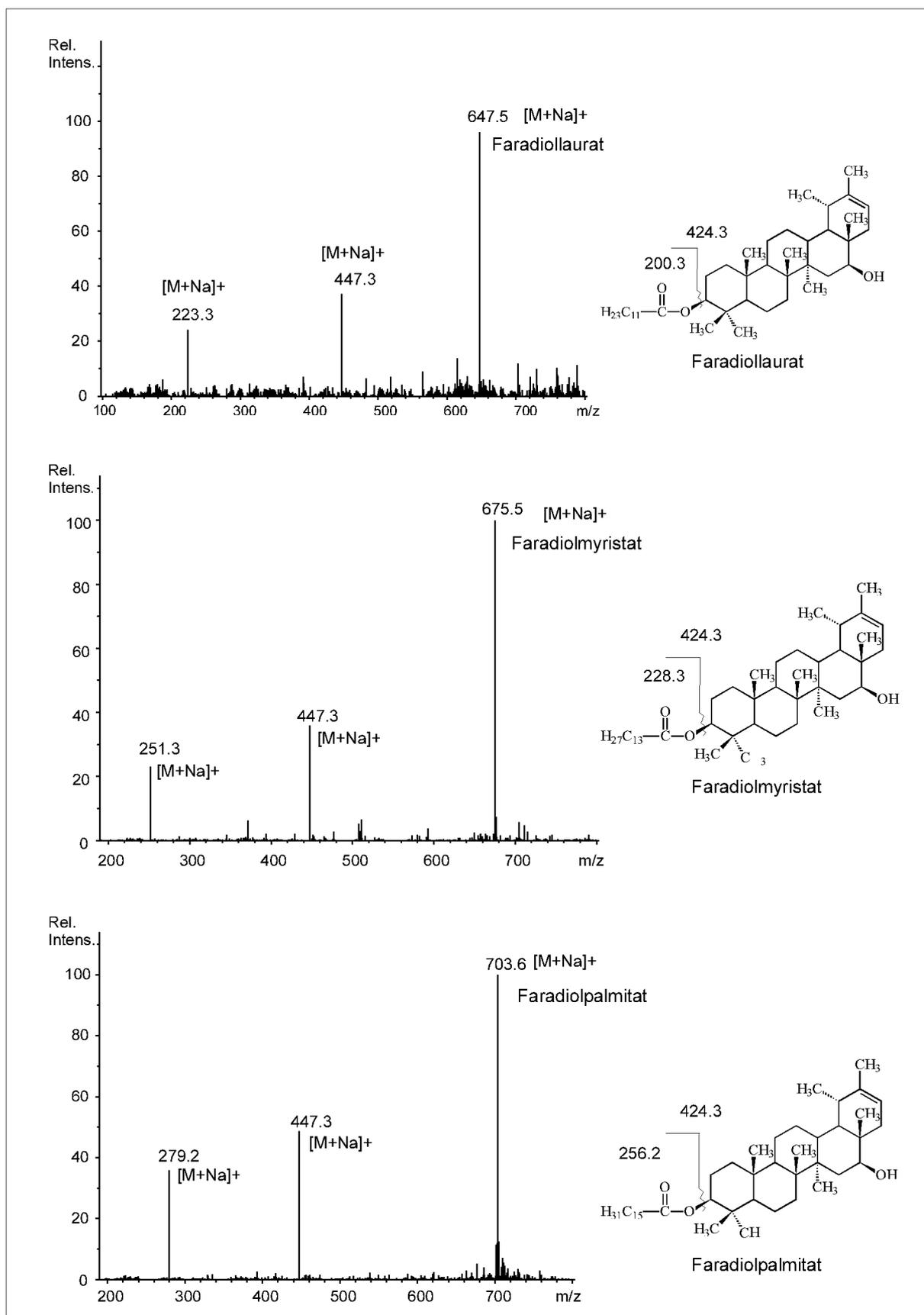


Abbildung 26 API-ES MS/MS Fragmentierungsexperimente von isolierten Faradiolestern (pos. Ionenmodus)

NMR-spektroskopische Untersuchungen

Die Charakterisierung der Triterpengrundkörper wurde mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Untersuchungen vorgenommen (vgl. Abschnitt 9.2.1). Beispielfür die drei Faradiolester wurde von isoliertem Faradiolmyristat ein ^{13}C -NMR-Spektrum aufgenommen. Die ^{13}C -Zuordnung der einzelnen Signale ist in Tabelle 7 angegeben.

Tabelle 7 Ergebnis der ^{13}C -NMR-Untersuchung von isoliertem Faradiolmyristat

Signal	Verschiebung [ppm] (CDCl_3 , TMS)
CH_3 -Signale	11,6; 16,0; 16,4 (2 Signale); 16,6; 21,5; 22,4, 28,0
CH_2 -Signale	18,2; 21,5; 23,7; 27,2; 34,9; 36,5; 37,6; 38,4
CH-Signale	35,9; 38,7; 47,5; 49,9; 55,4
C-Signale	37,0; 37,8; 39,9, 41,1, 42,5
COR-Signale	76,4; 80,5
C=C-Signale	139,7 (C-20); 118,3 (C-21)
Fettsäurerest	14,1 (CH_3); 22,7; 31,9; 29,2-29,7; 25,0; 34,1; 173,7 (COO)

Die in der Tabelle aufgeführten Ergebnisse zeigen gute Übereinstimmungen mit Untersuchungen von Zitterl-Eglseer et al., die Strukturuntersuchungen an isolierten Faradiolestern mittels NMR-Spektroskopie durchführten [63].

Photometrische Untersuchungen

Mit Hilfe eines Dioden-Array Detektors wurden UV-Spektren der isolierten Faradiolester aufgenommen (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.3). Die in Abbildung 27 dargestellten UV-Spektren sind durch ein Maximum um 280 nm gekennzeichnet. Das UV-Maximum bei 205-210 nm ist auf das verwendete Lösungsmittelgemisch Methanol/tert-Butylmethylether zurückzuführen. Wie man anhand der Abbildung erkennt, ist eine Identifizierung bzw. Differenzierung der einzelnen Faradiolester mittels UV-Spektrometrie nicht möglich.

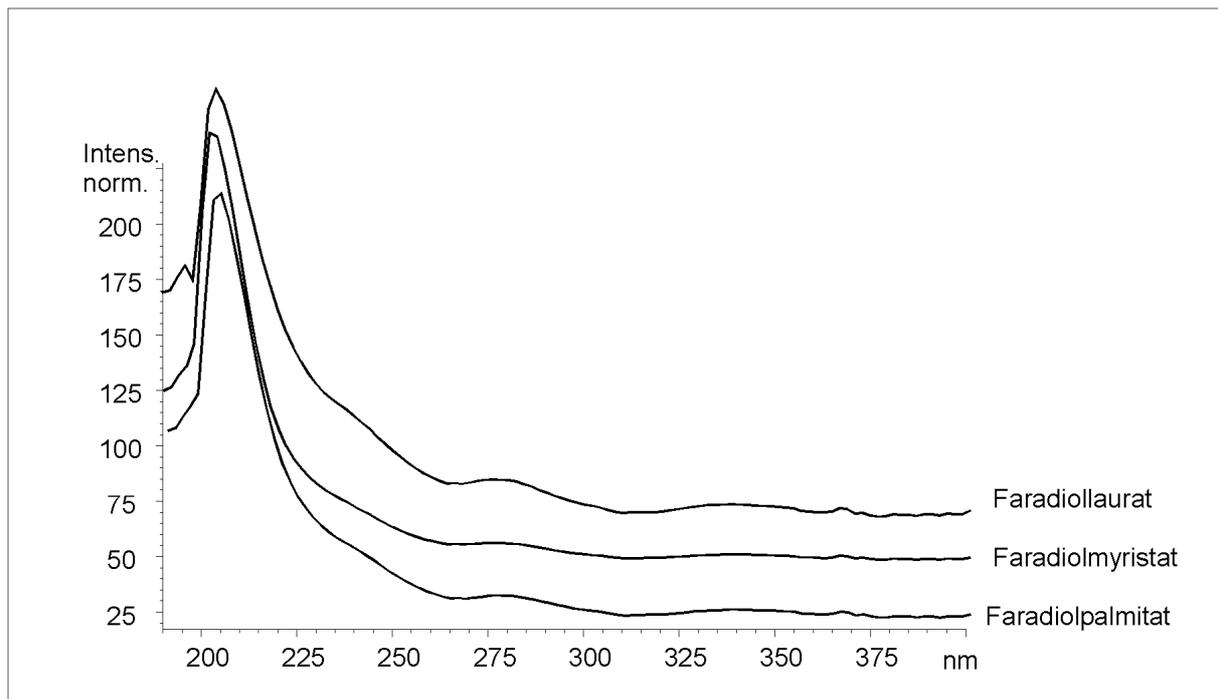


Abbildung 27 UV-Spektren von isolierten Faradiolestern

Kopplung LC/MS

Nach der Charakterisierung der isolierten Faradiolester mit unterschiedlichen Techniken wurde anschließend eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Faradiolester mit Hilfe der Kopplung Flüssigchromatographie und API-ES Quadrupol Massenspektrometrie entwickelt. Die Entwicklung der Methode wurde anhand von Einzel- und Mischstandardlösungen der isolierten Faradiolester durchgeführt (vgl. Abschnitt 9.2.3). Zur chromatographischen Trennung wurde das gleiche Trennsystem (RP-18, *encapsulated*) wie bei der semipräparativen HPLC verwendet. Um eine Überlastung der Ionenquelle bzw. eine Flußteilung des Eluenten zu vermeiden, wurde im Gegensatz zur semipräparativen HPLC eine Trennsäule mit 2 mm Innendurchmesser bei einer Flußrate von 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ gewählt. Als Eluent kam wiederum ein wasserfreier Methanol (incl. 2 mM NH_4Ac)-tert-Butylmethylether-Gradient zur Anwendung. Die einzelnen Parameter zur Ionisierung und zum Ionentransfer innerhalb des Massenspektrometers wurden mittels FIA-Experimenten optimiert. Mit 20 psi als Sprühgas und 7 l/min Trockengasstrom wurden für den wasserfreien Eluenten entsprechend geringe Stickstoff-Gasströme gewählt. Im positiven Ionenmodus werden die Analyten bei einer Kapillarspannung von -4000 V ionisiert und mit

einer Fragmentorspannung von 200 V analysiert (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.3). In Abbildung 28 ist ein SIM Chromatogramm einer Faradiolester-Mischstandardlösung abgebildet. Die einzelnen Verbindungen sind jeweils mit ihren Massenspuren $[M+Na]^+$ dargestellt.

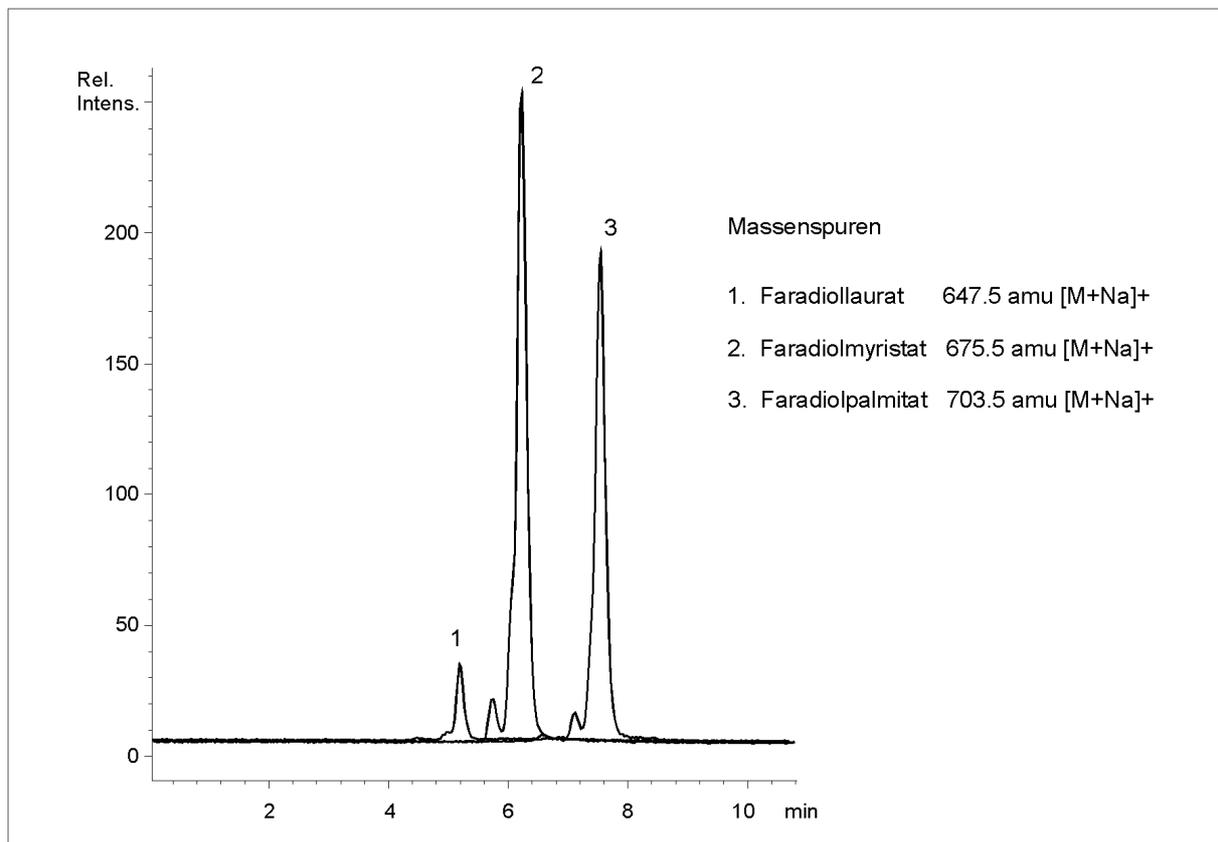


Abbildung 28 HPLC API-ES MS Trennung von isolierten Faradioleestern (pos. Ionenmodus), Darstellung einzelner Massenspuren $[M+Na]^+$

Mit dem chromatographischen System lassen sich die drei Faradiolester nach ihrer Fettsäure-Kettenlänge trennen, wobei Faradiollaurat als polarste Verbindung zuerst eluiert. In Verbindung mit der massenselektiven Detektion ist die Bestimmung von Faradiollaurat, -myristat und -palmitat möglich.

Da keine ausreichenden Mengen an isolierten Referenzverbindungen vorhanden waren, konnten die Faradiolester nicht mit Hilfe von Kalibrierstandardlösungen bestimmt werden. Um dieses Problem zu umgehen, erfolgte in den nachfolgenden Untersuchungen die Bestimmung der Calendula-Extrakte in den kosmetischen Formulierungen anhand des eingesetzten Calendula CO_2 -Extraktes. Als Leitsubstanzen

zur externen Standardkalibrierung dienten Faradiolmyristat und Faradiolpalmitat. Aufgrund des geringen Gehaltes in dem verwendeten Extrakt wurde auf die Bestimmung von Faradiollaurat als Leitsubstanz verzichtet.

Bestimmung des Extraktes in Emulsionen

Zur Entwicklung einer geeigneten Extraktionsmethode wurden zunächst drei handelsübliche O/W-Emulsionen mit unterschiedlichen Fett- und Wassergehalten mit jeweils 0,1 % Calendula-Extrakt (E 35, 37, 41, vgl. Abschnitt 9.1.2) versetzt, mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen extrahiert und mit der LC/MS Methode analysiert (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.3). Die Wiederfindungsraten wurden mit Hilfe einer 0,1 % igen Lösung des gleichen Calendula-Extraktes ermittelt. Durch die Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus Methanol/tert-Butylmethylether (4:1, v:v) wurde eine vollständige Extraktion der Faradiolester erreicht. In Abbildung 29 sind SIM Chromatogramme der drei O/W-Emulsionen mit 0,1 % Calendula CO₂-Extrakt abgebildet. In den Chromatogrammen sind die Massenspuren der beiden Faradiolester dargestellt.

Durch mitextrahierte Matrixbestandteile kommt es zu einer unterschiedlich starken Beeinflussung der chromatographischen Trennung. Durch die Verwendung des relativ unpolaren Lösungsmittelgemisches werden auch eine Vielzahl von lipophilen Inhaltsstoffen der kosmetischen Formulierungen extrahiert, welche zur gleichen Zeit von der Trennsäule eluieren wie die Faradiolester. Um den Einfluß extrahierter lipophiler Matrixbestandteile auf den Electrospray-Ionisierungsprozeß zu ermitteln, wurden Placebo-Formulierungen nach dem Extraktionsschritt mit 0,1 % Calendula-Extrakt versetzt und mittels LC/MS analysiert. Anhand von Wiederfindungsraten konnte gezeigt werden, dass die Ionisierung der Faradiolester durch gleichzeitige Elution von Emulsionsbestandteilen stark beeinflusst wird. Auch die Verwendung anderer Lösungsmittel wie Chloroform, Tetrahydrofuran und Hexan führte zu keiner Verringerung der Matrixbelastung bei vollständiger Extraktion der Faradiolester. Um die Matrixbelastungen bei der Bestimmung von Calendula-Extrakt in kosmetischen Formulierungen zu berücksichtigen, ist daher eine externe Matrixkalibrierung mit den entsprechenden Placebos erforderlich.

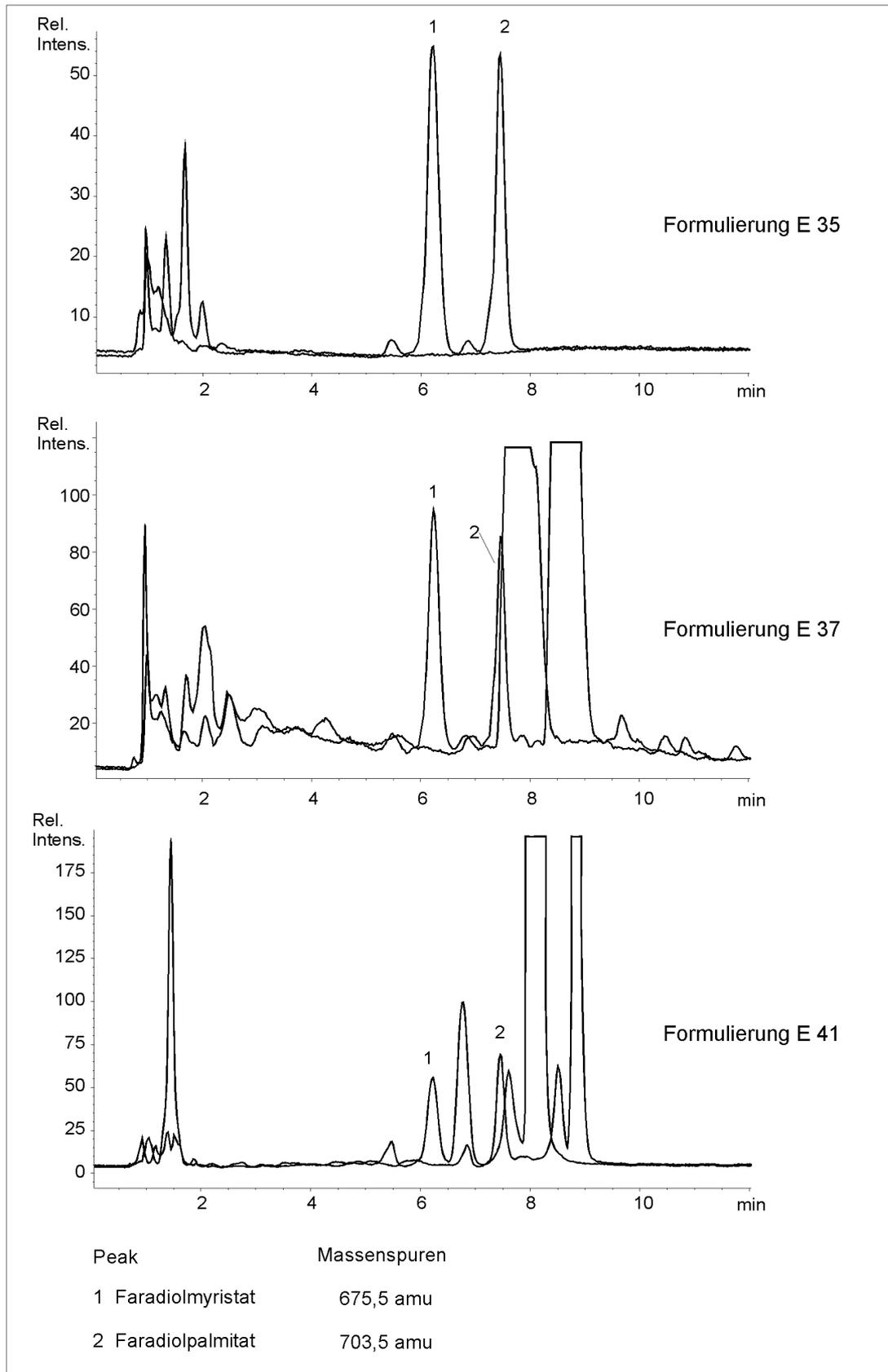


Abbildung 29 HPLC API-ES MS Trennung von 3 unterschiedlichen O/W-Emulsionen mit jeweils 0,1 % Calendula CO₂-Extrakt (pos. Ionenmodus). Darstellung einzelner Massenspuren [M+Na]⁺

Methodenvalidierung

Zur Ermittlung der Validierungsdaten wurden Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie Wiederfindungsrate und Reproduzierbarkeit der Methode untersucht. Hierzu wurden die Daten der beiden Leitsubstanzen Faradiolmyristat und –palmitat zusammengefasst. Die Bestimmung der Wiederfindungsrate erfolgte mit Hilfe dotierter Placebos, indem mit und ohne Matrixkalibrierung quantifiziert wurde. Die relative Standardabweichung wurde mittels Wiederholbestimmungen von Formulierungen mit 0,1 % Calendula-Extrakt ermittelt. Die Validierungsparameter der Methode sind in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8 Validierungsparameter der LC/MS Bestimmung von Calendula-Extrakt in kosmetischen Formulierungen

Formulierung	WFR I [%]	WFR II [%]	Rel. Stabw. [%]
E 35	145	99	3,0
E 37	30	103	2,5
E 41	20	103	3,2

WFR I Wiederfindungsrate ohne Matrixkalibrierung, Mittelwert der Leitsubstanzen Faradiolmyristat und Faradiolpalmitat (n=5)

WFR II Wiederfindungsrate mit Matrixkalibrierung, Mittelwert der Leitsubstanzen Faradiolmyristat und Faradiolpalmitat (n=5)

Rel. Stabw. Relative Standardabweichung, Mittelwert der Leitsubstanzen Faradiolmyristat und Faradiolpalmitat (n=5)

Wie man anhand der Wiederfindungsrate ohne Matrixkalibrierung erkennt, hat die Matrix einen großen Einfluss auf den Ionisierungsprozeß. Daher ist es erforderlich, Calendula-Extrakte in den untersuchten kosmetischen Formulierungen mittels externer Matrixkalibrierung zu quantifizieren. Eine Wiederfindungsrate mit Matrixkalibrierung von rund 100 % weist auf eine vollständige Extraktion der Faradiolester aus den Formulierungen hin. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit der Methode mit einer relativen Standardabweichung von unter 5 % sind Wiederholbestimmungen bei der Untersuchung der Lagerstabilitäten nicht erforderlich. Mit Hilfe der LC/MS Methode werden Nachweisgrenzen (S/N 3:1) von 0,1 µg/ml und Bestimmungsgrenzen (S/N 10:1) von 0,5 µg/ml Calendula CO₂-Extrakt erreicht. Bei der Bestimmung in einer kosmetischen Matrix liegen die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Formulierungen E 37 und E 41 jedoch ca. um ein 10-faches höher.

5.2.2 Lagerstabilität in O/W-Emulsionen

Mit Hilfe der LC/MS Methode wurde die Lagerstabilität von Calendula-Extrakten in kosmetischen Formulierungen untersucht. Hierbei wurden zwei handelsübliche O/W-Emulsionen mit 0,1 % Calendula CO₂-Extrakt hergestellt (vgl. Abschnitt 9.1.2) und für 6 Monate bei +6 °C, +40 °C, bei Raumtemperatur und Raumtemperatur unter Lichteinfluss gelagert. Die Formulierungen wurden direkt nach der Herstellung sowie nach 1, 3 und 6 Monaten Lagerung auf ihre Calendula-Extrakt-Gehalte untersucht, wobei Faradiolmyristat und Faradiolpalmitat als Leitsubstanzen dienten. In Abbildung 30 sind die Untersuchungsergebnisse dieser Studie dargestellt. Die Angabe der einzelnen Gehalte erfolgt als Mittelwert der beiden Leitsubstanzen.

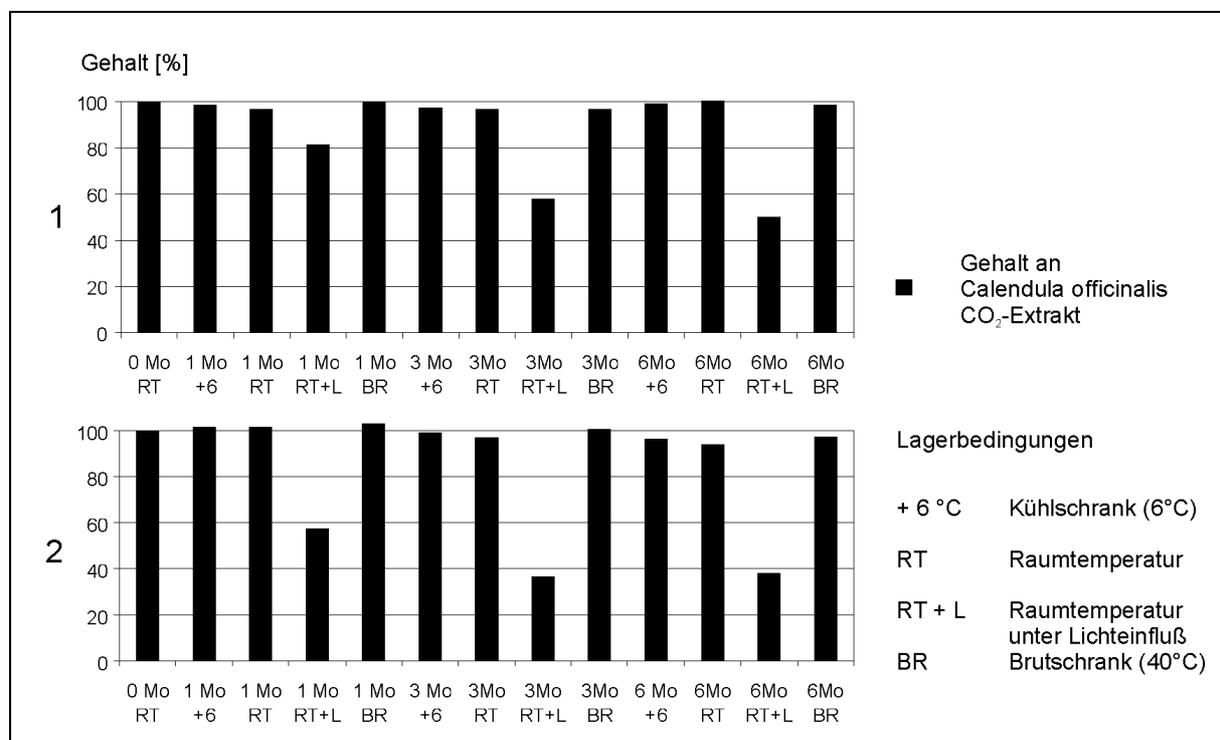


Abbildung 30 Stabilität von Calendula CO₂-Extrakt (Leitsubstanzen: Faradiolmyristat und Faradiolpalmitat) in verschiedenen O/W-Emulsionen während einer Lagerzeit von 6 Monaten: 1. Formulation E 35, 2. Formulation E 41

Der verwendete Calendula-Extrakt weist in beiden Formulierungen eine hohe Lagerstabilität auf, sofern die Proben unter Lichtausschluss bei +6 °C, +40 °C und bei Raumtemperatur gelagert werden. Nur unter Einfluss von Sonnenlicht kommt es zu einem deutlichen Abbau innerhalb der 6 monatigen Lagerung. Während in der Formulation E 35 nach 6 Monaten noch rund 50 % des Anfangsgehaltes nachgewiesen werden konnte, waren es in der Formulation E 41 trotz Zusatz von

6 % Lichtschutzfiltern (UV-A und UV-B Filter) weniger als 40 %. Weiterhin war in den Lichtmustern ein deutlicher Farbstoffabbau zu verzeichnen, während die unter Lichtausschluss gelagerten Proben keine Farbveränderungen zeigten.

5.2.3 Verbesserung der Lagerstabilität in O/W-Emulsionen

Zur Verbesserung der Lagerstabilität unter Lichteinfluss wurde eine handelsübliche O/W-Emulsion mit 0,1 % Calendula-Extrakt zum einen mit 0,5 % Tocopherolacetat und zum anderen mit 0,5 % Tocopherolacetat und 0,05 % BHT versetzt (vgl. Abschnitt 9.1.2). Tocopherolacetat und BHT wurden gewählt, da es sich hierbei um unpolare Antioxidantien handelt, die in einer Vielzahl von kosmetischen Produkten zur Stabilisierung eingesetzt werden. Zum Vergleich wurde auch eine nicht stabilisierte Formulierung hergestellt. Diese drei Formulierungen wurden ebenfalls für 6 Monate bei +6 °C, +40 °C, Raumtemperatur und Raumtemperatur unter Lichteinfluss gelagert und in regelmäßigen Abständen untersucht. In Abbildung 31 sind die Untersuchungsergebnisse der stabilisierten Emulsionen E 38 und E 39 im Vergleich zu der nicht stabilisierten Emulsion E 37 dargestellt.

Die bei Dunkelheit gelagerten Proben weisen eine gute Stabilität innerhalb einer Lagerzeit von 6 Monaten auf. Beim Vergleich der Lichtmuster der drei Formulierungen wird deutlich, dass ein Zusatz von Antioxidantien zur Verbesserung der Lagerstabilität der Faradiolester beiträgt. Während in der nicht stabilisierten Formulierung E 37 nach 6 Monaten Gehalte von 50 % des Anfangsgehaltes ermittelt wurden, konnten die Gehalte durch Zusatz von Tocopherolacetat auf über 60 % und durch Zusatz von Tocopherolacetat und BHT auf fast 80 % gesteigert werden.

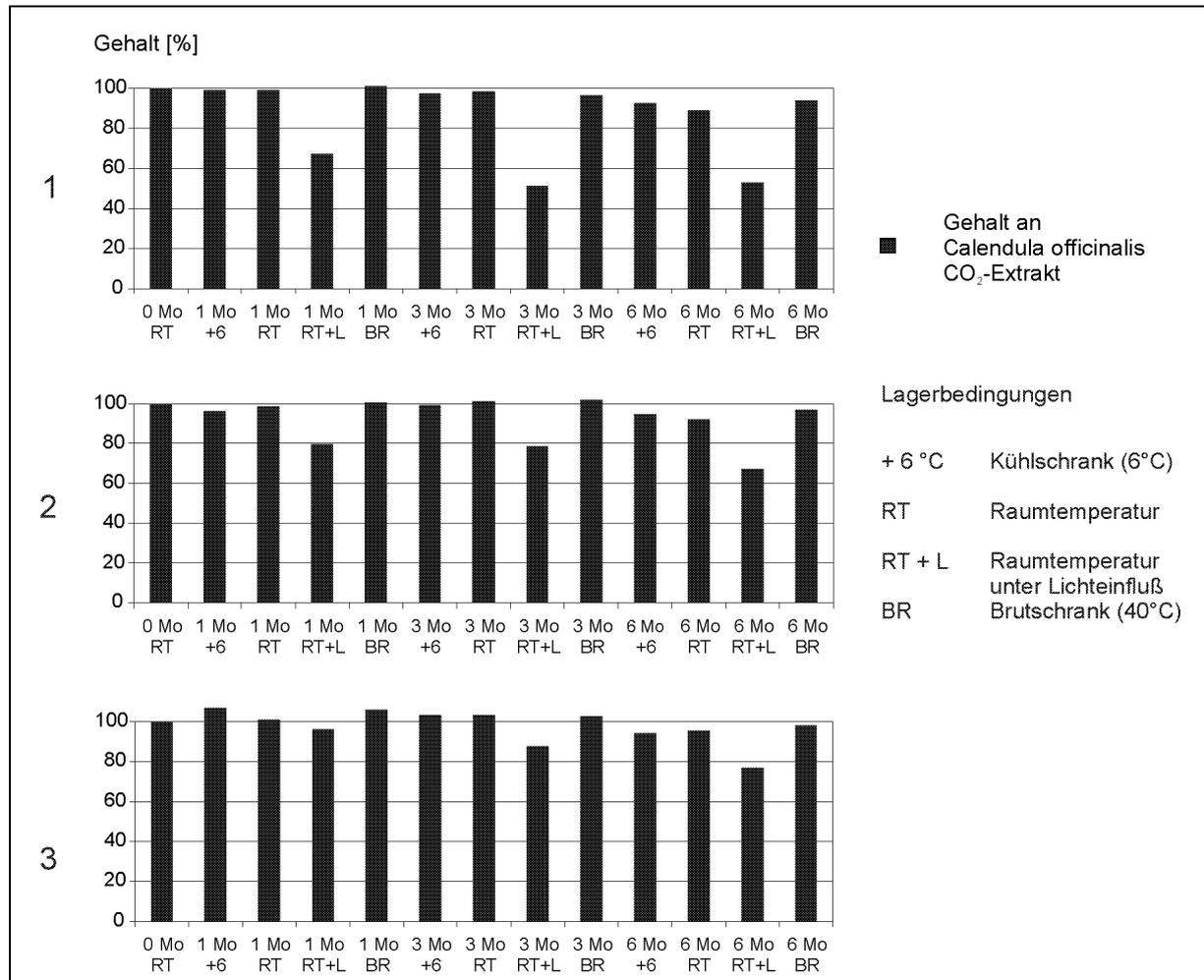


Abbildung 31 Stabilität von Calendula CO₂-Extrakt (Leitsubstanzen: Faradiolmyristat und Faradiolpalmitat) in verschiedenen O/W-Emulsionen mit 0,1 % Calendula CO₂-Extrakt während einer Lagerzeit von 6 Monaten: 1. nicht stabilisiert (E 37), 2. mit Tocopherolacetat stabilisiert (E 38), 3. mit Tocopherolacetat und BHT stabilisiert (E 39)

5.2.4 Penetrationseigenschaften von Calendula officinalis-Extrakten

Die Penetrationseigenschaft des Calendula CO₂-Extraktes wurde mit Hilfe des in vitro Schweinehautmodells anhand der Leitsubstanzen Faradiolmyristat und Faradiolpalmitat untersucht (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.3). Ungefähr 20 mg einer O/W-Emulsion mit 3 % Calendula-Extrakt (Formulierung D 7, vgl. Abschnitt 9.1.2) wurden jeweils auf die Schweinehautscheiben appliziert. Nach einer Penetrationsdauer von 20 Stunden wurden die einzelnen Hautschichten mit der LC/MS Methode analysiert. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer externen Standardkalibrierung unter Verwendung des eingesetzten Calendula-Extraktes. Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse dieser Penetrationsstudie, wobei die Gehalte die Mittelwerte einer

Doppelbestimmung darstellen. Die berechneten Vertrauensbereiche der Mittelwerte sind ebenfalls in der Graphik angegeben.

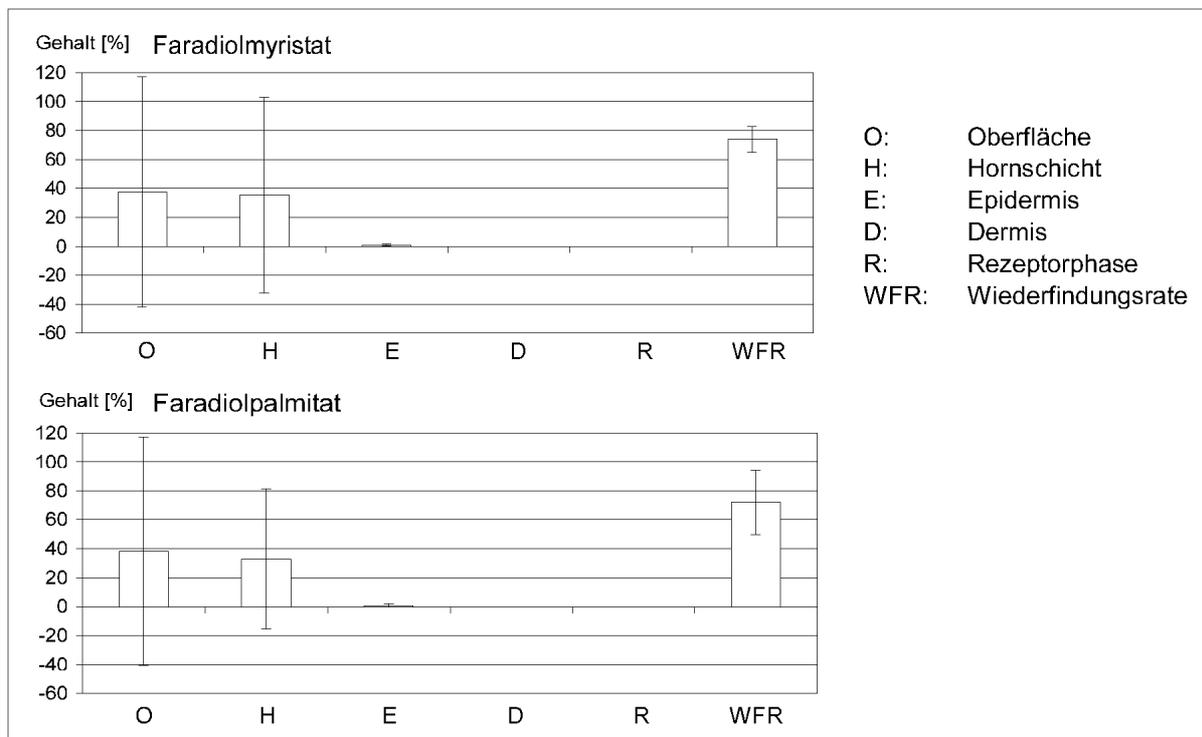


Abbildung 32 Ergebnisse der in vitro Penetrationsstudie, Verteilung von Calendula CO₂-Extrakt auf bzw. in der Haut (Leitsubstanzen: Faradiolmyristat und Faradiolpalmitat)

Die beiden untersuchten Faradiolester verhalten sich hinsichtlich ihres Penetrationsverhaltens vergleichbar. Über 70 % des applizierten Calendula-Extraktes wurde nach Abschluss der Penetrationsuntersuchungen wiedergefunden. Ungefähr jeweils die Hälfte des wiedergefundenen Calendula-Extraktes konnte auf der Oberfläche und in der Hornschicht nachgewiesen werden. In der Epidermis wurden nur Spuren (< 1 %) gefunden, während in der Dermis und Rezeptorphase keine Faradiolester nachgewiesen wurden. Um den Abbau der Faradiolester während der Penetrationsstudie zu untersuchen, wurde eine Faradiolester-Mischstandardlösung bei Raumtemperatur gelagert und nach 24 Stunden analysiert. Ein Einfluss von Luftsauerstoff auf die Stabilität von Faradiolestern wurde nicht beobachtet. Eine Metabolisierung (z. B. Esterspaltung) durch hauteigene Enzyme kann nicht ausgeschlossen werden.

Anhand der Penetrationsstudie konnte gezeigt werden, dass Faradiolester als kosmetisch wirksame Inhaltsstoffe nach topischer Applikation zu einem geringen Teil in

die tieferen Hautschichten (Epidermis) penetrieren. Weiterhin konnten in der Rezeptorphase keine unveränderten Wirkstoffe nachgewiesen werden, d. h. die Studie gibt keine Hinweise auf eine perkutane Absorption der Faradiolester.

5.3 Glycyrrhiza glabra

5.3.1 Analytik

Photometrische Untersuchungen

Die Bestimmung von Süßholzwurzel-Extrakt erfolgte anhand der Leitsubstanzen Glycyrrhizinsäure und 18 β -Glycyrrhetinsäure. Zur Charakterisierung dieser pflanzlichen Wirkstoffe wurden zunächst UV-Spektren von Referenzsubstanzen aufgenommen (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.4). In Abbildung 33 sind die UV-Spektren von wässrig-methanolischen Glycyrrhizin- und 18 β -Glycyrrhetinsäure-Lösungen dargestellt.

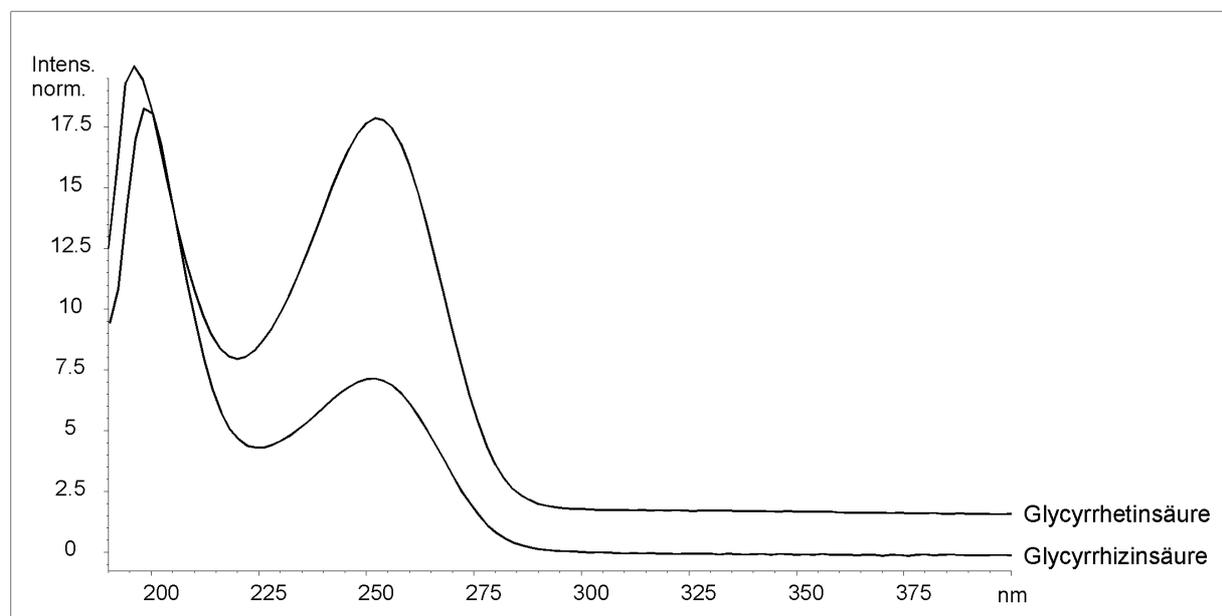


Abbildung 33 UV-Spektren von Glycyrrhizinsäure und 18 β -Glycyrrhetinsäure

Die UV-Spektren sind durch spezifische Maxima um 255 nm gekennzeichnet und entsprechen damit den in der Literatur angegebenen Daten [133]. Die Maxima um 200 nm sind auf das Lösungsmittel zurückzuführen. Wie man anhand der Abbildung erkennt, ist eine Differenzierung der beiden Verbindungen mittels UV-Spektren nicht möglich.

Massenspektrometrische Untersuchungen

Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung dieser Leitsubstanzen bietet die Technik der API-ES Massenspektrometrie. Die Parameter zur Ionisierung und zum Ionen-transfer innerhalb des Quadrupol-Massenspektrometers wurden anhand von wässrig-methanolischen Lösungen der beiden Substanzen im FIA-Modus optimiert (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.4). Glycyrrhizin- und 18 β -Glycyrrhetinsäure werden im negativen Ionenmodus bei einer Kapillarspannung von 4000 V ionisiert. Die optimierte Fragmentorspannung für beide Leitsubstanzen beträgt 190 V. In Abbildung 34 sind die API-ES Massenspektren von Glycyrrhizin- und 18 β -Glycyrrhetinsäure dargestellt.

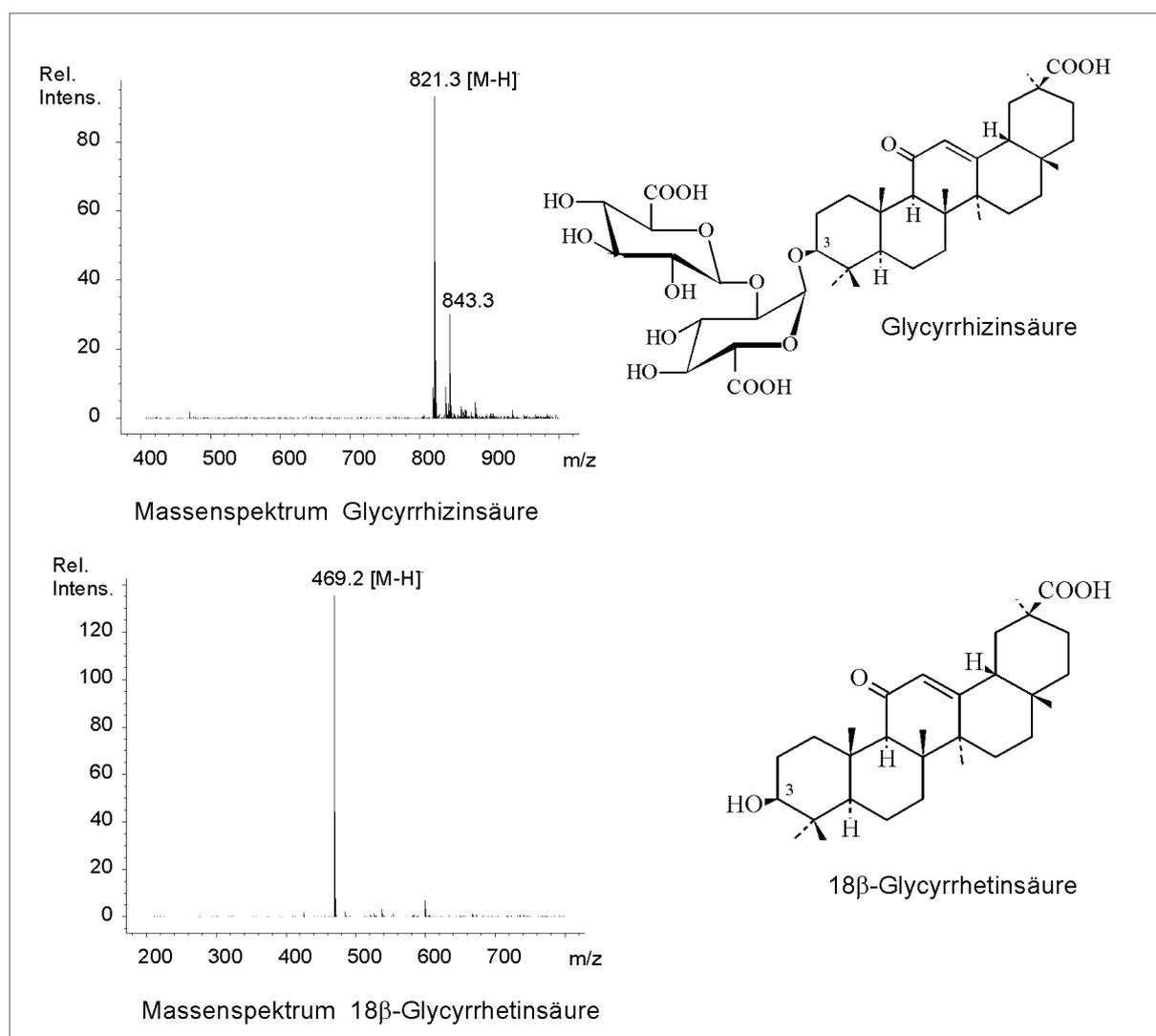


Abbildung 34 API-ES Massenspektren von Glycyrrhizinsäure und 18 β -Glycyrrhetinsäure (neg. Ionenmodus)

Glycyrrhizinsäure wird im negativen Ionenmodus als $[M-H]^-$ und als $[M-H+22]^-$ ionisiert. Die Bildung der 22-er-Addukte konnte, wie schon bei den Catechinen, nicht geklärt werden. 18β -Glycyrrhetinsäure wird massenspektrometrisch als $[M-H]^-$ Quasimoleküllionen ionisiert.

MS/MS-Fragmentierungsexperimente

Die Durchführung der Fragmentierungsexperimente von Glycyrrhizinsäure erfolgte mit Hilfe eines Ionenfallen-Massenspektrometers (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.4). Die $[M-H]^-$ Ionen wurden in der Ionenfalle isoliert und mit einer Amplitude von 1,0 V selektiv fragmentiert. In Abbildung 35 ist das Fragmentspektrum von Glycyrrhizinsäure dargestellt.

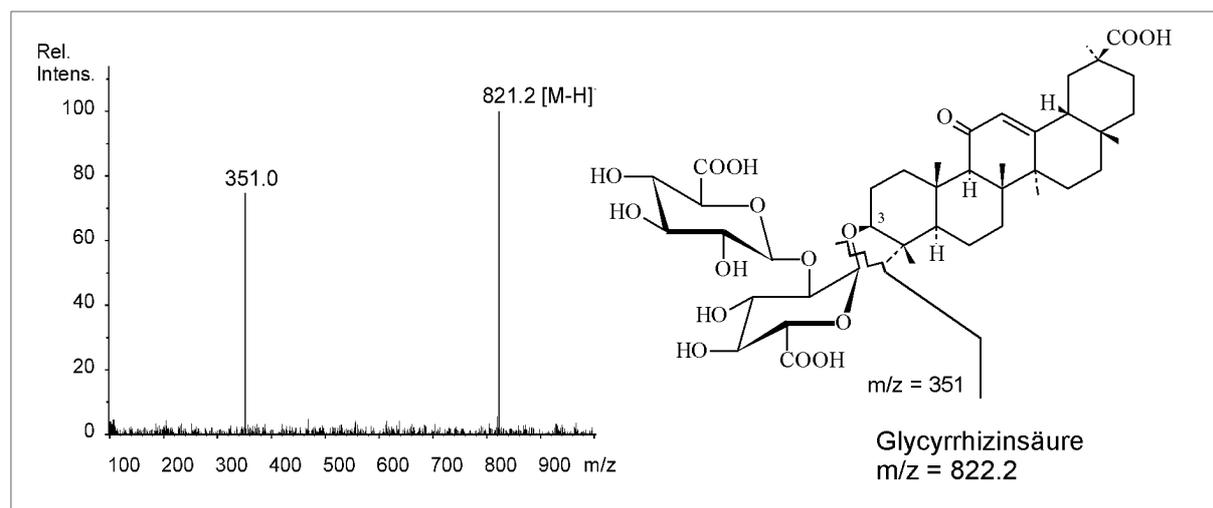


Abbildung 35 API-ES MS/MS Fragmentierungsexperiment von Glycyrrhizinsäure (neg. Ionenmodus)

Das Fragment mit einer Molekülmasse von 351 amu kann dem Diglucuronsäure-Rest zugeordnet werden. Es entsteht durch Abspaltung der 18β -Glycyrrhetinsäure aus dem Gesamtmolekül. Ein Fragment des 18β -Glycyrrhetinsäure-Restes wurde im negativen Ionenmodus nicht erhalten.

Kopplung LC/MS

Die Bestimmung von Glycyrrhizin- und 18 β -Glycyrrhetinsäure wurde mittels LC/MS durchgeführt. Eine RP-18 Säule (*encapsulated*) zeigte bei einer Flussrate von 200 μ l/min eine gute chromatographische Trennleistung. Als Eluent kam ein Gradient aus Methanol, Wasser und Ameisensäure zur Anwendung. Durch Protonierung der Carboxylgruppen mit Hilfe der Ameisensäure wurde das Retentionsverhalten und die Peakform deutlich verbessert. Die Parameter zur Ionisierung und zum Ionentransfer innerhalb des Massenspektrometers wurden aus den FIA-Experimenten übernommen (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.4). In Abbildung 36 ist ein SIM Chromatogramm einer Glycyrrhizin- und 18 β -Glycyrrhetinsäure-Mischstandardlösung dargestellt.

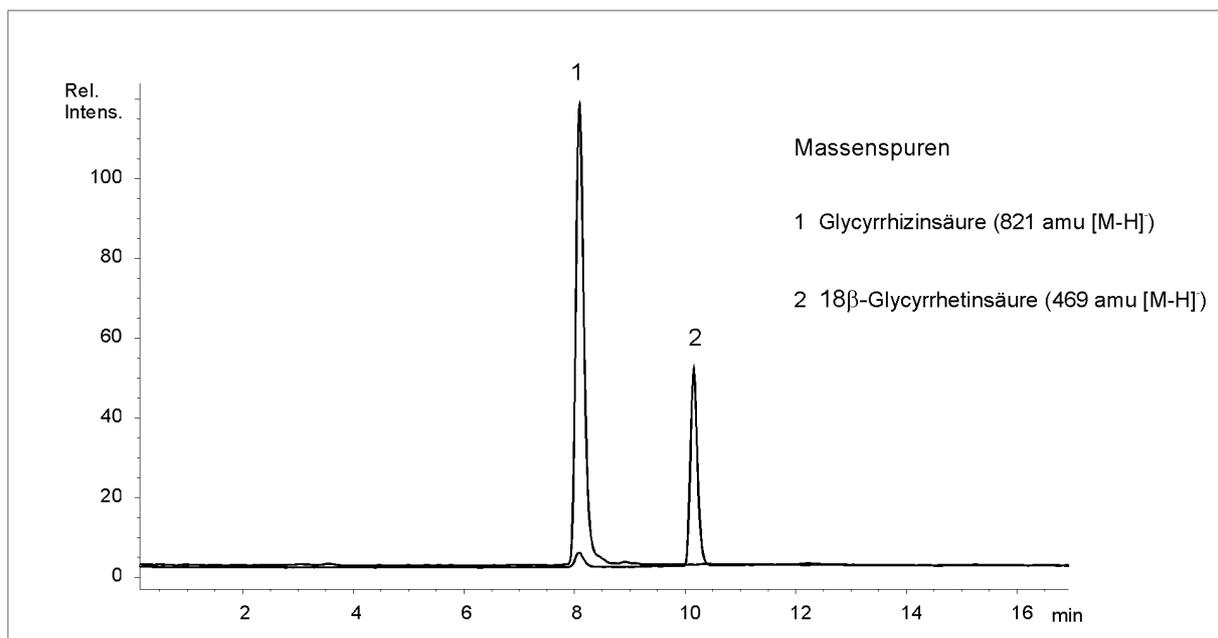


Abbildung 36 HPLC API-ES MS Trennung von Glycyrrhizinsäure und 18 β -Glycyrrhetinsäure (neg. Ionenmodus), Darstellung einzelner Massenspektren [M-H]⁻

Mit dem System lassen sich Glycyrrhizin- und 18 β -Glycyrrhetinsäure chromatographisch trennen und massenspektrometrisch bestimmen. Glycyrrhizinsäure eluiert als polarere der beiden Verbindungen zuerst von der RP-Trennsäule.

Bestimmung der Leitsubstanzen in Emulsionen

Die Entwicklung einer geeigneten Extraktionsmethode der Leitsubstanzen erfolgte anhand von O/W- und W/O-Emulsionen, die mit Glycyrrhizinsäure und 18 β -Glycyrrhetinsäure dotiert wurden. Die Emulsionen wurden mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen extrahiert und anschließend mittels LC/MS analysiert. Die Verwendung von Methanol und Wasser ermöglichte eine vollständige Extraktion der Leitsubstanzen. Es entfallen weitere zeitaufwendige Extraktions- und Aufreinigungsschritte. Die Extrakte können nach Zentrifugation und Membranfiltration direkt zur LC/MS Analyse eingesetzt werden (vgl. Abschnitt 9.2.4). In Abbildung 37 sind die SIM Chromatogramme einer O/W- und W/O-Emulsion mit jeweils 0,5 % Süßholzwurzel-Extrakt abgebildet. In den Chromatogrammen sind die beiden Massenspuren der Leitsubstanzen im negativen Ionenmodus dargestellt.

In beiden kosmetischen Formulierungen konnte sowohl Glycyrrhizinsäure als auch 18 β -Glycyrrhetinsäure bestimmt werden. Mitextrahierte Emulsionsbestandteile führen zu keinen größeren Beeinträchtigungen der chromatographischen Trennung der Leitsubstanzen.

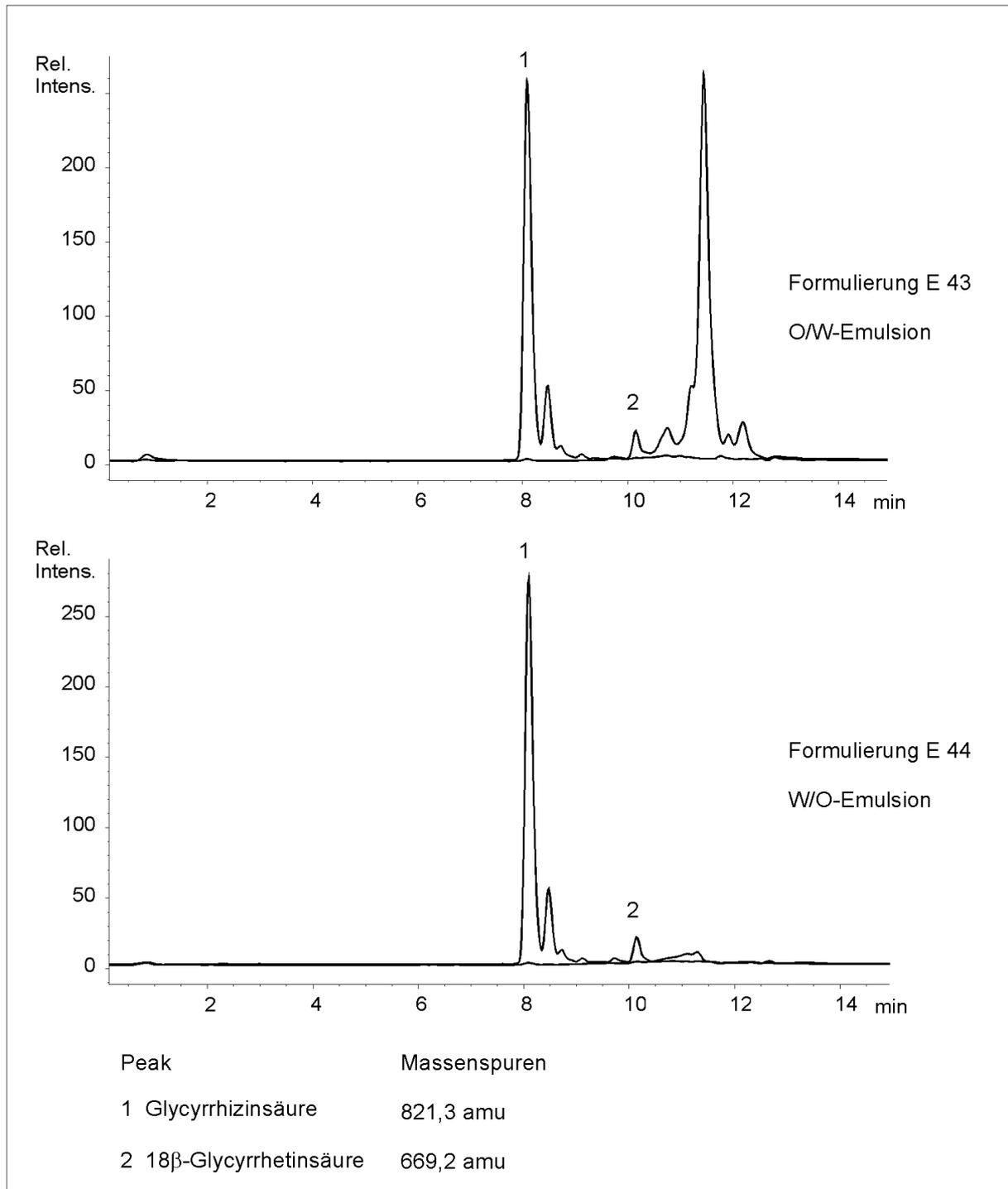


Abbildung 37 HPLC API-ES MS Trennung von einer O/W- und einer W/O-Emulsion mit jeweils 0,5 % Süßholzwurzel-Extrakt (neg. Ionenmodus), Darstellung einzelner Massenspuren [M-H]⁻

Methodenvalidierung

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze erfolgte mittels Glycyrrhizinsäure- und 18 β -Glycyrrhetinsäure-Standardlösungen. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden Formulierungen ohne Süßholzwurzel-Extrakt mit einer Mischstandardlösung dotiert und untersucht. Die relative Standardabweichung wurde mittels Wiederholbestimmungen von Emulsionen mit 0,5 % Süßholzwurzel-Extrakt S 1 bestimmt. Die ermittelten Validierungsparameter sind in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9 Validierungsparameter der LC/MS Bestimmung von Glycyrrhizin- und Glycyrrhetinsäure in kosmetischen Formulierungen

	NWG [ng/ml]	BSG [ng/ml]	WFR [%]	Rel. Stabw. [%]
Glycyrrhizinsäure	5	15	105	1,14
Glycyrrhetinsäure	3	8	97	8,07

NWG Nachweisgrenze (S/N 3:1)

BSG Bestimmungsgrenze (S/N 10:1)

WFR Wiederfindungsrate, Mittelwert O/W- und W/O-Emulsionen (n=6)

Rel. Stabw. Relative Standardabweichung, Mittelwert O/W- und W/O-Emulsionen (n=6)

Wie in Tabelle 9 dargestellt ist, werden Nachweisgrenzen von 5 bzw. 3 ng/ml sowie Bestimmungsgrenzen von 15 bzw. 8 ng/ml erreicht. Die Wiederfindungsrate der beiden Leitsubstanzen in W/O- und O/W-Emulsionen beträgt im Mittel rund 100 %. Anhand der Wiederfindungsrate wird deutlich, dass die Matrix keinen negativen Einfluss auf die Bestimmung hat. Daher ist eine Quantifizierung von Glycyrrhizin- und 18 β -Glycyrrhetinsäure mittels Matrixkalibrierung nicht erforderlich. Die Bestimmung der Glycyrrhizinsäure erfolgt mit einer guten Reproduzierbarkeit, die sich in einer relativen Standardabweichung von weniger als 2 % widerspiegelt. Die relative Standardabweichung von 8 % bei der Bestimmung der Glycyrrhetinsäure kann auf die geringe Konzentration in dem verwendeten Extrakt zurückgeführt werden. Bei den folgenden Untersuchungen wird auf Wiederholbestimmungen verzichtet, da die wesentlich höherkonzentrierte Glycyrrhizinsäure mit einer guten Reproduzierbarkeit bestimmt werden kann.

5.3.2 Glycyrrhizinsäure- und 18 β -Glycyrrhetinsäure-Gehalte in pflanzlichen Rohstoffen

Es wurden Süßholzwurzel-Extrakte unterschiedlicher Extraktionsverfahren und verschiedener Hersteller hinsichtlich ihrer Glycyrrhizinsäure- und 18 β -Glycyrrhetinsäure-Gehalte untersucht (vgl. Abschnitt 9.1.3). Die ermittelten Gehalte sind in Tabelle 10 angegeben.

Tabelle 10 Ermittelte Gehalte an Glycyrrhizinsäure und 18 β -Glycyrrhetinsäure in verschiedenen Süßholzwurzel-Extrakten

Gehalte [%]	Extrakt S 1	Extrakt S 2	Extrakt S 3	Extrakt S 4	Extrakt S 5
Glycyrrhizinsäure	0,425	1,052	6,445	0,165	n.n.
18 β -Glycyrrhetinsäure	0,0048	0,0070	0,0190	0,0011	0,0003

n.n. nicht nachweisbar

Wie man anhand der Untersuchungsergebnisse erkennt, weisen die Extrakte erhebliche Unterschiede in ihren Wirkstoffgehalten auf. Während in den mit Alkohol, Wasser und Propylenglykol extrahierten Rohstoffen (S 1 - S 4) Glycyrrhizinsäure-Gehalte von 0,165 bis 6,45 % bestimmt wurden, konnten in der mit Jojoba Öl extrahierten Probe (S 5) keine Glycyrrhizinsäure nachgewiesen werden. Der sprühgetrocknete Extrakt S 3 enthält den höchsten Gehalt an Glycyrrhizinsäure. In allen untersuchten Extrakten wurden nur geringe Mengen an 18 β -Glycyrrhetinsäure nachgewiesen, wobei im sprühgetrockneten Extrakt S 3 der höchste Gehalt mit 0,019 % ermittelt wurde. Bei den Extrakten S 1 und S 2 korrelieren die Wirkstoffgehalte mit den Trockenmassen der Extrakte. Extrakt S 2 mit einer Trockenmasse > 6 % weist ungefähr doppelt so hohe Gehalte auf wie Extrakt S 1 mit einer Trockenmasse > 3 %.

5.3.3 Lagerstabilität in Emulsionen

Zur Ermittlung der Lagerstabilität von Süßholzwurzel-Extrakt in kosmetischen Formulierungen wurden handelsübliche O/W- und W/O-Emulsionen mit 0,5 % Extrakt S 1 hergestellt (vgl. Abschnitt 9.1.3) und 6 Monate definiert gelagert. Die Formulierungen wurden direkt nach der Herstellung sowie nach 1, 3 und 6 Monaten Lagerung auf ihre Glycyrrhizinsäure und 18 β -Glycyrrhetinsäure-Gehalte untersucht. In Abbildung 38 sind die Ergebnisse dargestellt.

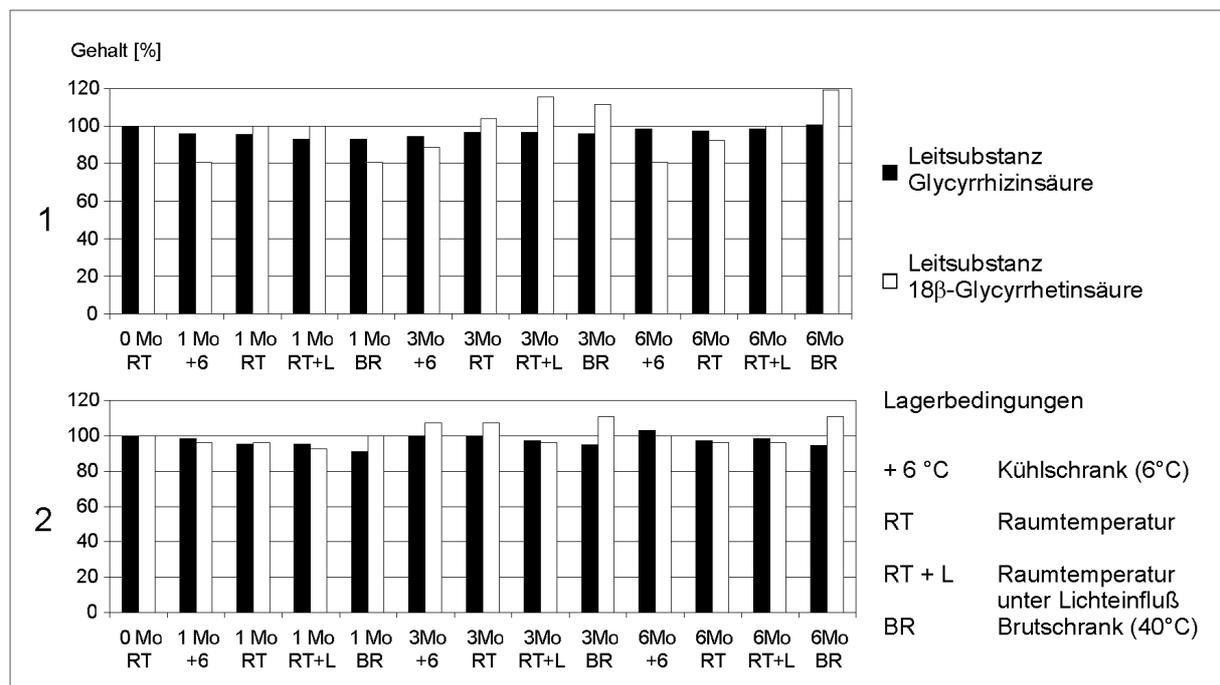


Abbildung 38 Stabilität von Glycyrrhizinsäure und 18 β -Glycyrrhetinsäure in Emulsionen mit 0,5 % Süßholzwurzel-Extrakt während einer Lagerzeit von 6 Monaten: 1. O/W-Emulsion (E 43), 2. W/O-Emulsion (E 44)

Der Süßholzwurzel-Extrakt weist in beiden Formulierungen eine hohe Lagerstabilität auf, wobei in allen Mustern Gehalte von über 90 % des Anfangsgehaltes an Glycyrrhizinsäure ermittelt wurden. Weder Temperaturen von +40 °C noch Lichteinfluss führten zu einem verstärkten Glycyrrhizinsäure-Abbau. Die schwankenden 18 β -Glycyrrhetinsäure-Gehalte von 80 bis 111 % des ursprünglichen Gehaltes lassen keinen eindeutigen Trend erkennen. Gehalte von über 100 % könnten durch einen Abbau der Glycyrrhizinsäure in 18 β -Glycyrrhetinsäure und Diglucuronid-Rest zustande kommen, wobei auch methodenbedingte Schwankungen aufgrund der

relativen Standardabweichung von ca. 8 % berücksichtigt werden müssen. Eine besondere Stabilisierung der Süßholzwurzel-Extrakte in den kosmetischen Formulierungen ist somit nicht erforderlich.

5.3.4 Penetrationseigenschaften von *Glycyrrhiza glabra*-Extrakten

Die Penetrationseigenschaften von Süßholzwurzel-Extrakten wurde mit Hilfe des *in vitro* Schweinehautmodells anhand der Leitsubstanz Glycyrrhizinsäure untersucht (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.4). In der Studie wurde eine O/W-Emulsion mit 5 % Süßholzwurzel-Extrakt und 0,1 % Glycyrrhizin (Formulierung D 9, vgl. Abschnitt 9.1.3) verwendet. Der Glycyrrhizin-Zusatz war erforderlich, da der Gehalt an Glycyrrhizinsäure aus dem Extrakt nicht ausreichend für die Durchführung einer Penetrationsstudie war. Auf die Verwendung von 18 β -Glycyrrhetinsäure als zweite Leitsubstanz wurde aufgrund der sehr geringen Gehalte im verwendeten Extrakt verzichtet. Abbildung 39 zeigt die Ergebnisse dieser Penetrationsstudie, wobei die ermittelten Gehalte die Mittelwerte einer vierfachen Bestimmung darstellen. Die berechneten Vertrauensbereiche der Mittelwerte (Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %) sind ebenfalls in der Graphik angegeben.

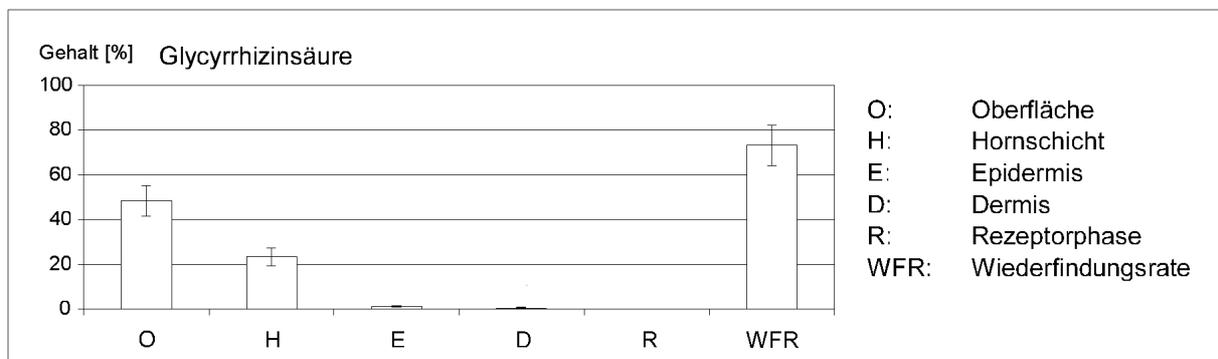


Abbildung 39 Ergebnisse der *in vitro* Penetrationsstudie; Verteilung von Glycyrrhizinsäure auf bzw. in der Haut

Fast die Hälfte der applizierten Glycyrrhizinsäure verbleibt auf der Oberfläche, während ungefähr 20 % in die Hornschicht penetrieren. In den lebenden Zellen der Epidermis wurden Gehalte von 1,3 % ermittelt. Glycyrrhizinsäure penetriert nur in geringen Mengen in die Dermis; diese konnten jedoch reproduzierbar in den vier untersuchten Schweinehautstücken bestimmt werden. In der Rezeptorphase wurde

keine Glycyrrhizinsäure nachgewiesen. 73 % der applizierten Glycyrrhizinsäure wurden in der Penetrationsstudie wiedergefunden. In einem weiteren Test führte eine Inkubation von Glycyrrhizinsäure mit zerkleinerter Schweinehaut zu einem Abbau von 30 % innerhalb von 24 Stunden bei Raumtemperatur. Ein enzymatischer Abbau der Glycyrrhizinsäure kann demnach angenommen werden.

Anhand der Penetrationsstudie konnte gezeigt werden, dass Glycyrrhizinsäure nach topischer Applikation in die Haut penetriert und in lebenden Zellschichten nachweisbar ist. Eine perkutane Absorption des unveränderten Wirkstoffs in die Rezeptorphase konnte nicht nachgewiesen werden.

5.4 Terminalia sericea

5.4.1 Analytik

Photometrische Untersuchungen

Die Bestimmung von Terminalia sericea-Extrakt wurde anhand der Verbindung Sericosid als Leitsubstanz durchgeführt. Als Referenzsubstanz wurde isoliertes Sericosid verwendet, das von einem Rohstofflieferanten zur Verfügung gestellt wurde. Zur Charakterisierung des Sericosids wurde zunächst ein UV-Spektrum aufgenommen (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.5). In Abbildung 40 ist ein UV-Spektrum einer wässrig-methanolischen Sericosid-Lösung dargestellt.

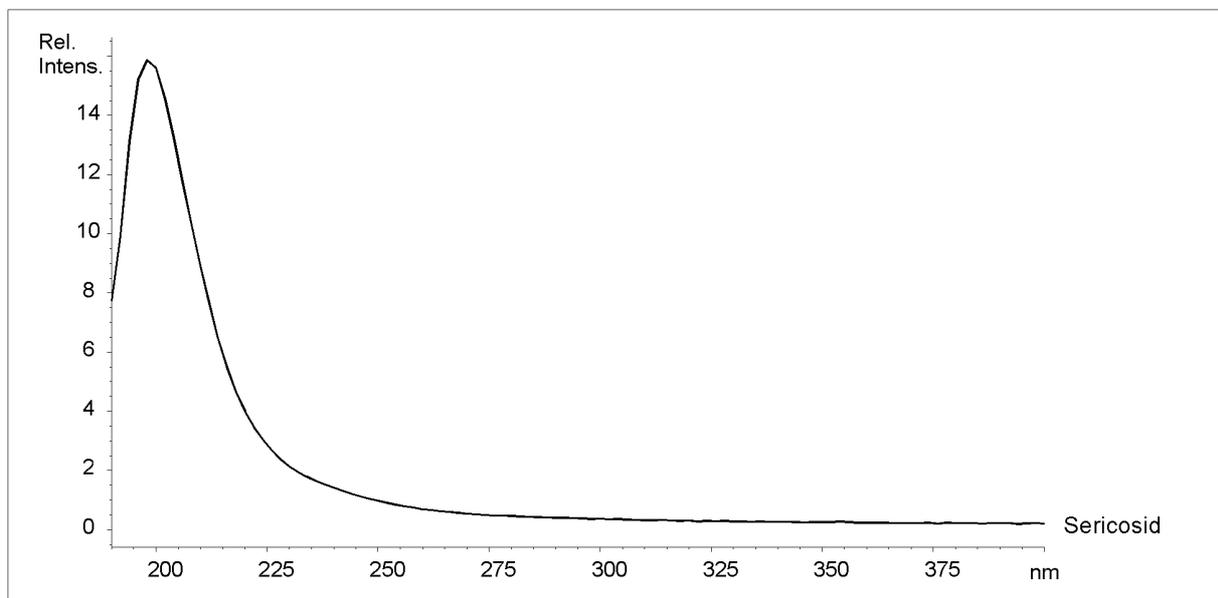


Abbildung 40 UV-Spektrum von Sericosid

Neben dem UV-Maximum bei 205 nm, das zum Teil auch auf das verwendete Lösungsmittel zurückzuführen ist, sind keine weiteren Maxima erkennbar. Da die farblose Verbindung nur Strahlung unspezifisch im UV-Bereich um 205 nm absorbiert, ist eine selektive photometrische Detektion nicht möglich.

Massenspektrometrische Untersuchungen

Die massenspektrometrischen Untersuchungen von Sericosid wurden mit Hilfe eines API-ES Quadrupol-Massenspektrometers anhand wässrig-methanolischer Lösungen durchgeführt. Die Ionisierungsparameter wurden mittels FIA-Experimenten optimiert (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.5). Eine empfindliche Ionisierung von Sericosid wird im positiven Ionenmodus bei einer Kapillarspannung von -4000 V erreicht. Als weitere Parameter wurden ein Nebulizer-Druck von 30 psi und ein Trockengasstrom von 8 l/min bei 300 °C gewählt. In Abbildung 41 ist ein API-ES Massenspektrum von Sericosid dargestellt.

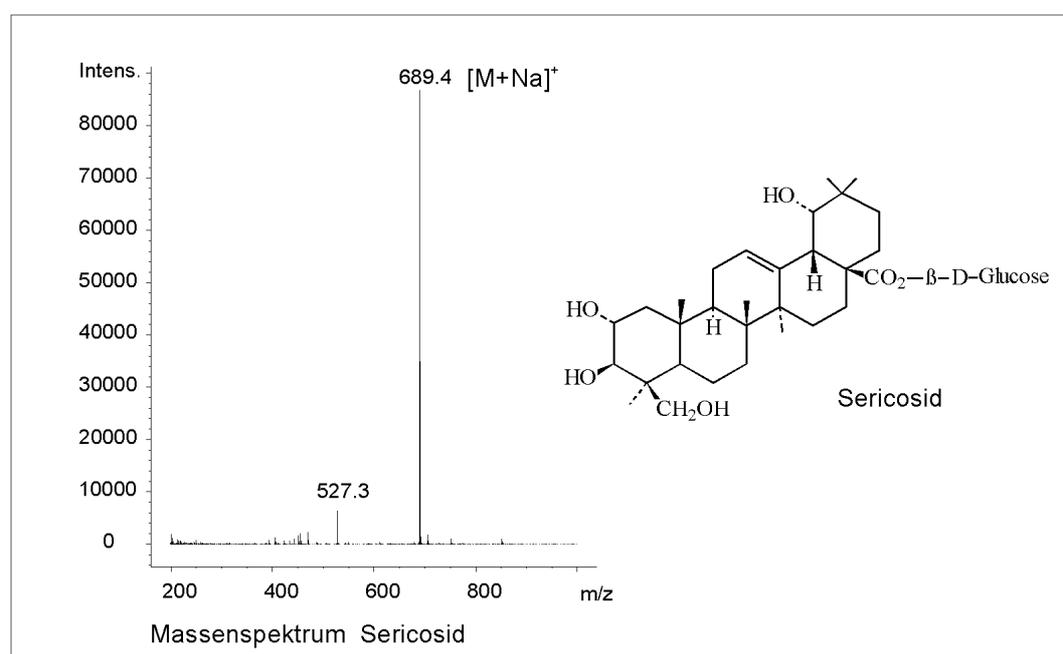


Abbildung 41 API-ES Massenspektrum von isoliertem Sericosid (pos. Ionenmodus)

Sericosid wird im positiven Ionenmodus als $[M+Na]^+$ ionisiert. Das zweite Signal bei m/z 527,3 entspricht dem Natrium-Addukt der Sericinsäure, die durch Abspaltung des Glucose-Restes aus dem Sericosid-Molekül entsteht. Die Intensität dieses Signals ist von der angelegten Fragmentorspannung abhängig. Eine Verringerung der Fragmentorspannung führte einerseits zu einer Verringerung des Sericinsäure-Signals, andererseits aber auch zu einer Verringerung der Signalintensität von Sericosid. Um eine möglichst hohe Ionenausbeute an Sericosid-Ionen zu erhalten, wurde eine Fragmentorspannung von 200 V gewählt. Sericosid lässt sich auch im

negativen Ionenmodus als $[M-H]^-$ ionisieren. Im Vergleich zum positiven Ionenmodus ist dies aber mit einer wesentlich geringeren Nachweisempfindlichkeit verbunden.

MS/MS-Fragmentierungsexperimente

Zur Charakterisierung der isolierten Referenzsubstanz wurden Electrospray-Ionenfallen MS/MS-Fragmentierungsexperimente durchgeführt (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.5) (Abbildung 42).

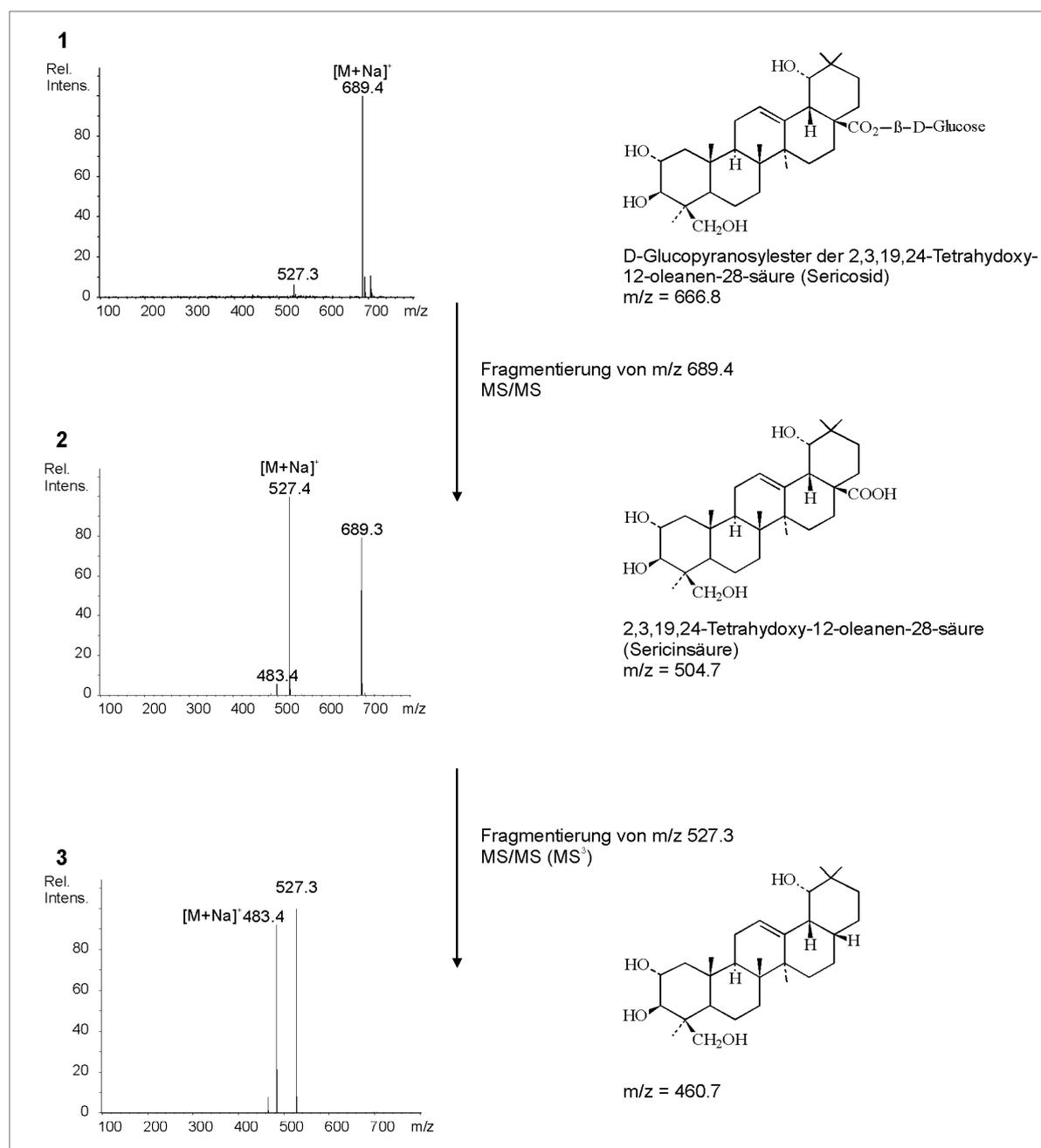


Abbildung 42 API-ES MS/MS Fragmentierungsexperimente von isoliertem Sericosid (pos. Ionenmodus)

In Abbildung 42 ist im Bild 1 das Massenspektrum von Sericosid abgebildet. Nach Isolierung und selektiver Fragmentierung der Ionen mit der Molmasse 689,4 amu erhält man die in Bild 2 dargestellten Fragmente. Im ersten Schritt der Fragmentierung wird zunächst der Glucosyl-Rest abgespalten, es verbleibt das Fragment mit 527,4 amu. Das entstandene Fragment kann als Natrium-Addukt der Sericinsäure interpretiert werden. Im zweiten Schritt der Fragmentierung (MS^3 , Bild 3) wird durch Abspaltung der Carboxylgruppe das Fragment der Molmasse 483,4 amu erhalten. Die einzelnen Fragmentspektren der isolierten Referenzsubstanz stehen im Einklang mit der Molekülstruktur.

NMR-spektroskopische Untersuchungen

Zur weiteren Charakterisierung des isolierten Sericosids wurden NMR-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt (vgl. Abschnitt 9.2.1). Aufgrund von Signalüberlagerungen im 1D-Protonenspektrum wurden die ^{13}C - und 1H -chemischen Verschiebungen mit 2D-Korrelationsexperimenten bestimmt. Die ^{13}C - und 1H -Zuordnung der einzelnen Signale ist in Tabelle 11 angegeben.

Tabelle 11 Ergebnis der 1H und ^{13}C -NMR-Untersuchung von isoliertem Sericosid, Verschiebung [ppm] (d_4 -Methanol, TMS)

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

* Die Zuordnung der Signale von Position 21 und 22 sowie von Position 29 und 30 ist nicht eindeutig.

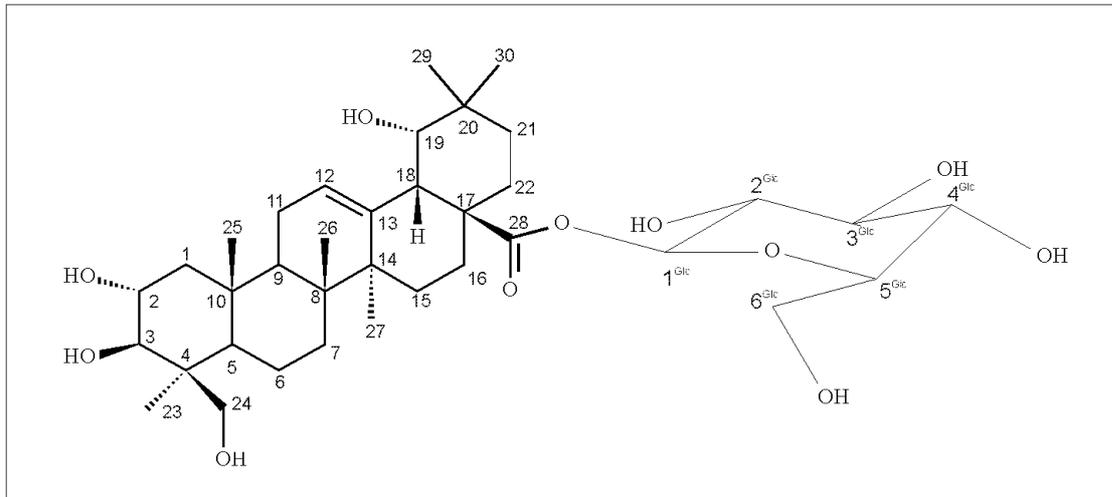


Abbildung 43 Struktur von Sericosid

Mit Hilfe der NMR-Daten konnte die Struktur des isolierten Sericosids bestätigt werden (Abbildung 43). Anhand der Kopplungskonstanten konnte gezeigt werden, dass der Glucoserest β -verknüpft vorliegt.

Kopplung LC/MS

Die Bestimmung von Sericosid wurde mit Hilfe der Kopplung LC/MS durchgeführt, wobei die Parameter zur Ionisierung und zum Ionentransfer innerhalb des Quadrupol-Massenspektrometers wiederum aus den FIA-Experimenten übernommen wurden. Zur chromatographischen Trennung wurde eine RP-18 Säule (*encapsulated*) und als Eluent ein Methanol/Wasser/Ameisensäure-Gradient verwendet (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.5). In Abbildung 44 ist ein SIM Chromatogramm von isoliertem Sericosid dargestellt.

Sericosid (Peak 2) eluiert nach einer Retentionszeit von 7 min. Beim zweiten Peak im Chromatogramm (Peak 1) handelt es sich vermutlich um eine isomere Verbindung des Sericosids, die mit einem gleichen Masse/Ladungsverhältnis detektiert wird. Eine Charakterisierung des Peak 1 wurde nicht durchgeführt.

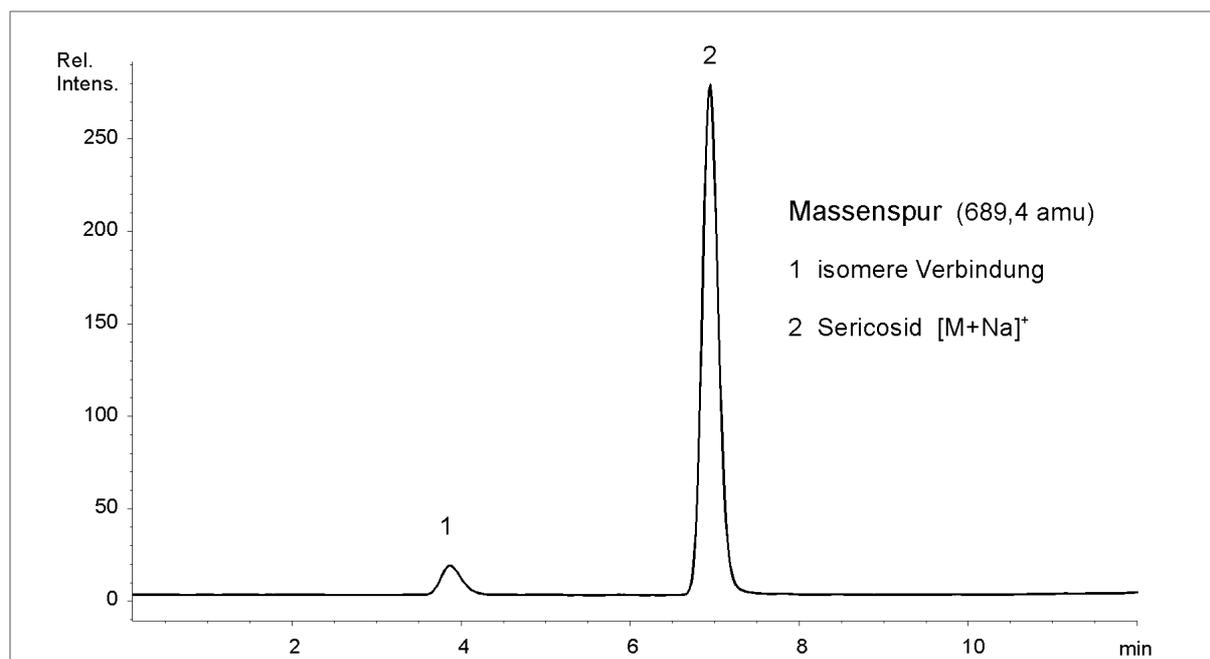


Abbildung 44 HPLC API-ES MS Trennung von isoliertem Sericosid (pos. Ionenmodus), Darstellung der Massenspur $[M+Na]^+$

Bestimmung von Sericosid in Emulsionen

Mit Hilfe von O/W- und W/O-Emulsionen, die mit Sericosid dotiert wurden, erfolgte die Methodenentwicklung zur Extraktion von Sericosid aus kosmetischen Formulierungen. Die Verwendung von Methanol und Wasser als Extraktionsmittel führte zu einer quantitativen Extraktion von Sericosid aus den Emulsionen (vgl. Abschnitt 9.2.5). In Abbildung 45 ist ein SIM Chromatogramm einer handelsüblichen W/O-Emulsion mit 0,005 % Terminalia sericea-Extrakt dargestellt (vgl. Abschnitt 0).

Neben dem Sericosid wurde in der kosmetischen Formulierung auch eine massen- gleiche Verbindung nachgewiesen, die zur gleichen Retentionszeit wie die vermutete isomere Verbindung eluiert. Aus dem Chromatogramm der extrahierten Probe geht hervor, dass mitextrahierte Matrixbestandteile zu keiner Beeinflussung der Chromatographie führen. In gleicher Weise stellt sich die Bestimmung von Sericosid in O/W-Emulsionen mit 0,005 % Terminalia sericea-Extrakt dar.

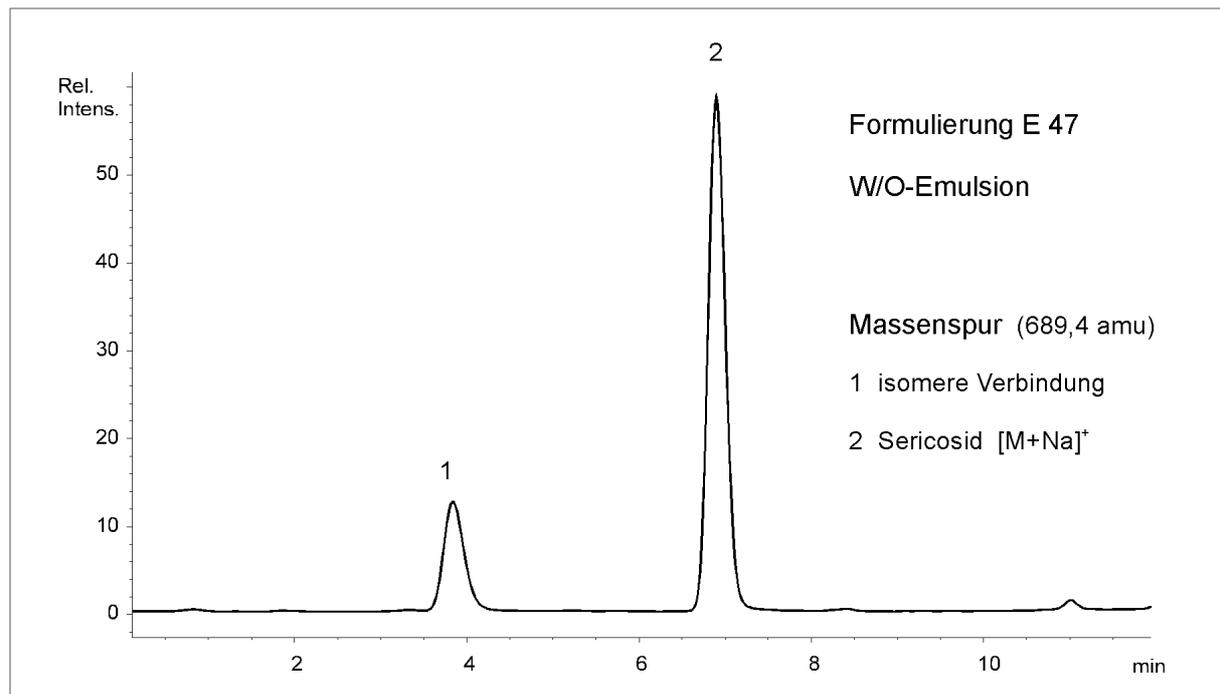


Abbildung 45 HPLC API-ES MS Trennung von einer W/O-Emulsion mit 0,005 % Terminalia sericea-Extrakt (E 47) (pos. Ionenmodus), Darstellung einer Massenspur $[M+Na]^+$

Methodenvalidierung

Die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde anhand von Sericosid-Standardlösungen durchgeführt. Die Wiederfindungsrate wurde mit kosmetischen Formulierungen, die mit Sericosid dotiert wurden, ermittelt. Die Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode wurde mit Hilfe von Wiederholbestimmungen von O/W- und W/O-Emulsionen mit 0,005 % Terminalia sericea-Extrakt untersucht. Die ermittelten Validierungsparameter sind in Tabelle 12 angegeben.

Tabelle 12 Validierungsparameter der LC/MS Bestimmung von Sericosid in kosmetischen Formulierungen

	NWG [ng/ml]	BSG [ng/ml]	WFR [%]	Rel. Stabw. [%]
Sericosid	0,1	0,5	102,8	4,46

NWG Nachweisgrenze (S/N 3:1)

BSG Bestimmungsgrenze (S/N 10:1)

WFR Wiederfindungsrate, Mittelwert O/W- und W/O-Emulsionen (n=6)

Rel. Stabw. Relative Standardabweichung, Mittelwert O/W- und W/O-Emulsionen (n=6)

Mit der LC/MS Methode wird eine Nachweisgrenze von 0,1 ng/ml und eine Bestimmungsgrenze von 0,5 ng/ml erreicht. Die Wiederfindungsrate von ca. 100 % zeigt, dass Sericosid quantitativ extrahiert wurde und keine Beeinflussung der Ionisierung durch andere Inhaltsstoffe der Formulierungen zu beobachten ist. Die entwickelte Methode zeichnet sich durch eine gute Reproduzierbarkeit aus, die sich in einer relativen Standardabweichung von < 5 % widerspiegelt. Die weitergehenden Untersuchungen zur Lagerstabilität wurden in Einfachbestimmungen durchgeführt, wobei die Quantifizierung mittels externer Standardkalibrierung erfolgte.

5.4.2 Sericosid-Gehalte in pflanzlichen Rohstoffen

Es wurden drei unterschiedliche Terminalia sericea-Extrakte von Rohstofflieferanten bezogen (vgl. Abschnitt 0) und auf ihre Sericosid-Gehalte untersucht. In Tabelle 13 sind die Gehalte angegeben.

Tabelle 13 **Ermittelte Gehalte an Sericosid in verschiedenen Terminalia sericea-Extrakten**

Gehalte [%]	Extrakt T 1	Extrakt T 2	Extrakt T 3
Sericosid	86,2	25,2	0,2

Die Extrakte weisen große Unterschiede bezüglich ihrer Wirkstoffgehalte auf. Während im Extrakt T 1 nach alkoholischer Extraktion und Umkristallisation 86,2 % Sericosid enthalten ist, konnte im Extrakt T 3 nach Extraktion mit Butylenglykol ein Gehalt von weniger als 1 % ermittelt werden. In dem mit Phospholipiden verkapselten Sericosid in Extrakt T 2 wurde 25,2 % bestimmt.

5.4.3 Lagerstabilität in Emulsionen

Zur Ermittlung der Lagerstabilität von Terminalia sericea-Extrakt in kosmetischen Formulierungen wurden handelsübliche O/W- und W/O-Emulsionen mit 0,005 % Extrakt T 1 hergestellt (vgl. Abschnitt 0) und über 6 Monate definiert gelagert. Die Formulierungen wurden wiederum direkt nach der Herstellung sowie nach 1, 3 und 6 Monaten Lagerung auf ihre Sericosid-Gehalte untersucht. In Abbildung 46 sind die Ergebnisse der Untersuchung dargestellt.

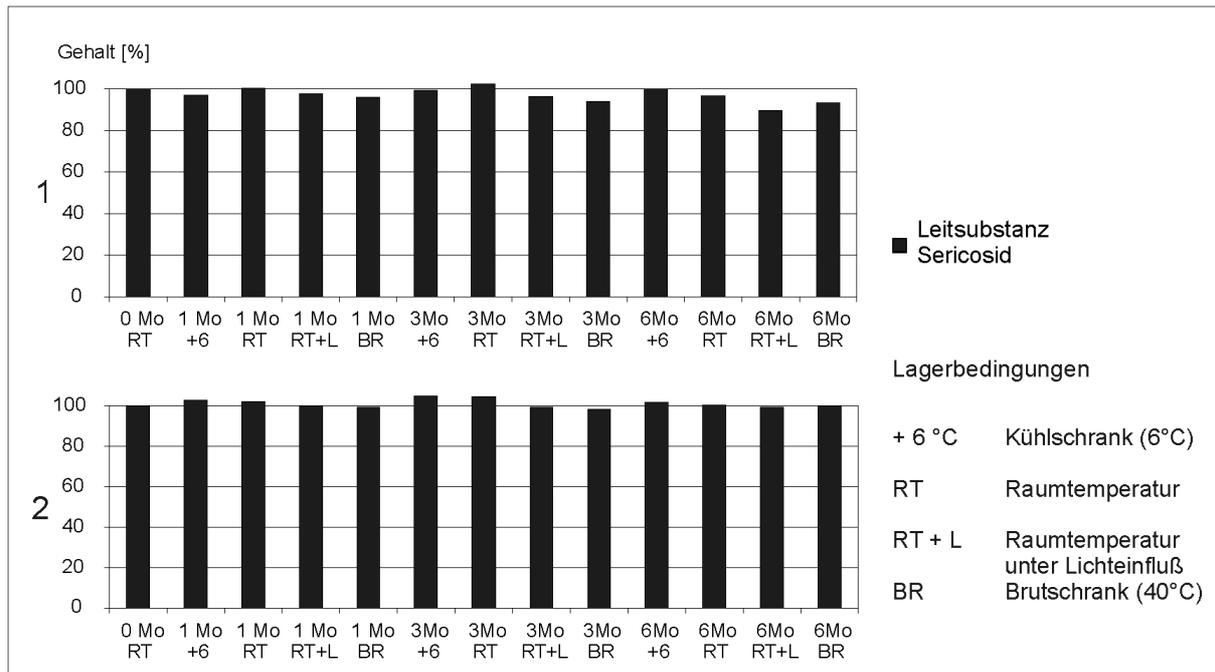


Abbildung 46 Stabilität von Sericosid in Emulsionen mit 0,005 % Terminalia sericea-Extrakt während einer Lagerzeit von 6 Monaten: 1. O/W-Emulsion (E 48), 2. W/O-Emulsion (E 47)

Der Terminalia sericea-Extrakt weist eine gute Lagerstabilität in beiden kosmetischen Formulierungen auf. Gehalte von über 100 % Sericosid können auf geringe methodenbedingte Schwankungen zurückgeführt werden. Betrachtet man die Lagerstabilität von Terminalia sericea-Extrakt hinsichtlich des Hauptinhaltsstoffs Sericosid, ist eine Stabilisierung in den untersuchten kosmetischen Formulierungen nicht erforderlich.

5.4.4 Penetrationseigenschaften von Terminalia sericea-Extrakten

Die Untersuchung der Penetration von Terminalia sericea-Extrakten in die Haut wurde anhand der Leitsubstanz Sericosid mit Hilfe des in vitro Schweinehautmodells durchgeführt (vgl. Abschnitt 9.2.5). Eine O/W-Emulsion mit 0,25 % Terminalia-Extrakt T 1 (Formulierung D 8, vgl. Abschnitt 0) wurde in dieser Studie auf die Schweinehautscheiben appliziert. In Abbildung 47 sind die Ergebnisse der Penetrationsuntersuchungen dargestellt, wobei die angegebenen Gehalte die Mittelwerte einer dreifachen Bestimmung darstellen. Die Fehlerbalken in der Graphik stellen die berechneten Vertrauensbereiche der Mittelwerte (Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %) dar.

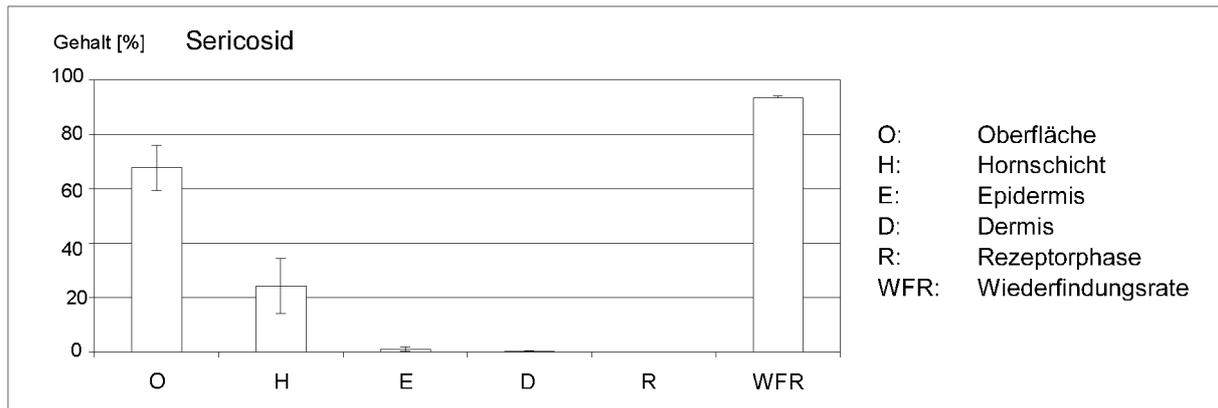


Abbildung 47 Ergebnisse der in vitro Penetrationsstudie; Verteilung von Sericosid auf bzw. in der Haut

Ca. 70 % des applizierten Sericosids penetrierte nicht und verblieb auf der Hautoberfläche. In der Hornschicht wurden 24 % Sericosid gefunden, während in der Epidermis und Dermis nur Gehalte von 1 % bzw. ca. 0,3 % ermittelt wurden. Die in der Dermis nachgewiesenen Spuren können als gesichert gelten, da das Sericosid in allen untersuchten Hautstücken gefunden wurde. Eine perkutane Absorption konnte nicht nachgewiesen werden. Ca. 93 % des applizierten Sericosids wurden nach Beendigung der Penetrationsstudie wiedergefunden, wobei der Vertrauensbereich des Mittelwertes weniger als 1 % beträgt. Anhand der Penetrationsstudie konnte gezeigt werden, dass Sericosid nach topischer Applikation in die Haut penetriert und in Spuren in lebenden Zellschichten nachzuweisen ist.

5.5 Echinacea purpurea

5.5.1 Analytik

Photometrische Untersuchungen

Zur Untersuchung von Echinacea purpurea-Extrakten diente Cichoriensäure als kosmetisch wirksame Leitsubstanz. Als Referenzsubstanz wurde isolierte Cichoriensäure verwendet, die von einem Rohstofflieferanten zur Verfügung gestellt wurde. Die isolierte Cichoriensäure wurde zuerst mittels UV-Spektrum charakterisiert (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.6) (Abbildung 48).

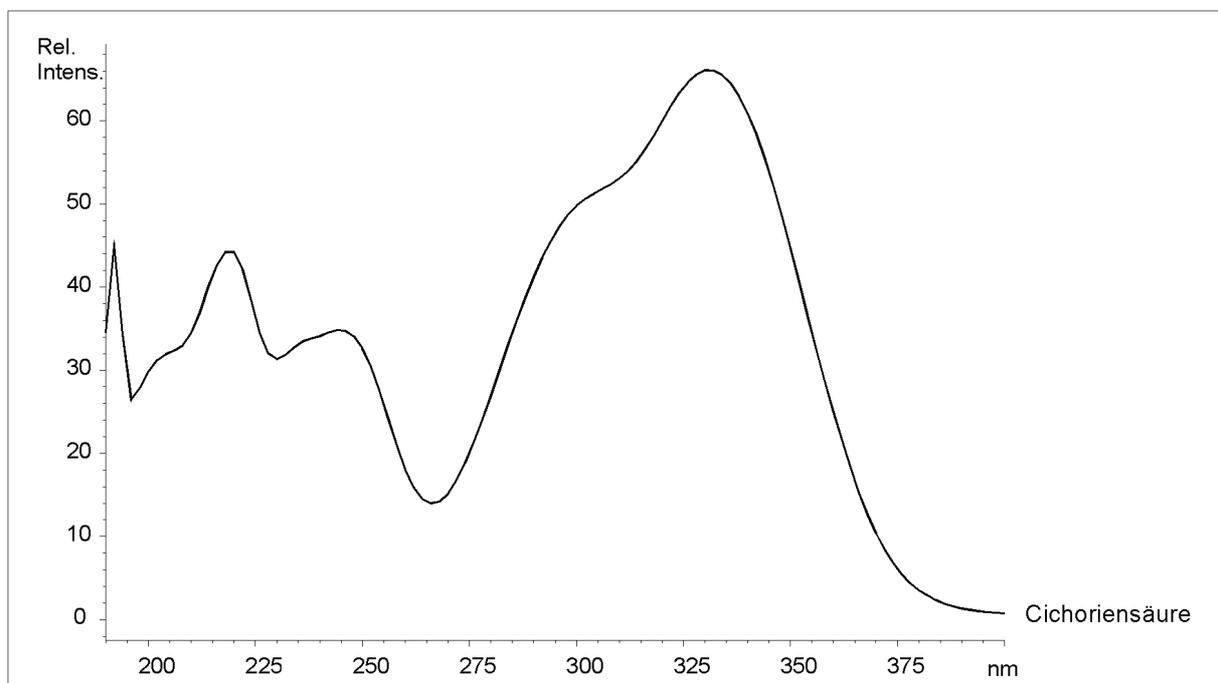


Abbildung 48 UV-Spektrum von Cichoriensäure

Das dargestellte UV-Spektrum zeigt die charakteristischen Absorptionsmaxima von Cichoriensäure, die auch schon von Bauer et al. beschrieben wurden [89]. Das Hauptabsorptionsmaximum liegt bei ca. 330 nm.

Massenspektrometrische Untersuchungen

Zur massenspektrometrischen Untersuchung wurden Spektren einer wässrig-methanolischen Cichoriensäure-Lösung mit einem API-ES Quadrupol-Massenspektrometer aufgenommen (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.6). Die Optimierung

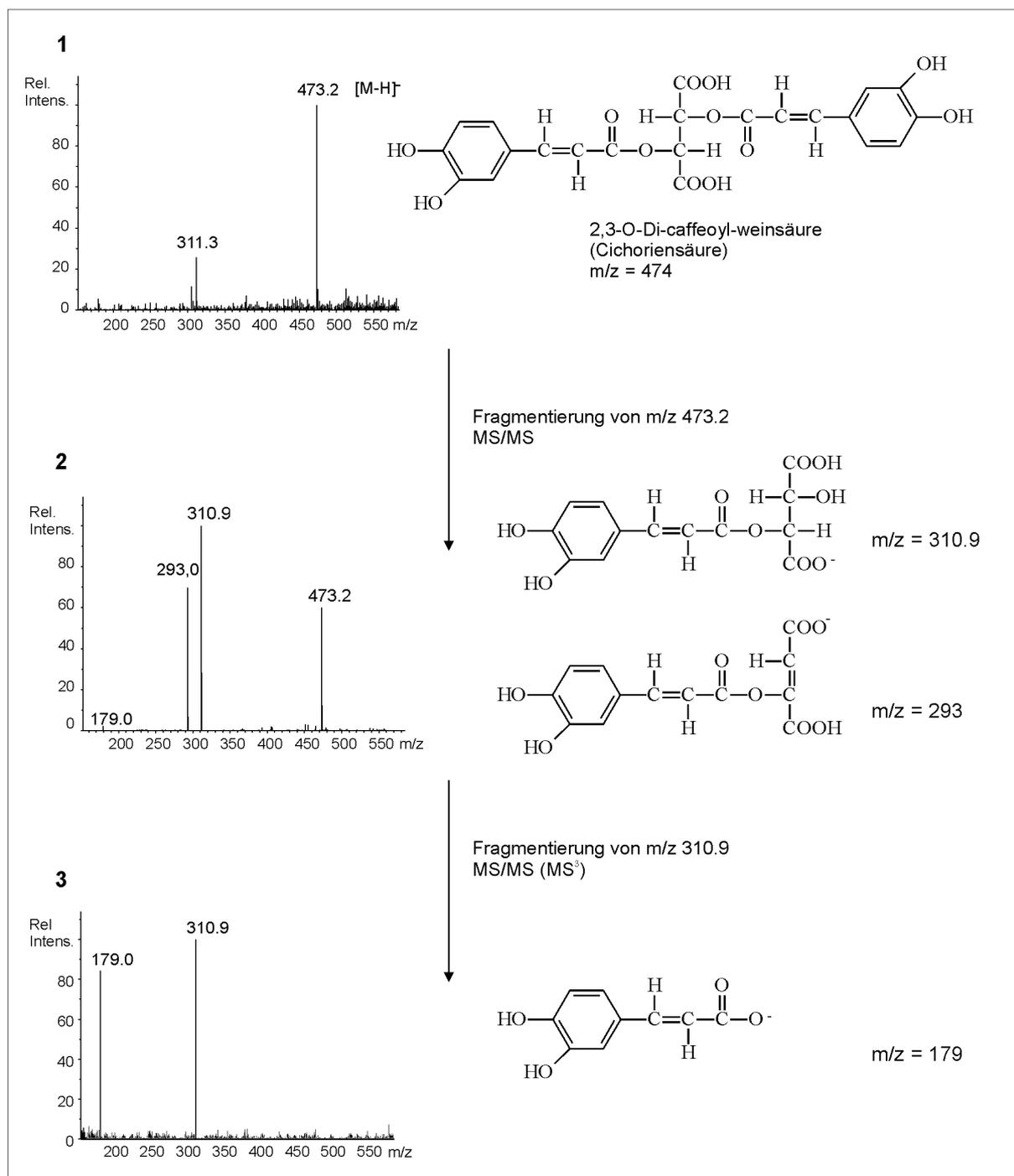


Abbildung 50 API-ES MS/MS-Fragmentierungsexperimente von isolierter Cichoriensäure (neg. Ionenmodus)

In ersten Schritt wurden die $[M-H]^-$ Ionen in der Ionenfalle isoliert (Bild 1) und mit einer Amplitude von 0,80 V selektiv fragmentiert. Die entstandenen Fragmente sind in Bild 2 dargestellt. Im zweiten Schritt der Fragmentierung (MS^3) wurden Ionen der Molmasse 310,9 amu isoliert und mit einer Amplitude von 0,75 V fragmentiert

(Bild 3). Im rechten Teil der Abbildung sind mögliche Fragmente der Cichoriensäure dargestellt.

NMR-spektroskopische Untersuchungen

Weiterhin wurden NMR-spektroskopische Untersuchungen der isolierten Cichoriensäure durchgeführt (vgl. Abschnitt 9.2.1). Die ^{13}C - und ^1H -Zuordnung der einzelnen Signale ist in Tabelle 14 angegeben.

Tabelle 14 Ergebnis der ^1H und ^{13}C -NMR-Untersuchung von isolierter Cichoriensäure, Verschiebung [ppm] (d_4 -Methanol, TMS)

Position	^{13}C -Verschiebung	^1H -Verschiebung
1	169,65	-
2	72,48	5,803
3	167,72	-
4	113,68	6,368
5	148,60	7,655
6	127,60	-
7	123,44	6,992
8	116,59	6,791
9	150,04	-
10	146,93	-
11	115,26	7,086

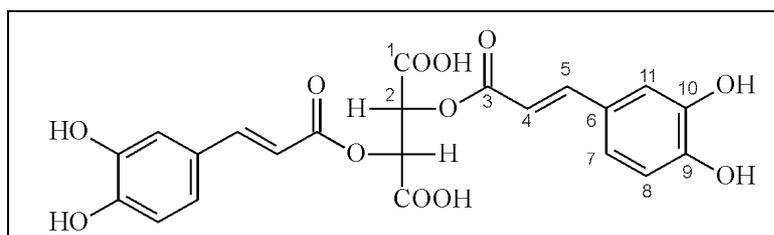


Abbildung 51 Struktur von Cichoriensäure

Mit Hilfe der NMR-Daten konnte die Struktur der isolierten Cichoriensäure bestätigt werden (Abbildung 51). Mit Ausnahme der Positionen 3 und 4 zeigen die NMR-Daten eine gute Übereinstimmung mit Untersuchungen von Soicke et al. [125].

Kopplung LC/MS

Die Bestimmung von Cichoriensäure erfolgte mit Hilfe der Kopplung Flüssigchromatographie und API-ES Quadrupol-Massenspektrometrie. Zur chromatographischen Trennung wurde eine RP-18 Säule (*acid base deactivated*) verwendet. Bei diesem Füllmaterial wurde die Oberfläche speziell für die Trennung von Säuren und Basen behandelt. Als mobile Phase kam ein Gradient aus Methanol und 1 % iger wässriger Ameisensäure zur Anwendung (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.6). Die Ameisensäure diente dabei zur Protonierung der Cichoriensäure. Durch den Ameisensäure-Zusatz konnte das Retentionsverhalten und die Peakform der Säure erheblich verbessert werden. Die Parameter zur Ionisierung und zum Ionentransfer wurden aus den FIA-Experimenten übernommen. In Abbildung 52 ist ein SIM Chromatogramm einer Cichoriensäure-Standardlösung dargestellt.

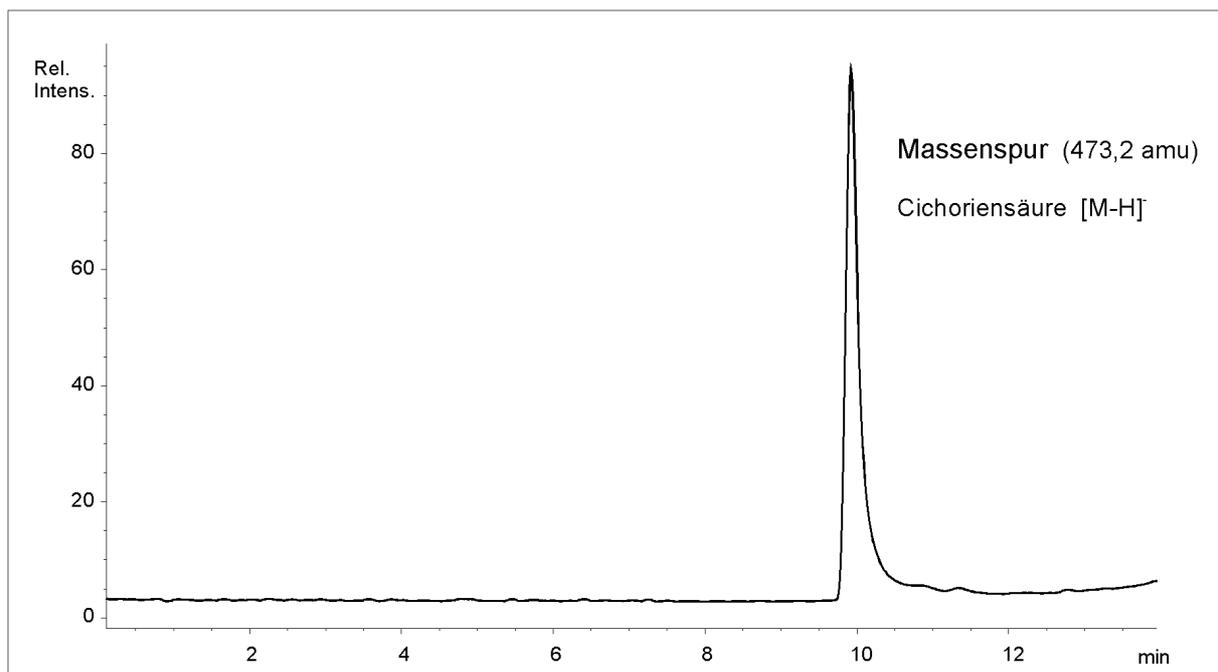


Abbildung 52 HPLC API-ES MS Trennung von isolierter Cichoriensäure (neg. Ionenmodus), Darstellung einer Massenspur [M-H]⁻

Der Cichoriensäure-Peak zeigt ein deutliches Tailing. Die Verwendung anderer Trennmateriale und Eluenten führte zu keiner Verbesserung der Peakform. Auch das in der Literatur beschriebene optimierte Trennsystem von Bauer, das mit einer RP-18 Säule (LiChrospher 100 RP-18, Fa. Merck) und einem Gradienten aus

Acetonitril und 0,1 % iger wässriger ortho-Phosphorsäure arbeitete, führte zu einem Peaktailing [104].

Bestimmung von Cichoriensäure in Emulsionen

Zur Entwicklung einer Extraktionsmethode wurden handelsübliche O/W- und W/O-Emulsionen ohne Pflanzenextrakt mit Cichoriensäure dotiert (vgl. Abschnitt 9.1.5) und mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert. Die Verwendung von THF, Methanol und Wasser führte zu einer quantitativen Extraktion und zu keiner negativen Beeinträchtigung der chromatographischen Trennung. Der extrahierte Analyt kann nach Membranfiltration ohne weitere Probenvorbereitung direkt ins LC/MS System injiziert werden (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.6). Abbildung 53 zeigt ein Chromatogramm einer W/O-Emulsion.

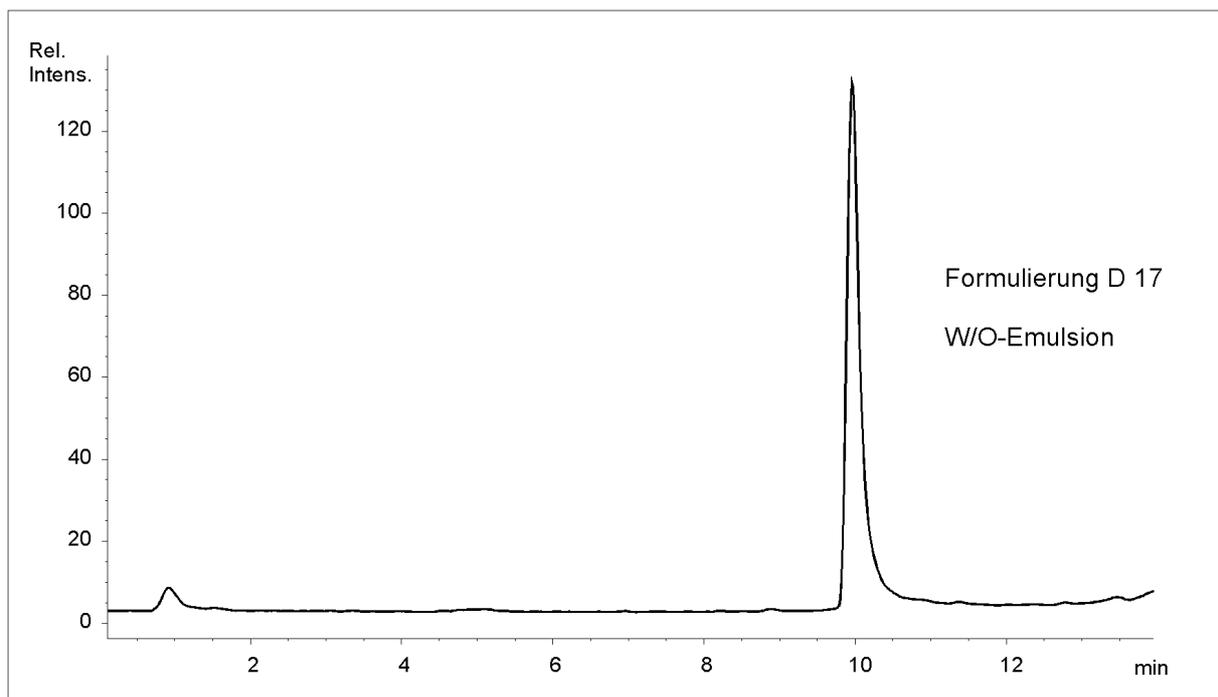


Abbildung 53 HPLC API-ES MS Trennung von einer W/O-Emulsion mit 0,5 % Echinacea purpurea-Extrakt (D17) (neg. Ionenmodus), Darstellung einer Massenspur [M-H]⁻

Bestandteile der Emulsionsmatrix führen in einer W/O-Emulsion mit Echinacea purpurea-Extrakt zu keiner Beeinträchtigung der chromatographischen Trennung. In gleicher Art und Weise stellt sich die Bestimmung von Cichoriensäure in einer O/W-Emulsion dar.

Methodenvalidierung

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Methode wurde anhand von Cichoriensäure-Standardlösungen ermittelt. Die Bestimmung der Wiederfindungsrate erfolgte mit kosmetischen Formulierungen, die mit Cichoriensäure dotiert wurden. Die Reproduzierbarkeit wurde mit Wiederholbestimmungen von W/O- und O/W-Emulsionen mit 0,5 % Echinacea purpurea-Extrakt E 1 untersucht. Die ermittelten Validierungsparameter sind in Tabelle 15 angegeben.

Tabelle 15 Validierungsparameter der LC/MS Bestimmung von Cichoriensäure in kosmetischen Formulierungen

	NWG [ng/ml]	BSG [ng/ml]	WFR [%]	Rel. Stabw. [%]
Cichoriensäure	50	100	106,6	0,83

NWG Nachweisgrenze (S/N 3:1)

BSG Bestimmungsgrenze (S/N 10:1)

WFR Wiederfindungsrate, Mittelwert O/W- und W/O-Emulsionen (n=6)

Rel. Stabw. Relative Standardabweichung, Mittelwert O/W- und W/O-Emulsionen (n=6)

Es wurden für Cichoriensäure eine Nachweisgrenze von 50 ng/ml und eine Bestimmungsgrenze von 100 ng/ml erreicht. Ein Grund für die relativ geringe Nachweispfindlichkeit der Cichoriensäure liegt in der breiten Peakform. Anhand der Wiederfindungsrate wird deutlich, dass die Matrix nur einen sehr geringen Einfluss auf die Bestimmung der Cichoriensäure hat. Daher ist eine Matrixkalibrierung zur Quantifizierung der Cichoriensäure nicht erforderlich. Aufgrund der sehr guten Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode kann bei den folgenden Untersuchungen auf Wiederholbestimmungen verzichtet werden.

5.5.2 Cichoriensäure-Gehalte in pflanzlichen Rohstoffen

Es wurden Echinacea purpurea-Extrakte unterschiedlicher Pflanzenteile und Extraktionsverfahren auf ihre Cichoriensäure-Gehalte untersucht (vgl. Abschnitt 9.1.5). Die Gehalte sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16 Ermittelte Gehalte an Cichoriensäure in verschiedenen *Echinacea purpurea*-Extrakten

Gehalte [%]	Extrakt E 1	Extrakt E 2	Extrakt E 3	Extrakt E 4
Cichoriensäure	4,1	0,2	n.n.	n.

n.n. nicht nachweisbar

n. nachweisbar

Die untersuchten Extrakte verschiedener Hersteller weisen große Unterschiede in ihren Cichoriensäure-Gehalten auf. Während in drei Extrakten nur Spuren (wässrig-alkoholische Extrakte E 2 und E 4) oder überhaupt keine Cichoriensäure nachweisbar waren (Wurzel-Extrakt E 3), war im Extrakt E 1 (getrockneter Preßsaft) eine sehr hohe Cichoriensäurekonzentration von 4,1 % enthalten.

5.5.3 Lagerstabilität in Emulsionen

Es wurden eine handelsübliche O/W- und W/O-Emulsion mit 0,5 % *Echinacea purpurea*-Extrakt E 1 hergestellt (vgl. Abschnitt 9.1.5) und für 6 Monate bei +6 °C, +40 °C, bei Raumtemperatur und Raumtemperatur unter Lichteinfluss gelagert. Die Formulierungen wurden direkt nach der Herstellung sowie nach 1, 3 und 6 Monaten auf ihre Cichoriensäure-Gehalte untersucht (Abbildung 54).

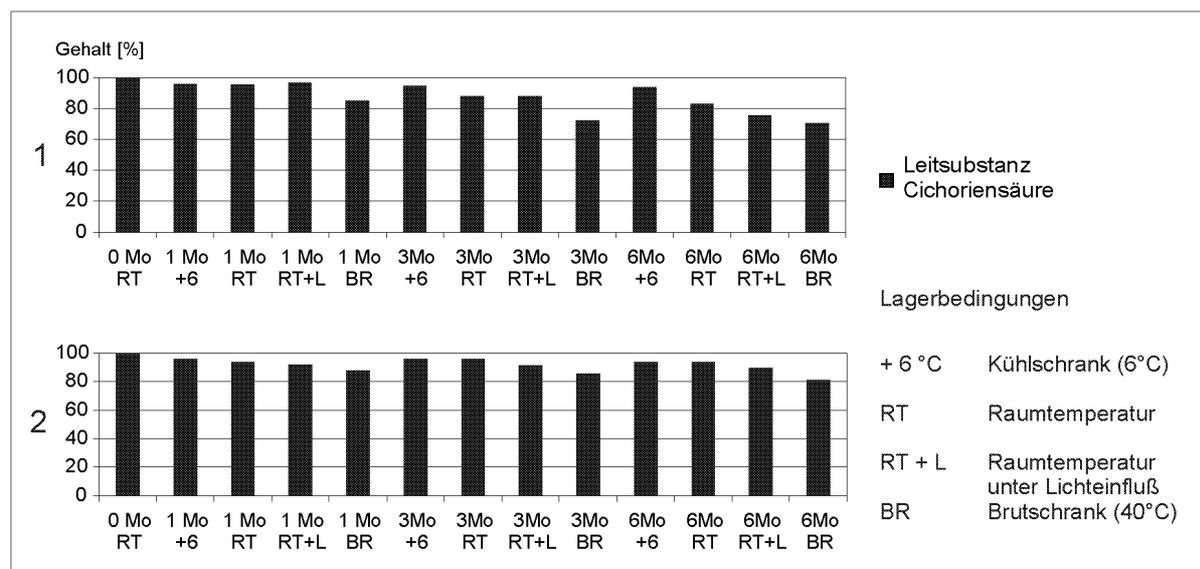


Abbildung 54 Stabilität von Cichoriensäure in Emulsionen mit 0,5 % *Echinacea purpurea*-Extrakt während einer Lagerzeit von 6 Monaten: 1. O/W-Emulsion (D 16), 2. W/O-Emulsion (D 17)

Der Cichoriensäure-Gehalt nimmt während der Lagerung über 6 Monate in den kosmetischen Formulierungen ab. Während in den +6 °C-Mustern nach 6 Monaten in beiden Formulierungen noch ca. 94 % des Anfangsgehaltes bestimmt wurden, war der Abbau bei den +40 °C-Proben mit Gehalten von 70 bzw. 80 % besonders deutlich. Der erhöhte Abbau der Cichoriensäure in den bei +40 °C gelagerten Emulsionen wird während der gesamten Lagerzeit beobachtet. Beim Vergleich der beiden Emulsionen zeigt sich eine erhöhte Stabilität der Cichoriensäure in der W/O-Emulsion (D 17). Dieser Trend zeigt sich besonders deutlich mit zunehmender Lagerzeit. Die Stabilisierung von Cichoriensäure in Emulsionen ist innerhalb dieser Studie nicht untersucht worden, ist aber für zukünftige Projekte durchaus erforderlich.

5.5.4 Penetrationseigenschaften von Echinacea purpurea-Extrakten

Die Penetrationseigenschaften von Echinacea purpurea-Extrakten wurden anhand der Leitsubstanz Cichoriensäure mit Hilfe des in vitro Schweinehautmodells untersucht (vgl. Abschnitt 9.2.1 und 9.2.6). In dieser Studie wurde eine handelsübliche O/W-Emulsion mit 7 % Echinacea purpurea-Extrakt E 1 (Formulierung D 10, vgl. Abschnitt 9.1.5) verwendet.

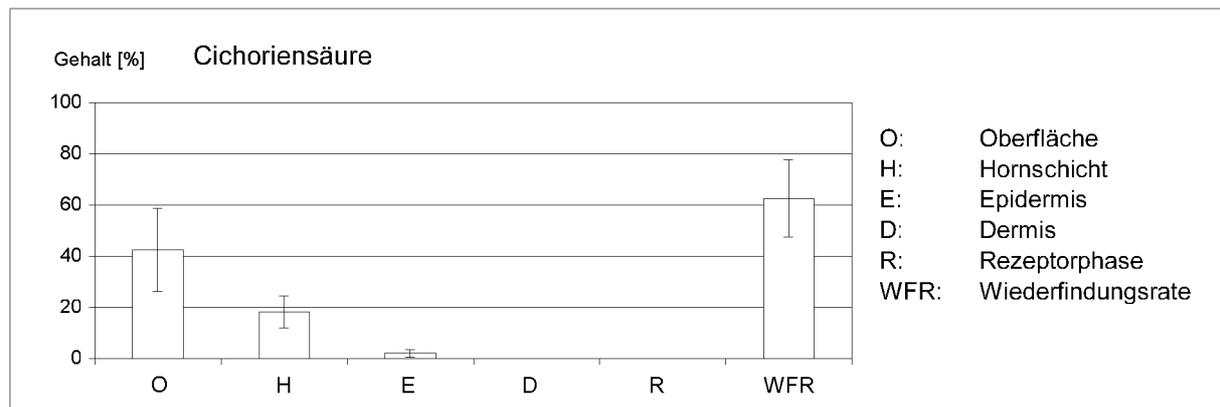


Abbildung 55 Ergebnisse der in vitro Penetrationsstudie; Verteilung von Cichoriensäure auf bzw. in der Haut

Rund 40 % der applizierten Cichoriensäure penetrierte nicht und verblieb auf der Hautoberfläche, während 18 % in die Hornschicht und 2 % in die lebenden Zellen der Epidermis penetrierte. In der Dermis und Rezeptorphase konnte in dieser

Penetrationsstudie keine Cichoriensäure nachgewiesen werden. 62,5 % der unveränderten, applizierten Prüfsubstanz wurden in der Penetrationsstudie wiedergefunden. Ein enzymatischer Abbau der Cichoriensäure während der Penetration ist wahrscheinlich, da in einer weiteren Studie eine Inkubation von Cichoriensäure mit zerkleinerter Schweinehaut innerhalb von 20 Stunden bei Raumtemperatur zu einem vollständigen Abbau der Substanz führte. Bei Lagerung der Cichoriensäure ohne Schweinehaut wurde unter sonst gleichen Bedingungen ein Abbau von lediglich 5 % ermittelt.

Mit Hilfe des *in vitro* Schweinehautmodells konnte gezeigt werden, dass Cichoriensäure in lebende Zellschichten der Epidermis penetriert, während eine perkutane Absorption des unveränderten Wirkstoffs in die Rezeptorphase nicht nachgewiesen werden konnte.

6 Diskussion

Die in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenextrakte wurden wegen ihrer in der Literatur beschriebenen hautpflegenden Eigenschaften ausgewählt (vgl. Abschnitt 3). Extrakte aus Grünem Tee führen nach topischer Applikation dank ihrer antioxidativen Eigenschaften zu einer Verringerung des oxidativen Stresses von Hautzellen und schützen somit vor einer Hautschädigung. Extrakte aus *Calendula officinalis*, *Glycyrrhiza glabra*, *Terminalia sericea* und *Echinacea purpurea* wurden für die Studien aufgrund ihrer entzündungshemmenden und antiirritativen Wirkung ausgewählt.

Die Analytik der komplex zusammengesetzten Pflanzenextrakte im Rohmaterial, in den kosmetischen Mitteln sowie in den Penetrationsproben erfolgte anhand von Leitsubstanzen, die zur kosmetischen Wirksamkeit beitragen. Da die antioxidative Wirkung von Grüntee-Extrakten hauptsächlich auf ihren Gehalten an Catechinen beruht, erfolgte die Bestimmung mit Hilfe ausgewählter Catechine als Leitsubstanzen. Aufgrund ihres Gehaltes in den Extrakten und ihrer beschriebenen Wirksamkeit wurden hierbei Catechin, Epicatechin, Epigallocatechin, Epigallocatechingallat und Epicatechingallat verwendet. In den Extrakten aus *Calendula officinalis*, *Glycyrrhiza glabra* und *Terminalia sericea* sind Triterpenoide für die entzündungshemmende und antiirritative Wirkung verantwortlich. Während im *Calendula officinalis*-Extrakt die Faradiolester als Leitsubstanzen ausgewählt wurden, erfolgte die Bestimmung des *Glycyrrhiza glabra*-Extraktes anhand von Glycyrrhizinsäure und 18 β -Glycyrrhetinsäure. Im *Terminalia sericea*-Extrakt wurde Sericosid als wirksamer Inhaltsstoff bestimmt. Die Wirkung des *Echinacea purpurea*-Extraktes wird u. a. der Cichoriensäure zugeschrieben; daher wurde diese als Leitsubstanz zur Quantifizierung ausgewählt.

6.1 Analytik

Camellia sinensis

Mit Hilfe der LC/MS Methode konnten neben 8 Grüntee-Catechinen noch Gallussäure chromatographisch getrennt und massenselektiv detektiert werden. Die Trennung erfolgte an einer RP-8 Säule, wobei als Eluent ein Gradient aus Methanol und 0,1 % wässriger Ameisensäure zum Einsatz kam (vgl. Abschnitt 9.2.2). Die interessierenden Verbindungen konnten ohne aufwendige Probenvorbereitung sowohl im Pflanzenextrakt-Rohstoff als auch in den Emulsionen und Penetrationsproben bestimmt werden. Mit Nachweisgrenzen von 5 bis 15 ng/ml an einzelnen Catechinen in den Formulierungen konnte eine empfindliche Methode etabliert werden. Mit relativen Standardabweichungen von unter 3 % zeigt die Methode eine gute Reproduzierbarkeit (vgl. Abschnitt 5.1.1).

Die Bestimmung von Grüntee-Catechinen wird auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Höhne und Engelhard [126] und Arce et al. [127] analysierten Catechine in Tee mittels Kapillarelektrophorese (CE) in Kombination mit UV-Detektion. Die beschriebenen Methoden mittels Kapillarelektrophorese zeichnen sich durch kurze Analysenzeiten von weniger als 20 min aus. Aufgrund der geringen Nachweisempfindlichkeit ist die Kapillarelektrophorese in Verbindung mit der UV-Detektion jedoch nicht geeignet, Gehalte im unteren $\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich nachzuweisen, wie es bei der Analytik in kosmetischen Mitteln erforderlich ist. Andere Arbeitsgruppen verwenden zur Bestimmung von Catechinen HPLC Trennsysteme. Kuhr und Engelhardt [23] beschreiben eine HPLC Trennung mit UV-Detektion nach Festphasenextraktion. Sie verwendeten eine RP-18 Trennsäule und einen Gradienten aus Acetonitril und 2 % wässriger Essigsäure. Die Methode zeichnet sich durch relative Standardabweichungen von 5 bis 10 % aus. Kiehne und Engelhardt [128] trennten Catechine ebenfalls mit Hilfe von *reversed-phase* Material nach Festphasenextraktion. Die Detektion erfolgte hier durch direkte Kopplung mit einem Thermospray-Massenspektrometer. Die Catechine wurden im positiven Ionenmodus hauptsächlich als $[\text{M}+\text{H}]^+$ Quasimolekülonen ionisiert. Die mit Gallussäure veresterten Catechine zeigten noch weitere Signale, die durch Spaltung der Esterbindung entstanden sind. Während die erste HPLC Methode mit einer aufwendigen Probenvorbereitung und

einer unselektiven UV-Detektion verbunden ist, liefert die zweite Methode unter Verwendung eines Massenspektrometers neben einer selektiven Detektion noch Informationen zur Struktur der Analyten und kommt so der Methode der Wahl sehr nahe. Die in dieser Arbeit verwendete Kopplung einer RP-HPLC mit einem ESI-Massenspektrometer ermöglicht die Bestimmung von Catechinen ohne Festphasenextraktion nicht nur in Grüntee-Extrakten, sondern auch in komplexen kosmetischen Formulierungen und Penetrationsproben.

Durch einen Zusatz von 200 µg/ml Vit C konnten in dieser Arbeit die Catechine in der Messlösung stabilisiert werden, so dass eine reproduzierbare Bestimmung von großen Probenserien mittels automatischem Probengeber möglich ist. Nach 15 stündiger Lagerung bei Raumtemperatur wurden von den 5 untersuchten Catechinen Wiederfindungsraten von über 90 % ermittelt. Auch andere Arbeitsgruppen haben sich mit der Stabilisierung von Catechinen während der Analyse beschäftigt. Um einen oxidativen Abbau von Epigallocatechingallat während der Analyse zu vermeiden, verwenden Dvorakova et al. [129] ebenfalls einen Zusatz von Vit C. In der beschriebenen Methode wurden Hautproben und kosmetische Formulierungen mit einer Lösung aus Vit C und EDTA versetzt und anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Tsuchiya et al. [20] beschreiben eine RP-HPLC Methode zur Bestimmung von 8 Grüntee-Catechinen in menschlichem Speichel. Die Catechine werden nach Komplexierung mit Diphenylborat bei einem pH-Wert von 8,5 mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion isoliert. Durch diese Komplexierung konnten die Catechine während der Analyse stabilisiert werden.

Calendula officinalis

Es wurden Faradiollaurat, -myristat und -palmitat aus einem Calendula CO₂-Extrakt mittels präparativer DC und semipräparativer HPLC isoliert. Zur Identifizierung der Verbindungen wurden MS/MS-Fragmentierungsexperimente und NMR-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt (vgl. Abschnitt 9.2.3). Die NMR-Daten weisen gute Übereinstimmungen mit Untersuchungen von Zitterl-Eglseer et al. [63] auf. Diese Arbeitsgruppe konnte erstmalig Faradiolester aus Calendula officinalis-Blüten isolieren und charakterisieren. Nach wiederholter Säulenchromatographie und semipräparativer HPLC wurden die isolierten Faradiolester mittels Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie untersucht. In früheren Arbeiten

wurden Untersuchungen zur Struktur der Faradiolester nur nach Spaltung der Ester durchgeführt. Während die abgetrennten Triterpenalkohole mit spektroskopischen Methoden charakterisiert wurden, erfolgte die Identifizierung der entsprechenden Fettsäuren nach Methylveresterung mit Hilfe der Gaschromatographie [61, 130]. Während bei der massenspektrometrischen Untersuchung der Faradiolester nur Informationen über das Gesamtmolekül erhalten werden, erforderte die gaschromatographische Bestimmung der gebundenen Fettsäuren eine Umesterung. Mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten MS/MS-Ionenfallen-Fragmentierungsexperimente ist es möglich, die estergebundenen Fettsäuren ohne vorherige Spaltung direkt zu charakterisieren.

Es wurde eine Methode zur direkten Bestimmung der Faradiolester mit Hilfe der Kopplung Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie entwickelt. Nach Extraktion mit einem Lösungsmittelgemisch (vgl. Abschnitt 9.2.3) können die Faradiolester sowohl in Pflanzenextrakten als auch in kosmetischen Formulierungen und Hautproben ohne weitere Probenvorbereitung bestimmt werden. Die chromatographische Trennung der drei Faradiolester erfolgte unter Verwendung von RP-18 Material und eines wasserfreien Gradienten aus Methanol, tert-Butylmethylether und Ammoniumacetat. Die Methode zeichnet sich durch eine gute Reproduzierbarkeit (relative Standardabweichung < 5 %) und kurze Analysenzeiten von 26 min aus. Trotz der selektiven Detektion hat die komplexe kosmetische Matrix einen starken Einfluss auf die Ionisierung, so dass eine Matrixkalibrierung erforderlich ist (vgl. Abschnitt 5.2.1).

Die Analytik von Faradiolestern unter Verwendung von HPLC Trennsystemen wird auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Della-Loggia et al. [61] beschreiben die Verwendung von Kieselgel Trennsäulen, die mit Silberionen belegt sind. Mit Hilfe dieser HPLC Säulen erreichten sie bei der Untersuchung von Calendula-Extrakten eine Abtrennung der Faradiolester von Arnidolestern. Reznicek et al. [131] verwenden zur Bestimmung von Faradiolestern in Pflanzenextrakten und kosmetischen Formulierungen ein *reversed-phase* Trennsystem in Kombination mit einem UV-Detektor. Nach dünnschichtchromatographischer Vortrennung erfolgte die Bestimmung der Faradiolester auf einer RP-18 Trennphase mit einem Gradienten aus Methanol und wässriger Trifluoressigsäure. Aufgrund einer unselektiven Detektion bei 210 nm ist bei dieser Methode eine vollständige Abtrennung anderer Matrixbestandteile erforderlich. Dieses spiegelt sich auch in einer Analysenzeit von

über 70 min wider. Die DC ist eine schnelle, aber auch unempfindliche und unselektive Technik im Screening von Pflanzenextrakten auf ihre Faradiolester-Gehalte. Zur halbquantitativen Bestimmung von Faradiolestern in *Calendula officinalis*-Blüten verwendeten Zitterl-Eglseer et al. [132] Kieselgel als stationäre Phase und n-Hexan/Ethylacetat als mobile Phase. Die Detektion erfolgte mit einem Anisaldehyd-Sprühreagenz.

Die LC/MS Methode zeichnet sich gegenüber den beschriebenen Methoden anderer Arbeitsgruppen durch kurze Analysenzeiten in Verbindung mit einer selektiven und empfindlichen Detektion bei minimaler Probenvorbereitung aus.

Glycyrrhiza glabra

Es wurde eine LC/MS Methode zur Bestimmung von Glycyrrhizinsäure und 18 β -Glycyrrhetinsäure entwickelt. Die beiden Verbindungen werden unter Verwendung eines Gradienten aus Methanol und wässriger Ameisensäure an RP-18 Material getrennt (vgl. Abschnitt 9.2.4). Die Methode zeichnet sich durch geringe Probenvorbereitung, kurze Analysenzeiten und Bestimmungsgrenzen im unteren $\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich aus. Bei der Untersuchung von Hautproben und kosmetischen Formulierungen führte bei der Probenvorbereitung mitextrahierte Matrix zu keiner Beeinträchtigung der Bestimmung (vgl. Abschnitt 5.3.1).

Die Analytik von Glycyrrhizinsäure und 18 β -Glycyrrhetinsäure wird auch in der Literatur beschrieben. Während Chen und Sheu [133] die beiden Verbindungen in pharmazeutischen Produkten mittels CE untersuchten, verwendeten andere Arbeitsgruppen *reversed-phase* HPLC Trennsysteme in Kombination mit UV-Detektion [134, 135, 136]. Gerade bei der Untersuchung von matrixbelasteten Hautproben und kosmetischen Formulierungen bietet die massenselektive Detektion Vorteile gegenüber der UV-Detektion, da bei der MS-Detektion in der Regel eine zeitintensive Probenvorbereitung und eine aufwendige chromatographische Trennung nicht erforderlich ist.

Terminalia sericea

Zur Bestimmung von Sericosid in Pflanzenextrakten, kosmetischen Formulierungen und Hautextrakten wurde eine LC/MS Methode entwickelt (vgl. Abschnitt 9.2.5). Nach einer RP-HPLC Trennung in Verbindung mit einer massenselektiven Detektion wird im positiven Ionenmodus eine Bestimmungsgrenze von 0,5 ng/ml erreicht (vgl. Abschnitt 5.4.1). Bombardelli et al. [85] beschäftigten sich auch mit der Bestimmung von Sericosid in pflanzlichen Rohstoffen. Sie beschreiben die Verwendung einer *reversed-phase* Trennsäule in Kombination mit der UV-Detektion. Die unspezifische Detektion bei 205 nm ist jedoch auf Proben begrenzt, die nur eine geringe Matrixbelastung aufweisen.

Echinacea purpurea

Zur Charakterisierung der Cichoriensäure-Referenzsubstanz wurden UV- und NMR-spektroskopische Untersuchungen sowie MS/MS-Fragmentierungsexperimente durchgeführt (vgl. Abschnitt 9.2.6). Sowohl das UV-Spektrum als auch die ermittelten NMR-Daten zeigen gute Übereinstimmungen mit Untersuchungen von Soicke et al. [125] und Bauer et al. [89]. Weitere Strukturinformationen wurden mit Hilfe von MS/MS-Fragmentspektren erhalten. Die einzelnen Signale konnten möglichen Fragmenten von Cichoriensäure zugeordnet werden. Die MS/MS-Fragmentierung von Cichoriensäure wurde auch von Maffei Facino et al. [98] beschrieben, wobei diese Arbeitsgruppe die *fast atom bombardment tandem mass spectrometry* (FAB-MS/MS)-Technik im negativen Ionenmodus verwendete. Neben den in dieser Arbeit beschriebenen Fragmenten wurden mit Hilfe der FAB-Ionisierung noch zwei weitere Fragmente erhalten, die der Weinsäure sowie der Weinsäure nach Abspaltung von zwei Molekülen Wasser zugeordnet werden konnten.

Zur Bestimmung von Cichoriensäure in Pflanzenextrakten, kosmetischen Formulierungen und Hautextrakten wurde eine Methode zur chromatographischen Trennung und massenselektiven Detektion entwickelt. Die Trennung erfolgte an einer RP-18 Säule, wobei als Eluent ein Gradient aus Methanol und 1 % wässriger Ameisensäure zum Einsatz kam (vgl. Abschnitt 9.2.6). Infolge eines deutlichen Peaktailings wird nur eine Bestimmungsgrenze von 100 ng/ml in den kosmetischen Formulierungen

erhalten. Mit einer relativen Standardabweichung von unter 1 % zeigt die LC/MS Methode jedoch eine sehr gute Reproduzierbarkeit (vgl. Abschnitt 5.5.1).

Die Analytik von Cichoriensäure wird auch in der Literatur beschrieben. Bauer und Bauer et al. verwendeten die RP-HPLC Technik in Verbindung mit der UV-Detektion [137, 104]. Es kamen verschiedene Gradienten aus Acetonitril, Wasser und Phosphorsäure zum Einsatz. Aber auch diese chromatographischen Trennsysteme weisen ein deutliches Peaktailing auf. Ein derartiger Eluent unter Zusatz von Phosphorsäure konnte in dieser Arbeit nicht verwendet werden, da bei der direkten Kopplung der Flüssigchromatographie mit der ESI-Massenspektrometrie die Verwendung flüchtiger Puffer notwendig ist. Die Charakterisierung von Echinacea-Extrakten kann auch mit Hilfe dünnschichtchromatographischer Fingerprints erfolgen [89]. Diese Methodik ist jedoch aufgrund ihrer geringen Selektivität und Empfindlichkeit auf Proben beschränkt, die relativ hohe Analytgehalte und eine geringe Matrixbelastung aufweisen.

6.2 Untersuchungsergebnisse

6.2.1 Gehalte an kosmetisch wirksamen Inhaltsstoffen in den Extrakten

Die Grüntee-Extrakte unterschiedlicher Herstellungsverfahren bzw. verschiedener Hersteller weisen erhebliche Unterschiede in ihren Catechin-Gehalten auf (vgl. Abschnitt 5.1.2). Während im Extrakt G 2 nach wässriger Extraktion und Sprühtrocknung ein Catechin-Gehalt von ca. 12 % ermittelt wurde, enthält der mit Catechinen angereicherte Extrakt G 4 mehr als 50 % Catechine. Bezüglich der Wirkstoffgehalte wäre die Verwendung von Extrakt G 4 zur Herstellung kosmetischer Formulierungen zu empfehlen. Neben dem Wirkstoffgehalt sind aber auch andere Parameter wie die in vivo und in vitro Wirksamkeit, Toxizität, Geruch, Farbe, Löslichkeit und nicht zuletzt der Rohstoffpreis wichtig. In dieser Arbeit wurden die Extrakte G 1 und G 2 verwendet. Anhand verschiedener Chargen des Extraktes G 2 konnte gezeigt werden, dass neben dem Herstellungsverfahren auch andere Faktoren wie z. B. der Erntezeitpunkt sowie Ernte- und Lagerbedingungen einen Einfluss auf den Wirkstoffgehalt haben. Schwankungen im Wirkstoffgehalt innerhalb verschiedener Chargen pharmazeutischer Produkte unter Zusatz von Pflanzenextrakten wurde auch von Bauer beobachtet, der Echinacea purpurea Presssaft-Präparate auf Cichoriensäure- und Alkamid-Gehalte untersuchte [104].

Der verwendete Calendula officinalis-Extrakt wurde durch Hochdruckextraktion von Calendula officinalis-Blüten mit überkritischem Kohlendioxid (CO₂) hergestellt. Der Gehalt an Faradiolestern in dem Extrakt beträgt nach Herstellerangaben 22,1 %. Die Verwendung von überkritischem CO₂ eignet sich besonders gut zur Extraktion von Calendula officinalis-Blüten, da auf diese Weise lipophile Extrakte mit einem hohen Gehalt an Faradiolestern gewonnen werden. Untersuchungen von Della Loggia et al. [60] zeigen, dass ein Calendula CO₂-Extrakt eine wesentlich höhere entzündungshemmende Wirkung aufweist als ein wässrig-alkoholischer Extrakt. Ein Vorteil der Extraktion mit CO₂ gegenüber organischen Lösungsmitteln besteht auch darin, dass durch die Verwendung von CO₂ keine Probleme mit Lösungsmittelrückständen in den Extrakten auftreten.

Der Einfluss der Polarität des Extraktionsmittels auf den Wirkstoffgehalt wird auch bei den untersuchten *Glycyrrhiza glabra*-Extrakten deutlich (vgl. Abschnitt 5.3.2). Während die mit Hilfe polarer Lösungsmittel hergestellten Extrakte S 1 - S 4 Glycyrrhizinsäure-Gehalte von 0,165 bis 6,445 % aufweisen, war in der mit Jojoba Öl hergestellten Probe S 5 keine Glycyrrhizinsäure nachweisbar. Der Gehalt des sprühgetrockneten Extraktes S 3 an Glycyrrhizin- und 18 β -Glycyrrhetinsäure ist erwartungsgemäß um ein Vielfaches höher als in den flüssigen Extrakten, da diese zum größten Teil aus Lösungsmittel bestehen. Bei den Extrakten S 1 und S 2 eines Herstellers korrelieren die Wirkstoffgehalte mit den angegebenen Trockenmassen der Extrakte. Extrakt S 2 mit einer Trockenmasse von über 6 % weist auch ungefähr doppelt so hohe Gehalte auf wie Extrakt S 1 mit einer Trockenmasse > 3 %. Trotz der guten Korrelation in diesem Fall wird im allgemeinen durch die Angabe eines Gesamtextraktgehaltes nur ein sehr niedriges Qualitätsniveau festgeschrieben [7]. Zur Untersuchung der Lagerstabilität und des Penetrationsverhaltens wurde der Extrakt S 1 verwendet, der auf eine Trockenmasse von mindestens 3 % standardisiert ist.

Während die zuvor beschriebenen Pflanzenextrakte komplexe Gemische mit einem meist geringen Anteil an wirksamen Inhaltsstoffen darstellen, handelt es sich beim *Terminalia sericea*-Extrakt T 1 um einen fast reinen pflanzlichen Einzelwirkstoff. Der durch alkoholische Extraktion und anschließende Umkristallisation gewonnene Extrakt enthält 86,2 % an dem kosmetisch wirksamen Sericosid (vgl. Abschnitt 5.4.2). Neben dem hohen Wirkstoffgehalt zeichnet sich dieser Extrakt auch durch seine Farb- und Geruchlosigkeit aus.

Die *Echinacea purpurea*-Extrakte weisen erhebliche Unterschiede in ihren Cichoriensäure-Gehalten auf (vgl. Abschnitt 5.5.2). Während in den drei Extrakten E 2 - E 4 nur Spuren bzw. überhaupt keine Cichoriensäure nachweisbar waren, war im Extrakt E 1 (getrockneter Presssaft) ein Gehalt von 4,1 % enthalten. Anhand der Untersuchungsergebnisse wird der Einfluss der verwendeten Pflanzenteile auf die Zusammensetzung der Extrakte deutlich. Während in den Extrakten aus frischem Sonnenhutkraut Cichoriensäure nachgewiesen wurde, enthielt der Wurzel-extrakt E 3 keine Cichoriensäure. Der Einfluss der verwendeten Pflanzenteile auf

den Cichoriensäure-Gehalt von Echinacea Drogen wurde auch von Bauer et al. untersucht [89]. Während in den Blüten Gehalte von 2,2 % ermittelt wurden, waren in den Sprossachsen nur noch 0,4 % enthalten. Weitere Untersuchungen von Bauer ergaben, dass bei Echinacea-Extrakten neben den verwendeten Pflanzenteilen besonders der Herstellungsprozess einen Einfluss auf den Cichoriensäure-Gehalt hat. Es wird vermutet, dass pflanzeneigene Enzyme während der Herstellung der Extrakte an einem Abbau von Cichoriensäure beteiligt sind. Werden durch einen speziellen Herstellungsprozess die entsprechenden Enzyme inaktiviert, weisen die Extrakte wesentlich höhere Gehalte auf [104].

6.2.2 Untersuchung der Lagerstabilitäten

Die Lagerung der kosmetischen Formulierungen erfolgte bei +6 °C, +40 °C, Raumtemperatur und Raumtemperatur unter Lichteinfluss über eine Dauer von 6 Monaten. Durch die Auswahl einer relativ großen Temperaturspanne und den Einfluss von Sonnenlicht bei der Lagerung können auch schon nach einer Lagerzeit von 6 Monaten Rückschlüsse auf ein späteres Mindesthaltbarkeitsdatum der entwickelten Formulierungen getroffen werden. Gerade in der Anfangsphase der Entwicklung neuer kosmetischer Mittel ist es erforderlich, in einer relativ kurzen Zeit Daten zur Lagerstabilität der entsprechenden Produkte bzw. der eingesetzten Wirkstoffe zu erhalten. Die Formulierungen wurden in dieser Arbeit direkt nach der Herstellung sowie nach 1, 3 und 6 Monaten auf ihre Wirkstoffgehalte untersucht. Durch die kurzen Untersuchungsintervalle ist es möglich, schon vor Ablauf der 6 monatigen Lagerung auf einen eventuellen Abbau der Wirkstoffe zu reagieren.

Camellia sinensis

Die untersuchten Grüntee-Catechine zeigen sowohl in den nicht stabilisierten W/O-Emulsionen (N 27, E 26) als auch in der O/W-Emulsion (E 32) einen starken Abbau während der Lagerung. Nach 6 monatiger Lagerung bei +40 °C sind die Catechine in den Formulierungen nur noch in Spuren oder überhaupt nicht mehr nachweisbar. In dieser Studie unterlagen Epigallocatechin und Epigallocatechingallat als oxidationsempfindlichere Substanzen in der Regel einem stärkeren Abbau als Catechin,

Epicatechin und Epicatechingallat. Dieser Trend konnte über die gesamte Lagerzeit von 6 Monaten beobachtet werden. Der Abbau der Catechine während der Lagerung war mit einer Farbveränderung der Formulierungen von fast weiß nach leicht braun verbunden (vgl. Abschnitt 5.1.3 bis 5.1.6).

Dvorakova et al. machten während der Lagerung einer hydrophilen Salbengrundlage mit 10 % Epigallocatechingallat ähnliche Beobachtungen [129]. Nach einer zweiwöchigen Lagerung bei +37 °C wurde ein starker Abbau an Epigallocatechingallat bestimmt, verbunden mit einer leichten Braunfärbung der Proben. In der Formulierung waren bereits nach zweitägiger Lagerung bei 37 °C 10 % der eingesetzten Menge abgebaut. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Braunfärbung durch rotbraune Oxidationsprodukte der Catechine entsteht. Auch bei der Herstellung des schwarzen Tees aus Teeblättern werden die enthaltenen Catechine, die farblose Substanzen darstellen, zu rotbraunen Kondensationsprodukten oxidiert. Diese Kondensationsprodukte zählen zu den Theaflavinen und Thearubiginen [18].

Zur Stabilisierung der Catechine wurden den kosmetischen Formulierungen Lichtschutzfilter, BHT, Vit C und EDTA zugesetzt. Während ein Zusatz von Lichtschutzfiltern und EDTA zu einer O/W-Emulsion (N 24) zu keiner erkennbaren Veränderung der Lagerstabilität gegenüber einer nicht stabilisierten O/W-Emulsion führt, hat ein Zusatz von BHT in der W/O-Emulsion (N 28) einen prooxidativen Effekt. In den bei +40 °C gelagerten Proben führt ein Zusatz von 0,05 % BHT zu einem vollständigen Abbau der Grüntee-Catechine. Dieser prooxidative Effekt von BHT konnte in der O/W-Emulsion nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zu Dvorakova et al. [129], die durch Zusatz von BHT eine hydrophile Salbengrundlage mit 10 % Epigallocatechingallat stabilisierten, führte der Zusatz von BHT bei den in dieser Arbeit untersuchten Formulierungen zu keiner Verbesserung der Lagerstabilität.

Durch Zusatz von 0,2 % Vit C konnte die Stabilität der Grüntee-Catechine in W/O- und O/W-Emulsionen deutlich erhöht werden. In den Formulierungen E 27 und E 21 wurden nach 6 Monaten Wiederfindungsraten von 70-80 % bei Raumtemperatur und 40-60 % bei +40 °C ermittelt. Eine Erhöhung der Vit C-Konzentration in den

Formulierungen führte nur bei den O/W-Emulsionen zu einer geringen Verbesserung der Lagerstabilität. Untersuchungen der Vit C-Gehalte ergaben, dass mit Ausnahme der Formulierung E 21 (Lichtmuster) in allen Formulierungen nach 6 monatiger Lagerung noch Ascorbinsäure nachzuweisen war. Somit war in fast allen Formulierungen nach einer Lagerzeit von 6 Monaten noch ein gewisser oxidativer Schutz vorhanden.

Ein Erklärungsansatz für die bessere Wirksamkeit von Vit C gegenüber BHT bietet die Polarität der beiden Verbindungen. Während Vit C ebenso wie die Grüntee-Catechine in der wässrigen Phase der Emulsion gelöst ist, befindet sich das lipophile BHT in der Ölphase der Emulsion.

Calendula officinalis

Der Calendula-Extrakt weist in den untersuchten Formulierungen eine sehr gute Lagerstabilität auf, sofern die Proben unter Lichtausschluss gelagert werden. Nur unter Einfluss von Sonnenlicht kommt es zu einem deutlichen Abbau der Faradiolester, der sich in Wiederfindungsraten von 40-50 % nach einer Lagerzeit von 6 Monaten widerspiegelt. Durch einen Zusatz der Antioxidantien BHT und Tocopherolacetat konnte die Wiederfindungsrate nach 6 Monaten auf fast 80 % gesteigert werden (vgl. Abschnitt 5.2.3). Zitterl-Eglseer et al. [138] untersuchten ebenfalls die Stabilität von Faradiolestern in Formulierungen mit Calendula-Extrakt. Anhand von Faradiolmyristat als Leitsubstanz zeigten Zitterl-Eglseer et al., dass die untersuchten Salben bei längeren Lagerzeiten keine hohen Verluste an Faradiolestern aufwiesen. Bei den Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe ist jedoch davon auszugehen, dass die Proben in Tuben unter Ausschluss von Sonnenlicht gelagert wurden.

Die Stabilitätssteigerung der Faradiolester in den Lichtmustern durch Zusatz von Antioxidantien deutet auf einen durch Sonnenlicht induzierten, oxidativen Abbau der Faradiolester während der Lagerung hin. Ein durch UV-Strahlen induzierter Abbau der Faradiolester ist jedoch nicht wahrscheinlich, da ein Zusatz von UV-Lichtschutzfiltern zur Formulierung E 41 nicht zur Verbesserung der Lagerstabilität führte. Auch ein direkter Abbau der Faradiolester durch sichtbares Licht kann ausgeschlossen werden, da Faradiolester als farblose Verbindungen nur Licht im

UV-Bereich absorbieren (siehe UV-Spektren). Ein möglicher Abbaumechanismus der Faradiolester wäre über die im Calendula-Extrakt enthaltenen Carotinoide denkbar. Carotinoide absorbieren als farbige Verbindungen sichtbares Licht und werden als oxidationsempfindlich beschrieben [139]. So könnten Oxidationsprodukte der Carotinoide in Sekundärreaktionen zu einem Abbau der Faradiolester führen. Auf einen Carotinoid-Abbau deutet auch eine Entfärbung der Formulierungen während der Lagerung unter Lichteinfluss hin.

Glycyrrhiza glabra

Der Glycyrrhiza glabra-Extrakt weist in den untersuchten W/O- und O/W-Emulsionen eine gute Lagerstabilität auf, wenn man die Gehalte an Glycyrrhizinsäure betrachtet. Nach einer Lagerzeit von 6 Monaten wurden in den Formulierungen zwischen 90 und 100 % der ursprünglichen Gehalte ermittelt. Die schwankenden Gehalte an 18 β -Glycyrrhetinsäure von 80 bis 111 % lassen keinen eindeutigen Trend erkennen (vgl. Abschnitt 5.3.3). Ein Anstieg der 18 β -Glycyrrhetinsäure-Konzentration während der Lagerung könnte durch einen Abbau der Glycyrrhizinsäure erklärt werden. Eine mögliche Aufspaltung von Glycyrrhizinsäure durch saure oder enzymatische Hydrolyse in ihr Aglykon 18 β -Glycyrrhetinsäure und Diglucuronsäure wird auch in der Literatur beschrieben [73]. Da in den Formulierungen jedoch ein pH-Wert von 5-6 vorherrscht und ein enzymatischer Abbau nicht zu erwarten ist, ist der Anstieg der 18 β -Glycyrrhetinsäure-Gehalte wahrscheinlich auf methodenbedingte Schwankungen zurückzuführen.

Terminalia sericea

Wie schon der Glycyrrhiza glabra-Extrakt zeigt auch der Terminalia sericea-Extrakt eine gute Lagerstabilität in kosmetischen Formulierungen. In allen untersuchten Formulierungen wurden mindestens 90 % des eingesetzten Sericosids wiedergefunden (vgl. Abschnitt 5.4.3). Gehalte über 100 % lassen sich wiederum auf gewisse methodenbedingte Schwankungen zurückführen. Die Lagerstabilität von Sericosid in einer kosmetischen Formulierung wurde auch von Bombardelli et al. [85] untersucht. Nach einer Lagerzeit von drei Monaten bei +35 °C sowie nach einem Jahr bei Raumtemperatur konnte diese Arbeitsgruppe keinen Abbau des Sericosids nachweisen.

Echinacea purpurea

Die Cichoriensäure zeigt während der Lagerung der Proben deutliche Abbaureaktionen, wobei in den +40 °C Proben und den Lichtproben die geringsten Gehalte ermittelt wurden. Nach einer 6 monatigen Lagerung bei +40 °C wurden in der O/W-Emulsion 70 % und in der W/O-Emulsion 80 % der eingesetzten Cichoriensäure wiedergefunden (vgl. Abschnitt 5.5.3). Als möglicher Abbaumechanismus ist die Hydrolyse der Cichoriensäure in Kaffeesäure und Weinsäure denkbar. Zur genauen Klärung dieser Fragestellung sind Untersuchungen der Formulierungen hinsichtlich der Gehalte an Kaffee- und Weinsäure erforderlich.

6.2.3 Untersuchung der Penetrationseigenschaften

Mit Hilfe des in vitro-Schweinehautmodells konnte gezeigt werden, dass keine der ausgewählten Leitsubstanzen der Pflanzenextrakte in unveränderter Form in die Rezeptorphase penetriert, d. h. es erfolgte keine perkutane Absorption. Unter perkutaner Absorption versteht man den Durchgang von Komponenten durch die Haut, wobei aber deren weitere Reaktivität in der Haut nicht angezeigt wird. Die Bestimmung der perkutanen Absorption erlaubt eine Abschätzung der systemischen Wirkung von kosmetischen Inhaltsstoffen nach topischer Applikation [112]. Da die Studien keine Hinweise auf eine systemische Wirkung der Leitsubstanzen geben, gibt es aus toxikologischen und pharmakologischen Gründen bezüglich dieser Ergebnisse keine Einschränkungen für deren Einsatz in kosmetischen Mitteln. Die Untersuchung der perkutanen Absorption wird auch in den COLIPA (*European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association*)-Richtlinien für kosmetische Inhaltsstoffe gefordert [140], wonach die Überprüfung der perkutanen Absorption eine entscheidende Rolle bei der Sicherheitsbewertung von kosmetischen Rohstoffen und Fertigprodukten spielt.

Die Penetrationsuntersuchungen geben weiterhin Hinweise auf eine mögliche kosmetische Wirksamkeit der pflanzlichen Inhaltsstoffe. Viele Aktivstoffe zeigen nur eine kosmetische Wirkung, wenn diese in die Hornschicht oder in tiefere Schichten der Epidermis penetrieren [141]. Es konnte gezeigt werden, dass 1 bis 3 % der Grüntee-Catechine in die lebenden Zellschichten der Epidermis penetrieren. In der Dermis

waren nur Epigallocatechin und Epicatechin in Spuren nachweisbar (vgl. Abschnitt 5.1.8). Die Penetrationseigenschaften von Epigallocatechingallat werden auch von Dvorakova et al. [129] beschrieben. In vitro Untersuchungen an menschlicher Haut ergaben, dass aus einer hydrophilen Salbengrundlage mit 10 % Epigallocatechingallat 0,9 % der applizierten Menge in die Haut penetrieren. Somit führte die in vitro Penetrationsstudie am Schweinehautmodell zu ähnlichen Ergebnisse wie die Untersuchungen an menschlicher Haut von Dvorakova et al. [129].

Die Penetration von Calendula CO₂-Extrakt aus einer O/W-Emulsion in die Haut wurde anhand der Leitsubstanzen Faradiolmyristat und Faradiolpalmitat untersucht. In den lebenden Zellschichten der Epidermis wurden nur Spuren der Faradiolester (< 1 %) nachgewiesen (vgl. Abschnitt 5.2.4). Eine Steigerung der Penetrationsrate könnte durch Verwendung von W/O-Emulsionen erreicht werden. Gerade lipophile Wirkstoffe penetrieren oftmals besser aus W/O-Emulsionen als aus O/W-Emulsionen [141].

Glycyrrhizinsäure, Leitsubstanz des Glycyrrhiza glabra-Extraktes, penetriert in unveränderter Form in geringen Mengen in die lebenden Zellen der Epidermis und in Spuren in die Dermis. Penetrationsuntersuchungen des Terminalia sericea-Extraktes zeigen, dass Sericosid aus einer O/W-Emulsion nur in geringem Maße in die Haut penetriert. In der Epidermis und Dermis wurden Gehalte von 1 % bzw. 0,3 % ermittelt (vgl. Abschnitt 5.4.4). Eine Verbesserung der Penetrationseigenschaften von Sericosid könnte durch eine Verkapselung des Sericosids mit Phospholipiden erreicht werden. Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass Stoffe leicht in die Haut penetrieren, wenn sie genauso gut oder etwas besser in Öl löslich sind als in Wasser [142]. Phospholipide zeigen mit ihren hydrophilen und hydrophoben Gruppen genau diese Eigenschaften. Bei den Penetrationsuntersuchungen des Echinacea purpurea-Extraktes penetrierte 2 % der applizierten Cichoriensäure in die Epidermis. In der Dermis wurde keine Cichoriensäure in unveränderter Form nachgewiesen (vgl. Abschnitt 5.5.4).

Anhand der Penetrationsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die untersuchten pflanzlichen Wirkstoffe durch die Hornschicht in tiefere Schichten der Epidermis und zum Teil auch in die Dermis penetrieren. Über Penetrationseigenschaften bzw. Bioverfügbarkeit nach topischer Applikation pflanzlicher

Wirkstoffe gibt es aber bisher kaum Vergleichsdaten. Die Einschätzung einer möglichen kosmetischen Wirkung der untersuchten pflanzlichen Inhaltsstoffe ist daher schwierig.

7 Zusammenfassung

Es wurden kosmetisch wirksame Leitsubstanzen in Pflanzenextrakten mit Hilfe der direkten Kopplung der Flüssigchromatographie mit einem Massenspektrometer (LC/MS) untersucht. Mit der Zielsetzung einer möglichen Steigerung der Hautpflegeleistung kosmetischer Mittel durch Zusatz von Pflanzenextrakten ist u. a. eine Charakterisierung der pflanzlichen Rohstoffe erforderlich. Neben der Charakterisierung der Pflanzenextrakte wurden Studien zur Lagerstabilität und zum in vitro Penetrationsverhalten in die Haut der Pflanzenextrakte durchgeführt.

Im einzelnen wurden Extrakte aus *Camellia sinensis* (Grüner Tee), *Calendula officinalis* (Ringelblume), *Glycyrrhiza glabra* (Süßholz), *Terminalia sericea* (Gelbholz) und *Echinacea purpurea* (Sonnenhut) untersucht. Zunächst wurden isolierte Leitsubstanzen der Pflanzenextrakte mit Hilfe massenspektrometrischer Fragmentierungsexperimente und NMR-spektroskopischer Untersuchungen charakterisiert. Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der pflanzlichen Leitsubstanzen wurden dann empfindliche und selektive Analysenverfahren mittels LC/MS entwickelt. Die Verwendung von polaren Lösungsmitteln bei der *reversed-phase* Chromatographie stabilisiert die Elektrospray-Ionisierung der Leitsubstanzen und ermöglicht eine Messempfindlichkeit, die eine direkte Bestimmung der Pflanzenextrakte in kosmetischen Formulierungen und Hautextrakten erlaubt. Eine aufwändige Probenvorbereitung ist nicht erforderlich.

Der Gehalt an Wirkstoffen ist ein wichtiger Parameter für die Qualität eines Pflanzenextraktes. Für den Einsatz in kosmetischen Mitteln sind neben dem Wirkstoffgehalt aber auch anderen Faktoren wie z. B. die in vivo und in vitro Wirksamkeit, Stabilität, Toxizität, Geruch und Löslichkeit von Bedeutung. Die Zusammensetzung der untersuchten Pflanzenextrakte variierte trotz gleicher INCI (*international nomenclature of cosmetic ingredients*)-Bezeichnung stark. Je nach verwendetem Pflanzenteil, Extraktionsmittel und Herstellungsverfahren zeigten die Pflanzenextrakte in ihren Gehalten an Leitsubstanzen starke Schwankungen. Während in einigen Extrakten die Leitsubstanzen nicht nachgewiesen werden konnten, betrug der Wirkstoffgehalt in anderen Extrakten zum Teil über 50 % der Trockenmasse. Anhand verschiedener Chargen eines Grüntee-Extraktes konnte gezeigt werden, dass neben

dem Herstellungsverfahren auch Faktoren wie z. B. Erntezeitpunkt sowie Ernte- und Lagerbedingungen einen Einfluss auf den Wirkstoffgehalt haben. Es wurde aufgrund der hohen Schwankungen an wirksamen Inhaltsstoffen gezeigt, dass vor der Herstellung kosmetischer Mittel eine Charakterisierung nicht standardisierter pflanzlicher Rohstoffe erforderlich ist.

Zur Untersuchung der Stabilität der Leitsubstanzen in kosmetischen Formulierungen wurden Emulsionen unter Zusatz der Pflanzenextrakte bis zu 6 Monate unter definierten Bedingungen gelagert und innerhalb bestimmter Intervalle mit den entwickelten LC/MS Methoden analysiert. Die in Grüntee-Extrakten antioxidativ wirksamen Catechine unterlagen während der Lagerung einem starken Abbau in den nicht stabilisierten Emulsionen, so dass nach 6 monatiger Lagerung bei +40 °C nur noch Spuren der Catechine nachweisbar waren. Durch Zusatz von 0,2 % Ascorbinsäure konnte die Stabilität der Grüntee-Catechine in Emulsionen soweit verbessert werden, dass nach 6 Monaten bei +40 °C Wiederfindungsraten von 40 bis 60 % erhalten wurden. Die in den Extrakten aus der *Calendula officinalis*, *Glycyrrhiza glabra* und *Terminalia sericea* für die entzündungshemmende und antiirritative Wirkung verantwortlichen Triterpenoide zeigen eine gute Stabilität während der Lagerung der kosmetischen Formulierungen. Lediglich unter Einfluss von Sonnenlicht unterlagen die Leitsubstanzen aus dem *Calendula officinalis*-Extrakt einem Abbau. Dieser Abbau konnte jedoch durch Zusatz von Antioxidantien verringert werden. Bei der in *Echinacea purpurea*-Extrakten kosmetisch wirksamen Cichoriensäure wurde ein Abbau während der Lagerung nachgewiesen, der zu Wiederfindungsraten von 70 bis 80 % nach 6 monatiger Lagerung bei +40 °C führte.

Mit Hilfe der *in vitro* Penetrationsstudien konnte gezeigt werden, dass die Wirkstoffe der Pflanzenextrakte in der Haut durch die Hornschicht in tiefere Schichten der Epidermis und zum Teil auch in die Dermis penetrieren. Weiterhin geben die durchgeführten Studien keine Hinweise auf eine systemische Wirkung der Pflanzenextrakte. Aus toxikologischer und pharmakologischer Sicht gibt es bezüglich dieser Testergebnisse keine Einschränkungen für den Einsatz der Pflanzenextrakte in kosmetischen Mitteln.

8 Summary

Cosmetically active principal components of plant extracts were studied by means of direct coupling of liquid chromatography with a mass spectrometer (LC/MS). Before plant extracts can be added to cosmetic preparations to possibly improve their skin-care performance, the plant raw materials first need to be characterized. In addition to characterizing the plant extracts, studies on the storage stability and *in vitro* penetration into the skin of plant extracts were performed.

Studied were extracts from *Camellia sinensis* (green tea), *Calendula officinalis* (marigold), *Glycyrrhiza glabra* (liquorice), *Terminalia sericea* (yellowwood) and *Echinacea purpurea* (purple coneflower). First the isolated active principal components of the plant extracts were characterized by means of mass spectrometric fragmentation experiments and NMR spectroscopic studies. Then sensitive and selective LC/MS methods were used for the qualitative and quantitative analysis of the plant active principal components. The use of polar solvents in reversed-phase chromatography stabilizes electrospray ionization of the principal components and enables a measuring sensitivity that permits a direct analysis of the plant extracts in cosmetic formulations and skin extracts. No time-consuming sample preparation is required.

The content of active substances is an important parameter for the quality of a plant extract. For their use in cosmetic preparations, however, other factors besides the active substance content are important such as the *in vivo* and *in vitro* efficacy, stability, toxicity, odor and solubility. The composition of the plant extracts studied varied considerably despite the same INCI (*international nomenclature of cosmetic ingredients*) name. The content of active principal components in the plant extracts varied strongly depending of the part of the plant, solvent and production process used. While the active principal components could not be detected in some extracts, in others the active substance content sometimes comprised more than 50 % of dry weight. Analysis of several batches of a green tea extract showed that other factors besides the production process, such as the date of harvest as well as the harvest and storage conditions, have an influence on the active substance content. It could be shown on the basis of large variations in active ingredients that it is necessary to

characterize non-standardized plant raw materials prior to the production of cosmetic preparations.

To study the stability of the principal components in cosmetic formulations, emulsions to which plant extracts had been added were stored under defined conditions for up to 6 months and analyzed at given intervals with the LC/MS methods developed. Degradation of the antioxidant catechins in green tea extracts was considerable in unstabilized emulsions during storage, so that after 6 months of storage at +40 °C just traces of catechins were detectable. After addition of 0.2 % ascorbic acid the stability of the green tea catechins improved so much that after 6 months at +40 °C a recovery rate of 40 to 60 % was obtained. The triterpenoids in the extracts from *Calendula officinalis*, *glycyrrhiza glabra* and *Terminalia sericea* responsible for the anti-inflammatory and anti-irritant effect show a good stability during storage of cosmetic formulations. The active principal components of the *Calendula officinalis* extract showed degradation only under the influence of sunlight. This degradation could, however, be reduced by addition of antioxidants. The cosmetically active cichoric acid in *Echinacea purpurea* extracts showed degradation during storage leading to recovery rates of 70 to 80 % after 6 months of storage at +40 °C.

It could be shown by means of in vitro penetration studies that active components of plant extracts in the skin penetrate through the horny layer into deeper layers of the epidermis and sometimes even into the dermis, but no evidence for a systemic effect of the plant extracts was obtained. Based on these test results, there is no need to restrict the use of plant extracts in cosmetic preparation from a toxicological or pharmacological standpoint.

9 Anhang

9.1 Pflanzenextrakte und kosmetische Formulierungen

9.1.1 Camellia sinensis

Extrakte

G 1 – G 3

Rohstoff: Grüner Tee
 Extrakt: Extraktion mit entmineralisiertem Wasser
 Sprühtrocknung
 hellbraunes homogenes Pulver
 löslich in Wasser
 G 1: Gesamtextrakt mit Catechinen angereichert
 G 2: Gesamtextrakt
 G 3: Rückstand nach Extraktion von Catechinen

G 4

Rohstoff: Grüner Tee
 Extrakt: Extraktion mit Wasser
 Sprühtrocknung
 rotbraunes homogenes Pulver
 löslich in Wasser
 mit Catechinen angereichert

Kosmetische Formulierungen

Tabelle 17 Zusammensetzung der kosmetischen Formulierungen N 27, 28, 31

Inhaltsstoffe [Gewichtsprozent -Gew.-%]	Formulierung (W/O-Emulsion, pH ca. 5*)		
	N 27	N 31	N 28
Fettphase	20,8	20,8	20,8
Wasserphase	67,1	65,9	66,05
Emulgatoren	5,0	5,0	5,0
Vit C	–	0,2	–
BHT	–	–	0,05
Grüntee-Extrakt G 1	0,1	0,1	0,1
Hilfsstoffe**	7,0	8,0	8,0

pH-Wert der Wasserphase

** Der Begriff Hilfsstoffe umfasst u. a.
 Konservierungsmittel, Emollentien, Emulsionsstabilisatoren, Viskositätsregler,
 Puffersubstanzen, Feuchtigkeitsspender

Tabelle 18 Zusammensetzung der kosmetischen Formulierungen N 24, 29, 30

Inhaltsstoffe [Gew.-%]	Formulierung (O/W-Emulsion, pH 5,1 - 5,2)		
	N 24	N 29	N 30
Fettphase	22,2	22,1	22,05
Wasserphase	69,3	73,2	73,4
Emulgatoren	2,0	2,0	2,0
EDTA	1,0	1,0	1,0
Lichtschutzfilter*	4,0	–	–
Vit C	–	0,2	–
BHT	–	–	0,05
Grüntee-Extrakt G 1	0,1	0,1	0,1
Hilfsstoffe	1,4	1,4	1,4

* Kombination aus UVA- und UVB-Lichtschutzfiltern

Tabelle 19 Zusammensetzung der kosmetischen Formulierungen E 32, 21, 24, 25

Inhaltsstoffe [Gew.-%]	Formulierung (O/W-Emulsion, pH 4,5 – 5,0)			
	E 32	E 21	E 24	E 25
Fettphase	22,1	21,9	22,1	21,9
Wasserphase	73,4	73,4	73,0	73,0
Emulgatoren	2,0	2,0	2,0	2,0
EDTA	1,0	1,0	1,0	1,0
Vit C	–	0,2	0,4	0,6
Grüntee-Extrakt G 2	0,1	0,1	0,1	0,1
Hilfsstoffe	1,4	1,4	1,4	1,4

Tabelle 20 Zusammensetzung der kosmetischen Formulierungen E 26, 27, 29, 30

Inhaltsstoffe [Gew.-%]	Formulierung (W/O-Emulsion, pH ca. 5*)			
	E 26	E 27	E 29	E 30
Fettphase	20,8	20,6	20,6	20,5
Wasserphase	67,1	67,1	66,9	66,8
Emulgatoren	5,0	5,0	5,0	5,0
Vit C	–	0,2	0,4	0,6
Grüntee-Extrakt G 2	0,1	0,1	0,1	0,1
Hilfsstoffe	7,0	7,0	7,0	7,0

* pH-Wert der Wasserphase

Tabelle 21 Zusammensetzung der kosmetischen Formulierung E 31

Inhaltsstoffe [Gew.-%]	Formulierung (O/W-Emulsion, pH 5,7)	
	E 31	
Fettphase	22,1	
Wasserphase	70,5	
Emulgatoren	2,0	
EDTA	1,0	
Vit C	–	
Grüntee-Extrakt G 2	3,0	
Hilfsstoffe	1,4	

9.1.2 Calendula officinalis

Extrakt

C 1

Rohstoff: Calendula officinalis-Blüten mit Kelch
 Extrakt: Hochdruckextraktion mit überkritischen Kohlendioxid
 dunkelrote bis braune Farbe
 wachsartige Konsistenz, flüssig bei 40 °C
 löslich in Ether

Kosmetische Formulierungen

Tabelle 22 Zusammensetzung der kosmetischen Formulierungen E 37, 38, 39

Inhaltsstoffe [Gew.-%]	Formulierung (O/W-Emulsion, pH 6,2 – 6,3)		
	E 37	E 38	E 39
Fettphase	1,0	1,0	1,0
Wasserphase	92,5	92,0	91,95
Emulgatoren	2,2	2,2	2,2
Tocopherol Acetat	–	0,5	0,5
BHT	–	–	0,05
Calendula officinalis-Extrakt C 1	0,1	0,1	0,1
Hilfsstoffe	4,2	4,2	4,2

Tabelle 23 Zusammensetzung der kosmetischen Formulierungen E 35, 41

Inhaltsstoffe [Gew.-%]	Formulierung	
	(O/W-Emulsion, pH 6,9) E 35	(O/W-Emulsion, pH 7,2) E 41
Fettphase	10,2	20,3
Wasserphase	85,4	65,8
Emulgatoren	3,5	3,4
Lichtschutzfilter*	–	6,0
Calendula officinalis-Extrakt C 1	0,1	0,1
Hilfsstoffe	0,8	4,4

* Kombination aus UVA- und UVB-Lichtschutzfiltern

Tabelle 24 Zusammensetzung der kosmetischen Formulierung D 7

Inhaltsstoffe [Gew.-%]	Formulierung (O/W-Emulsion, pH 6,2)
	D 7
Fettphase	10,2
Wasserphase	82,5
Emulgatoren	3,5
Calendula officinalis-Extrakt C 1	3,0
Hilfsstoffe	0,8

9.1.3 Glycyrrhiza glabra

Extrakte

S 1

Rohstoff: Wurzeln von Glycyrrhiza glabra
 Extrakt: Extraktion mit Propylenglycol / Wasser
 braune flüssige Lösung
 löslich in Wasser
 Trockenmasse > 3 %

S 2

Rohstoff: Wurzeln von Glycyrrhiza glabra
 Extrakt: Extraktion mit Propylenglycol / Wasser
 braune flüssige Lösung
 löslich in Wasser
 Trockenmasse > 6 %

S 3

Rohstoff: Wurzeln von Glycyrrhiza glabra
 Extrakt: Extraktion mit Alkohol / Wasser
 Sprühtrocknung
 braunes homogenes Pulver
 löslich in Wasser

S 4

Rohstoff: Wurzeln von Glycyrrhiza glabra
 Extrakt: Extraktion mit Propylenglycol
 gelbe flüssige Lösung
 löslich in Wasser
 ca. 75 % Propylenglycol

S 5

Rohstoff: Wurzeln von Glycyrrhiza glabra
 Extrakt: Extraktion mit Jojoba Öl
 gelbe flüssige Lösung
 löslich in Ether
 25-50 % Jojoba Öl

Kosmetische Formulierungen**Tabelle 25 Zusammensetzung der kosmetischen Formulierungen E 43, 44**

Inhaltsstoffe [Gew.-%]	Formulierung	
	(O/W-Emulsion, pH 6,2) E 43	(W/O-Emulsion, pH ca. 5*) E 44
Fettphase	22,1	20,8
Wasserphase	73,0	66,7
Emulgatoren	2,0	5,0
Glycyrrhiza glabra-Extrakt S 1	0,5	0,5
Hilfsstoffe	2,4	7,0

* pH-Wert der Wasserphase

Tabelle 26 Zusammensetzung der kosmetischen Formulierung D 9

Inhaltsstoffe [Gew.-%]	Formulierung (O/W-Emulsion, pH 6,1) D 9
Fettphase	22,1
Wasserphase	68,4
Emulgatoren	2,0
Glycyrrhiza glabra-Extrakt S 1	5,0
Glycyrrhizin (Fa. Sigma)	0,1
Hilfsstoffe	2,4

9.1.4 Terminalia sericea

Extrakte

T 1

Rohstoff: Rinde und Wurzeln von Terminalia sericea
 Extrakt: alkoholische Extraktion
 Umkristallisation
 weißes amorphes Pulver
 löslich in Methanol

T 2

Rohstoff: Rinde und Wurzeln von Terminalia sericea
 Extrakt: alkoholische Extraktion
 Umkristallisation
 mit Phospholipiden verkapselt
 gelbliche Kristalle
 löslich in unpolaren Lösungsmitteln

T 3

Rohstoff: Rinde und Wurzeln von Terminalia sericea
 Extrakt: Extraktion mit Butylenglycol
 rotbraune Flüssigkeit
 löslich in Methanol

Kosmetische Formulierungen

Tabelle 27 **Zusammensetzung der kosmetischen Formulierungen E 47, 48**

Inhaltsstoffe [Gew.-%]	Formulierung	
	(O/W-Emulsion, pH 6,1) E 48	(W/O-Emulsion, pH ca. 5*) E 47
Fettphase	22,1	20,8
Wasserphase	73,5	67,2
Emulgatoren	2,0	5,0
Terminalia sericea-Extrakt T 1	0,005	0,005
Hilfsstoffe	2,4	7,0

* pH-Wert der Wasserphase

Tabelle 28 Zusammensetzung der kosmetischen Formulierung D 8

Inhaltsstoffe [Gew.-%]	Formulierung (O/W-Emulsion, pH 6,2)
	D 8
Fettphase	22,1
Wasserphase	73,25
Emulgatoren	2,0
Terminalia sericea-Extrakt T 1	0,25
Hilfsstoffe	2,4

9.1.5 Echinacea purpurea

Extrakte

E 1

Rohstoff: blühendes frisches Kraut

Extrakt: Preßsaft, getrocknet
hellbraunes, feinkörniges Pulver
Trägerstoff: Maltodextrin 10 %; Hilfsstoff: Siliciumdioxid 2 %
trüb wasserlöslich

E 2

Rohstoff: blühendes frisches Kraut

Extrakt: hydroalkoholischer Extrakt, getrocknet
hellbraunes, feinkörniges Pulver
standardisiert: ≥ 4 % Echinacocide
trüb wasserlöslich

E 3

Rohstoff: Wurzeln

Extrakt: hydroalkoholischer Extrakt: 75-100 % Propylenglycol, 10-25 % Extrakt
gelblich-braune, klare Flüssigkeit
klar wasserlöslich

E 4

Rohstoff: frisches Kraut

Extrakt: wässrig-alkoholischer Extrakt: 43 % Wasser, 42 % Propylenglycol,
15 % Ethanol
Gelblich-grüne, klare Flüssigkeit
klar wasserlöslich

Kosmetische Formulierungen**Tabelle 29** Zusammensetzung der kosmetischen Formulierungen D 16, 17

Inhaltsstoffe [Gew.-%]	Formulierung	
	(O/W-Emulsion, pH 5,9) D 16	(W/O-Emulsion, pH ca. 5*) D 17
Fettphase	22,1	20,8
Wasserphase	73,0	66,7
Emulgatoren	2,0	5,0
Echinacea purpurea-Extrakt E1	0,5	0,5
Hilfsstoffe	2,4	7,0

* pH-Wert der Wasserphase

Tabelle 30 Zusammensetzung der kosmetischen Formulierung D 10

Inhaltsstoffe [Gew.-%]	Formulierung (O/W-Emulsion, pH 5,34)
	D 10
Fettphase	22,1
Wasserphase	66,5
Emulgatoren	2,0
Echinacea purpurea-Extrakt E 1	7,0
Hilfsstoffe	2,4

9.2 Methoden

9.2.1 Allgemeine Methodenparameter

Die allgemeinen Parameter der Methoden sowie die verwendeten Geräte sind im folgenden Abschnitt aufgeführt. Die speziellen Methodenparameter zur Bestimmung der einzelnen Leitsubstanzen der Pflanzenextrakte in den kosmetischen Formulierungen und den Penetrationsproben sowie die MS/MS-Fragmentierungsexperimente werden in den Abschnitten 9.2.2 bis 9.2.6 detailliert beschrieben.

Photometrische Untersuchungen

Gerät: Dioden Array Detektor, Serie 1100, Agilent
Wellenlänge: 190-400 nm
Durchflusszelle: 13 µl Volumen, 10 mm Weglänge

HPLC Trennung

Entgaser: Serie 1100, Agilent
Pumpe: binäre Pumpe, Serie 1100, Agilent
Flussrate: 200 µl/min
Injektor: automatischer Probengeber, Serie 1100, Agilent
Infektionsvolumen: 5 µl
Säulenofen: Serie 1100, Agilent
Säulentemperatur: 25 °C

Massenspektrometrie

Gerät: API-ES Quadrupol Massenspektrometer, Serie 1100, Agilent
Modus: total ion current (TIC, Totalionenstrom)
selected ion monitoring (SIM)

MS/MS-Fragmentierungsexperimente

Gerät: API-ES Ionenfallen Massenspektrometer – ESQUIRE~LC,
Bruker; (API-ES Ionenquelle der Fa. Agilent)
Spritzenpumpe: Serie 74900, Cole-Parmer
HPLC-Pumpe: quarternäre Pumpe, Serie 1100, Agilent

NMR-spektroskopische Untersuchungen

Die Durchführung der NMR-Untersuchungen erfolgte in der Abteilung Physikalische Analytik, Beiersdorf AG.

Gerät: Avance-DRX-500-Spektrometer, Bruker Analytik GmbH
 Interner Standard: Tetramethylsilan (TMS)
 Temperatur: 27 °C

Durchführung der Penetrationsstudien

Die Durchführung der in vitro Penetrationsuntersuchungen am Schweinehaut-Modell erfolgte nach Diembeck et al. in in der Abteilung In vitro Bioverträglichkeit/Screening, Beiersdorf AG [108].

9.2.2 Camellia sinensisStandardlösungen

Photometrische Untersuchungen:

Catechine (10-20 µg/ml) in Methanol/H₂O (50:50, v:v)

Massenspektrometrische Untersuchungen:

Catechine (1-5 µg/ml) in Methanol/H₂O (20:80, v:v)

MS/MS-Fragmentierungsexperimente:

Epicatechingallat (19 µg/ml) in Methanol

Kopplung LC/MS: Catechine und Gallussäure (1-5 µg/ml)
 in Methanol/H₂O (20:80, v:v)

HPLC Trennung der Grüntee-Catechine

Säule: GROM-SIL 120 Octyl-5 CP, 5 µm, 60×2 mm, Grom Analytik

Eluenten: A: Wasser incl. 0,1 % Ameisensäure

B: Methanol

Gradient:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	92	8
15	50	50
16	0	100
20	0	100
22	92	8
30	92	8

Massenspektrometrie der Grüntee-Catechine

Polarität:	negativ
Capillary:	3500 V
Drying Gas:	10 l/min
Drying Gas:	250 °C
Nebulizer:	35 psi
Fragmentor:	90 V
Peak width:	0,25 min
SIM-Signale:	m/z 289,0; 305,0; 441,0; 457,0

MS/MS-Fragmentierungsexperiment von Epicatechingallat

Spritzenpumpe:	Flussrate:	150 µl/min
HPLC-Pumpe:	Flussrate:	200 µl/min
Lösungsmittel:	Methanol	
API-ES Parameter:	Polarität:	negativ
	Capillary:	3500 V
	Drying Gas:	7 l/min
	Drying Gas:	250 °C
	Nebulizer:	18 psi
Akkumulationszeit:	150 ms	
Amplitude:	0,90 V	

Bestimmung der Emulsionsproben

0,5 g einer kosmetischen Formulierung werden in ein Kulturröhrchen eingewogen und mit 0,5 ml einer Vit C-Lösung (4 mg/ml MeOH/H₂O 1:1; v:v), 1 ml THF und 2 ml MeOH versetzt. Die Probe wird mit Hilfe eines Vortex-Mixers homogenisiert und anschließend 5 min im Ultraschallbad extrahiert. Danach wird die Probe mit demineralisiertem Wasser ad 10 ml aufgefüllt und erneut homogenisiert. Die Zentrifugation der Probe erfolgt bei ca. 3800 g und Raumtemperatur für 15 min. Die wässrig-organische Lösung wird unter Einsatz einer Pasteurpipette vom Zentrifugationsrückstand und der oberen Fettschicht abgezogen und membranfiltriert (Sartorius SRP 25, 0,45 µm). Das Filtrat wird ohne weitere Probenaufarbeitung direkt zur LC/MS Analytik eingesetzt.

Die Quantifizierung der einzelnen Catechine erfolgt mittels externer Standardkalibrierung bezogen auf Referenzsubstanzen (Sigma). Die Mischstandardlösungen enthalten an einzelnen Catechinen zwischen 0,04 und 2,7 µg/ml, wobei sich die Zusammensetzung der Mischstandardlösungen an den Catechin-Gehalten der eingesetzten Grüntee-Extrakte orientiert.

Durchführung der Penetrationsstudie

Anzahl der Hautproben:	4
Hauttemperatur:	32 °C
Rezeptorphase:	demineralisiertes Wasser incl. 0,9 % Natriumchlorid und 0,02 % Gentamicin
Penetrationsdauer:	20 Stunden (unter Lichtausschluß)
Extraktionslösung:	Methanol/Wasser (40:60, v:v) incl. 0,02 % Vit C
Extraktionsvolumina:	Oberfläche: 4 ml
	Hornschicht (Strips): 4 ml
	Epidermis: 4 ml
	Dermis: 4 ml
	Rezeptorphase: 6 ml

Die Extrakte wurden membranfiltriert (Sartorius SRP 25, 0,45 µm) und ohne weitere Probenaufarbeitung direkt zur LC/MS Analytik eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte in gleicher Art und Weise wie bei der Bestimmung der kosmetischen Formulierungen.

Durchführung der Vit C-Bestimmung

Pumpe:	L-6200 A, Intelligent Pump, Merck Hitachi
Flussrate:	1 ml/min
Injektor:	AS-4000, Automatischer Probengeber, Intelligent Auto Sampler, Merck Hitachi
Infektionsvolumen:	10 µl
Säulentemperatur:	Raumtemperatur
Säule:	RP select B LiChrospher, 5 µm, 250×4 mm, Merck
Eluent:	Wasser incl. 0,1 % meta-Phosphorsäure
Modus:	isokratisch
Detektor:	L-4500, Dioden Array Detektor, Merck
Wellenlänge:	242 nm

0,15 g einer kosmetischen Formulierung werden in ein Kulturröhrchen eingewogen und mit 0,5 ml Isopropanol und 9,35 ml einer 0,1 % igen meta-Phosphorsäure-Lösung versetzt. Die Probe wird mit Hilfe eines Vortex-Mixers homogenisiert und anschließend 5 min im Ultraschallbad extrahiert. Die Zentrifugation der Probe erfolgt bei ca. 5000 U/min und Raumtemperatur für 15 min. Die wässrige Lösung wird unter Einsatz einer Pasteurpipette vom Zentrifugationsrückstand und der oberen Fettschicht abgezogen und membranfiltriert (Sartorius RC 25, 0,45 µm). Das Filtrat wird ohne weitere Probenaufarbeitung direkt zur LC/MS Analytik eingesetzt.

Die Quantifizierung erfolgt mittels externer Standardkalibrierung bezogen auf Referenzsubstanzen (Merck). Die Mischstandardlösungen enthalten zwischen 5 und 30 µg/ml Vit C.

9.2.3 *Calendula officinalis*

Standardlösungen

Präparative DC: Calendula CO₂-Extrakt (ca. 10 mg/ml)
in Methanol/tert-Butylmethylether (4:1, v:v)

Photometrische Untersuchungen:
isolierte Faradiolester (jeweils ca. 30 µg/ml)
in Methanol/tert-Butylmethylether (4:1, v:v)

Massenspektrometrische Untersuchungen:
isolierte Faradiolester (jeweils ca. 20 µg/ml)
in Methanol/tert-Butylmethylether (4:1, v:v)

MS/MS-Fragmentierungsexperimente:
isolierte Faradiolester (jeweils ca. 20 µg/ml)
in Methanol/tert-Butylmethylether (4:1, v:v)

Kopplung LC/MS: isolierte Faradiolester (jeweils ca. 10 µg/ml)
in Methanol/tert-Butylmethylether (4:1, v:v)

Präparative DC

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Mobile Phase: n-Hexan/Ethylacetat (80:20, v:v)

Detektion: 1. UV-Detektion 254 nm
2. Anisaldehyd-Sprühreagenz

Extraktion der Banden mit Chloroform

Semipräparative HPLC

Entgaser: Serie 1100, Agilent
Pumpe: binäre Pumpe, Serie 1100, Agilent
Flussrate: 3 ml/min
Injektor: automatischer Probengeber, Serie 1100, Agilent
Infektionsvolumen: 100 µl
Säule: GROM-SIL 120 ODS-3 CP, 3 µm, 125×8 mm, Grom Analytik
Eluenten: A: tert-Butylmethylether
B: Methanol incl. 2 mM Ammoniumacetat

Gradient:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	10	90
1	10	90
3	30	70
15	30	70
20	60	40
30	10	90

MS-Detektion: API-ES Quadrupol Massenspektrometer, Serie 1100, Agilent
Modus: Total ion current (TIC, Totalionenstrom)
Polarität: positiv
Capillary: -4000 V
Drying Gas: 8 l/min
Drying Gas: 300 °C
Nebulizer: 20 psi
Fragmentor: 180 V
Scan-Bereich: m/z 400-900
Fraktions-
sammler: L-5200, Merck

HPLC Trennung der Faradiolester

Säule: GROM-SIL 120 ODS-3 CP, 3 µm, 60×2 mm, Grom Analytik
Eluenten: A: tert-Butylmethylether
B: Methanol incl. 2 mM Ammoniumacetat

Gradient:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	10	90
0,5	10	90
3	30	70
8	30	70
9	60	40
14	60	40
16	10	90
26	10	90

Massenspektrometrie der Faradiolester

Polarität: positiv
 Capillary: -4000 V
 Drying Gas: 7 l/min
 Drying Gas: 300 °C
 Nebulizer: 20 psi
 Fragmentor: 200 V
 Peak width: 0,25 min
 SIM-Signale: m/z 675,5; 703,5

MS/MS-Fragmentierungsexperimente der Faradiolester

Spritzenpumpe: Flussrate: 150 µl/min
 HPLC-Pumpe: Flussrate: 200 µl/min
 Lösungsmittel: Methanol/tert-Butylmethylether (4:1; v:v)
 API-ES Parameter: Polarität: positiv
 Capillary: -4000 V
 Drying Gas: 7 l/min
 Drying Gas: 300 °C
 Nebulizer: 18 psi
 Akkumulationszeit: 300 ms
 Amplitude: 0,75 V

Extraktion der Emulsionsproben

0,3 g (E 37, 38, 39 und 41) bzw. 0,1 g (E 35) einer kosmetischen Formulierung werden in ein Kulturröhrchen eingewogen und mit MeOH/tert-Butylmethylether (4:1; v:v) ad 10 ml aufgefüllt. Die Probe wird mit Hilfe eines Vortex-Mixers homogenisiert und

anschließend 5 min im Ultraschallbad extrahiert. Die wässrig-organische Suspension wird unter Einsatz einer Pasteurpipette abgezogen und membranfiltriert (Sartorius SRP 25, 0,45 µm). Das Filtrat wird ohne weitere Probenaufarbeitung direkt zur LC/MS Analytik eingesetzt.

Die Quantifizierung des Calendula CO₂-Extraktes anhand der Leitsubstanzen Faradiolmyristat und Faradiolpalmitat erfolgt mittels externer Matrixkalibrierung bezogen auf den eingesetzten Extrakt. Zur Matrixkalibrierung werden 0,6 bzw. 0,2 g der entsprechenden Placebos (kosmetische Formulierung ohne Calendula-Extrakt) in der oben beschriebenen Weise extrahiert und filtriert. Das Filtrat wird anschließend mit Calendula CO₂-Extrakt-Standardlösungen (in MeOH/tert-Butylmethylether 4:1; v:v) unterschiedlicher Konzentration versetzt (1:1; v.v). Je nach kosmetischer Formulierung werden zur Matrixkalibrierung Konzentrationen von 5-40 µg/ml Calendula CO₂-Extrakt verwendet.

Durchführung der Penetrationsstudie

Anzahl der Hautproben:	2
Hauttemperatur:	32 °C
Rezeptorphase:	demineralisiertes Wasser incl. 0,9 % Natriumchlorid und 0,02 % Gentamicin
Penetrationsdauer:	20 Stunden (unter Lichtausschluß)
Extraktionslösung:	Methanol/tert-Butylmethylether (4:1, v:v)
Extraktionsvolumina:	Oberfläche: 25 ml
	Hornschicht (Strips): 4 ml
	Epidermis: 4 ml
	Dermis: 10 ml
	Rezeptorphase: 6 ml

Die Extrakte wurden membranfiltriert (Sartorius SRP 25, 0,45 mm) und ohne weitere Probenaufarbeitung direkt zur LC/MS Analytik eingesetzt.

Die Quantifizierung des Calendula CO₂-Extraktes anhand der Leitsubstanzen Faradiolmyristat und Faradiolpalmitat erfolgt mittels externer Standardkalibrierung bezogen auf den eingesetzten Extrakt. Die Standardlösungen enthalten zwischen 0,5 und 20 µg/ml Calendula CO₂-Extrakt.

9.2.4 Glycyrrhiza glabra

Standardlösungen

Photometrische Untersuchungen:

ca. 20 µg/ml in Methanol/H₂O (50:50, v:v)

Massenspektrometrische Untersuchungen:

ca. 5 µg/ml in Methanol/H₂O (40:60, v:v)

MS/MS-Fragmentierungsexperimente:

Glycyrrhizinsäure (15 µg/ml) in Methanol

Kopplung LC/MS: ca. 5 µg/ml in Methanol/H₂O (40:60, v:v)

HPLC Trennung von Glycyrrhizin- und 18β-Glycyrrhetinsäure

Säule: GROM-SIL 120 ODS-3 CP, 5 µm, 60×2 mm, Grom Analytik

Eluenten: A: Wasser incl. 0,5 % Ameisensäure

B: Methanol

Gradient:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	40	60
5	0	100
14	0	100
15	40	60
25	40	60

Massenspektrometrie von Glycyrrhizin- und 18β-Glycyrrhetinsäure

Polarität: negativ

Capillary: 4000 V

Drying Gas: 8 l/min

Drying Gas: 300 °C

Nebulizer: 30 psi

Fragmentor: 190 V

Peak width: 0,25 min

SIM-Signale: m/z 469,2; 821,3

MS/MS-Fragmentierungsexperiment von Glycyrrhizinsäure

Spritzenpumpe:	Flussrate:	100 µl/min
HPLC-Pumpe:	Flussrate:	200 µl/min
Lösungsmittel:	Methanol	
API-ES Parameter:	Polarität:	negativ
	Capillary:	4000 V
	Drying Gas:	7 l/min
	Drying Gas:	300 °C
	Nebulizer:	18 psi
Akkumulationszeit:	200 ms	
Amplitude:	1,0 V	

Bestimmung der Emulsionsproben

0,5 g einer kosmetischen Formulierung werden in ein Kulturröhrchen eingewogen und mit 6 ml MeOH versetzt. Die Probe wird zuerst mit Hilfe eines Vortex-Mixers homogenisiert und anschließend 5 min im Ultraschallbad extrahiert. Danach wird die Probe mit demineralisiertem Wasser ad 10 ml aufgefüllt und erneut homogenisiert. Die Zentrifugation der Probe erfolgt bei ca. 3800 g und Raumtemperatur für 15 min. Die wässrig-organische Lösung wird unter Einsatz einer Pasteurpipette vom Zentrifugationsrückstand und der oberen Fettschicht abgezogen und membranfiltriert (Sartorius SRP 25, 0,45 µm). Das Filtrat wird ohne weitere Probenaufarbeitung direkt zur LC/MS Analytik eingesetzt.

Die Quantifizierung der Glycyrrhizin- und 18β-Glycyrrhetinsäure erfolgt mittels externer Standardkalibrierung bezogen auf Referenzsubstanzen (Sigma). Die Mischstandardlösungen enthalten zwischen 0,5 und 4 µg/ml Glycyrrhizinsäure und 0,04-0,008 µg/ml 18β-Glycyrrhetinsäure.

Durchführung der Penetrationsstudie

Anzahl der Hautproben:	4
Hauttemperatur:	32 °C
Rezeptorphase:	demineralisiertes Wasser incl. 1,0 % Natriumchlorid, 0,9 % Albumin und 0,012 % Gentamicin
Penetrationsdauer:	20 Stunden

Extraktionslösung:	Methanol/Wasser (50:50, v:v)	
Extraktionsvolumina:	Oberfläche:	10 ml
	Hornschicht (Strips):	4 ml
	Epidermis:	4 ml
	Dermis:	5 ml
	Rezeptorphase:	6 ml

Die Extrakte wurden membranfiltriert (Sartorius SRP 25, 0,45 µm) und ohne weitere Probenaufarbeitung direkt zur LC/MS Analytik eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte in gleicher Art und Weise wie bei der Bestimmung der kosmetischen Formulierungen.

9.2.5 Terminalia sericea

Standardlösungen

Photometrische Untersuchungen:

Sericosid (15 µg/ml) in Methanol/H₂O (50:50, v:v)

Massenspektrometrische Untersuchungen:

Sericosid (2 µg/ml) in Methanol/H₂O (50:50, v:v)

MS/MS-Fragmentierungsexperimente:

Sericosid (2 µg/ml) in Methanol

Kopplung LC/MS: Sericosid (0,5 µg/ml) in Methanol/H₂O (50:50, v:v)

HPLC Trennung von Sericosid

Säule: GROM-SIL 120 ODS-3 CP, 5 µm, 60×2 mm, Grom Analytik

Eluenten: A: Wasser incl. 0,5 % Ameisensäure

B: Methanol

Gradient:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	50	50
7	0	100
14	0	100
15	50	50
25	50	50

Massenspektrometrie von Sericosid

Polarität:	positiv
Capillary:	-4000 V
Drying Gas:	8 l/min
Drying Gas:	300 °C
Nebulizer:	30 psi
Fragmentor:	200 V
Peak width:	0,25 min
SIM-Signale:	m/z 689,4

MS/MS-Fragmentierungsexperimente von Sericosid

Spritzenpumpe:	Flussrate:	100 µl/min
HPLC-Pumpe:	Flussrate:	200 µl/min
Lösungsmittel:	Methanol	
API-ES Parameter:	Polarität:	positiv
	Capillary:	-4000 V
	Drying Gas:	7 l/min
	Drying Gas:	300 °C
	Nebulizer:	18 psi
Akkumulationszeit:	100 ms	
Amplitude:	0,78 V, 1,15 V	

Bestimmung der Emulsionsproben

0,2 g einer kosmetischen Formulierung werden in ein Kulturröhrchen eingewogen und mit 5 ml MeOH versetzt. Die Probe wird zuerst mit Hilfe eines Vortex-Mixers homogenisiert und anschließend 5 min im Ultraschallbad extrahiert. Danach wird die Probe mit demineralisiertem Wasser ad 10 ml aufgefüllt und erneut homogenisiert. Die Zentrifugation der Probe erfolgt bei ca. 3800 g und Raumtemperatur für 15 min. Die wässrig-organische Lösung wird unter Einsatz einer Pasteurpipette vom Zentrifugationsrückstand und der oberen Fettschicht abgezogen und membranfiltriert (Sartorius SRP 25, 0,45 µm). Das Filtrat wird ohne weitere Probenaufarbeitung direkt zur LC/MS Analytik eingesetzt.

Die Quantifizierung von Sericosid erfolgt mittels externer Standardkalibrierung bezogen auf eine Referenzsubstanz (Indena). Die Standardlösungen enthalten zwischen 0,5 und 2 µg/ml Sericosid.

Durchführung der Penetrationsstudie

Anzahl der Hautproben:	3
Hauttemperatur:	32 °C
Rezeptorphase:	demineralisiertes Wasser incl. 1,0 % Natriumchlorid, 0,9 % Albumin und 0,012 % Gentamicin
Penetrationsdauer:	20 Stunden
Extraktionslösung:	Methanol/Wasser (50:50, v:v)
Extraktionsvolumina:	
	Oberfläche: 20 ml
	Hornschicht (Strips): 4 ml
	Epidermis: 4 ml
	Dermis: 5 ml
	Rezeptorphase: 6 ml

Die Extrakte wurden membranfiltriert (Sartorius SRP 25, 0,45 µm) und ohne weitere Probenaufarbeitung direkt zur LC/MS Analytik eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte in gleicher Art und Weise wie bei der Bestimmung der kosmetischen Formulierungen.

9.2.6 Echinacea purpurea

Standardlösungen

Photometrische Untersuchungen:

Cichoriensäure (15 µg/ml) in Methanol/H₂O (50:50, v:v)

Massenspektrometrische Untersuchungen:

Cichoriensäure (7 µg/ml) in Methanol/H₂O (10:90, v:v)

MS/MS-Fragmentierungsexperimente:

Cichoriensäure (13 µg/ml) in Methanol

Kopplung LC/MS: Cichoriensäure (3 µg/ml) in Methanol/H₂O (10:90, v:v)

HPLC Trennung von Cichoriensäure

Säule: GROM-SIL 120 ODS-0 AB, 3 µm, 60×2 mm, Grom Analytik

Eluenten: A: Wasser incl. 1,0 % Ameisensäure

B: Methanol

Gradient:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	90	10
1	90	10
9	0	100
15	0	100
18	90	10
29	90	10

Massenspektrometrie von Cichoriensäure

Polarität: negativ

Capillary: 4000 V

Drying Gas: 8 l/min

Drying Gas: 300 °C

Nebulizer: 30 psi

Fragmentor: 70 V

Peak width: 0,25 min

SIM-Signale: m/z 743,1

MS/MS-Fragmentierungsexperimente von Cichoriensäure

Spritzenpumpe: Flussrate: 150 µl/min

HPLC-Pumpe: Flussrate: 200 µl/min

Lösungsmittel: Methanol

API-ES Parameter: Polarität: negativ

Capillary: 4000 V

Drying Gas: 7 l/min

Drying Gas : 300 °C

Nebulizer: 18 psi

Akkumulationszeit: 150 ms

Amplitude: 0,80 V; 0,75 V

Bestimmung der Emulsionsproben

0,3 g einer kosmetischen Formulierung werden in ein Kulturröhrchen eingewogen und mit 1 ml THF und 2 ml MeOH versetzt. Die Probe wird zuerst mit Hilfe eines Vortex-Mixers homogenisiert und anschließend 5 min im Ultraschallbad extrahiert. Danach wird die Probe mit demineralisiertem Wasser ad 10 ml aufgefüllt und erneut homogenisiert. Die Zentrifugation der Probe erfolgt bei ca. 3800 g und Raumtemperatur für 15 min. Die wässrig-organische Lösung wird unter Einsatz einer Pasteurpipette vom Zentrifugationsrückstand und der oberen Fettschicht abgezogen und membranfiltriert (Sartorius SRP 25, 0,45 µm). Das Filtrat wird ohne weitere Probenaufarbeitung direkt zur LC/MS Analytik eingesetzt.

Die Quantifizierung von Cichoriensäure erfolgt mittels externer Standardkalibrierung bezogen auf eine Referenzsubstanz (Madaus). Die Standardlösungen enthalten zwischen 2,5 und 10 µg/ml Cichoriensäure.

Durchführung der Penetrationsstudie

Anzahl der Hautproben:	4
Hauttemperatur:	32 °C
Rezeptorphase:	demineralisiertes Wasser incl. 1,0 % Natriumchlorid, 0,9 % Albumin und 0,012 % Gentamicin
Penetrationsdauer:	20 Stunden
Extraktionslösung:	Methanol/Wasser (35:65, v:v)
Extraktionsvolumina:	Oberfläche: 20 ml
	Hornschicht (Strips): 4 ml
	Epidermis: 4 ml
	Dermis: 10 ml
	Rezeptorphase: 6 ml

Die Extrakte wurden membranfiltriert (Sartorius SRP 25, 0,45 µm) und ohne weitere Probenaufarbeitung direkt zur LC/MS Analytik eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte in gleicher Art und Weise wie bei der Bestimmung der kosmetischen Formulierungen.

9.3 Tabellenanhang

9.3.1 Camillia sinensis

Daten zur Stabilität der Catechine in Lösung

Tabelle 31 Stabilität der Catechine [%] in einer wässrig-methanolischen Lösung nach 6, 11 und 17 Stunden bei RT

Catechine [%]	6 Stunden	11 Stunden	17 Stunden
C	98,7	95,3	70,0
EC	96,9	92,7	74,3
EGC	39,8	24,8	17,4
EGCG	53,8	35,6	26,0
ECG	95,5	89,3	68,7

Tabelle 32 Stabilität von (-)-Epigallocatechin [%] in einer wässrig-methanolischen Lösung unter Zusatz von Antioxidantien und Komplexbildnern nach 6, 12 und 18 Stunden bei RT

EGC [%]	6 Stunden	12 Stunden	18 Stunden
BHT (10 µg/ml)	57,5	29,0	13,9
BHT (100 µg/ml)	80,7	63,3	47,2
BHA (10 µg/ml)	79,0	58,7	46,0
BHA (100 µg/ml)	80,2	60,5	47,7
Ascorbins. (10 µg/ml)	93,2	81,2	69,1
Ascorbins. (100 µg/ml)	94,3	87,7	81,2
EDTA (10 µg/ml)	75,8	53,6	46,4
EDTA (100 µg/ml)	67,1	41,2	29,6

Tabelle 33 Stabilität der Catechine [%] in einer stabilisierten wässrig-methanolischen Lösung (0,2 mg/ml Vit C) nach 4, 7, 11 und 15 Stunden bei RT

Catechine [%]	4 Stunden	6 Stunden	11 Stunden	15 Stunden
C	99,9	98,4	96,9	93,3
EC	99,6	98,1	95,9	94,2
EGC	98,9	98,7	96,1	95,9
EGCG	99,4	99,2	97,6	97,1
ECG	99,4	98,9	98,3	96,5

Daten zur Untersuchung der Lagerstabilität von Grüntee-Extrakt

Tabelle 34 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer nicht stabilisierten W/O-Emulsion (N 27) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen; der theoretische Anfangsgehalt wurde mit Hilfe des eingesetzten Grüntee-Extraktes berechnet: Gehalte [$\mu\text{g/g}$]

Catechine [$\mu\text{g/g}$]	theor. Gehalt	1 Mo RT	3 Mo +6°C	3 Mo RT	4 Mo RT+L	4 Mo BR	6 Mo +6°C	6 Mo RT	6 Mo RT+L	6 Mo BR
C+EC+ECG	118,1	71,6	48,2	71,4	60,2	41,9	58,0	13,0	36,6	0,6
EGC+EGCG	290,8	95,1	59,3	94,3	85,7	41,8	75,8	9,8	56,5	0,0
C	7,3	4,8	2,8	4,6	3,1	4,6	2,8	0,2	2,1	n.n.
EC	36,7	15,5	9,5	18,5	10,8	8,7	10,4	0,1	6,9	n.
ECG	74,1	51,3	35,9	48,3	46,3	28,7	44,9	12,7	27,6	0,6
EGC	55,6	14	4,5	5,7	8,9	4,7	8,0	n.n.	5,1	n.n.
EGCG	235,2	81,1	54,8	88,6	76,9	37,1	67,8	9,8	51,4	n.

Tabelle 35 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer nicht stabilisierten W/O-Emulsion (N 27) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen; der theoretische Anfangsgehalt wurde mit Hilfe des eingesetzten Grüntee-Extraktes berechnet: Gehalte [%]

Catechine [%]	theor. Gehalt	1 Mo RT	3 Mo +6°C	3 Mo RT	4 Mo RT+L	4 Mo BR	6 Mo +6°C	6 Mo RT	6 Mo RT+L	6 Mo BR
C+EC+ECG	100,0	60,6	40,8	60,5	51,0	35,5	49,1	11,0	31,0	0,5
EGC+EGCG	100,0	32,7	20,4	32,4	29,5	14,4	26,1	3,4	19,4	0,0
C	100,0	65,8	38,4	63,0	42,9	62,3	37,7	3,3	29,2	n.n.
EC	100,0	42,2	25,9	50,4	29,3	23,7	28,3	0,2	18,9	n.
ECG	100,0	69,2	48,4	65,2	62,5	38,7	60,6	17,1	37,2	0,8
EGC	100,0	25,2	8,1	10,3	16,0	8,4	14,3	n.n.	9,1	n.n.
EGCG	100,0	34,5	23,3	37,7	32,7	15,8	28,8	4,2	21,9	n.

Tabelle 36 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit BHT stabilisierten W/O-Emulsion (N 28) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen; der theoretische Anfangsgehalt wurde mit Hilfe des eingesetzten Grüntee-Extraktes berechnet: Gehalte [$\mu\text{g/g}$]

Catechine [$\mu\text{g/g}$]	theor. Gehalt	1 Mo RT	3 Mo +6°C	3 Mo RT	4 Mo RT+L	4 Mo BR	6 Mo +6°C	6 Mo RT	6 Mo RT+L	6 Mo BR
C+EC+ECG	118,1	86,5	76,8	98,1	77,6	0,0	91,1	46,4	60,8	0,0
EGC+EGCG	290,8	181,0	148,4	214,9	135,6	0,0	178,1	74,0	123,3	0,0
C	7,3	6,1	5,5	7,2	4,9	n.n.	5,8	2,5	4,1	n.n.
EC	36,7	22,5	22,5	32,5	18,4	n.n.	26,5	9,2	16,8	n.n.
ECG	74,1	57,9	48,8	58,4	54,2	n.	58,8	34,6	39,9	n.n.
EGC	55,6	36,2	22,6	39,7	23,1	n.n.	27,9	6,7	21,1	n.n.
EGCG	235,2	144,8	125,8	175,2	112,6	n.n.	150,2	67,3	102,3	n.n.

Tabelle 37 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit BHT stabilisierten W/O-Emulsion (N 28) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen; der theoretische Anfangsgehalt wurde mit Hilfe des eingesetzten Grüntee-Extraktes berechnet: Gehalte [%]

Catechine [%]	theor. Gehalt	1 Mo RT	3 Mo +6°C	3 Mo RT	4 Mo RT+L	4 Mo BR	6 Mo +6°C	6 Mo RT	6 Mo RT+L	6 Mo BR
C+EC+ECG	100,0	73,2	65,0	83,1	65,7	0,0	77,2	39,2	51,5	0,0
EGC+EGCG	100,0	62,2	51,0	73,9	46,6	0,0	61,2	25,4	42,4	0,0
C	100,0	83,6	75,3	98,6	67,7	n.n.	79,5	34,0	56,7	n.n.
EC	100,0	61,3	61,3	88,6	50,2	n.n.	72,3	25,1	45,7	n.n.
ECG	100,0	78,1	65,9	78,8	73,1	n.	79,3	46,7	53,8	n.n.
EGC	100,0	65,1	40,6	71,4	41,5	n.n.	50,2	12,1	37,9	n.n.
EGCG	100,0	61,6	53,5	74,5	47,9	n.n.	63,9	28,6	43,5	n.n.

Tabelle 38 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit Vit C stabilisierten W/O-Emulsion (N 31) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen; der theoretische Anfangsgehalt wurde mit Hilfe des eingesetzten Grüntee-Extraktes berechnet: Gehalte [$\mu\text{g/g}$]

Catechine [$\mu\text{g/g}$]	theor. Gehalt	1 Mo RT	2 Mo +6°C	2 Mo RT	3 Mo RT+L	3 Mo BR	6 Mo +6°C	6 Mo RT	6 Mo RT+L	6 Mo BR
C+EC+ECG	118,1	87,8	86,7	95,8	79,6	80,6	69,4	95,0	77,6	44,1
EGC+EGCG	290,8	204,6	211,2	237,3	160,8	157,7	154,3	242,8	173,0	91,0
C	7,3	5,8	6,2	6,9	4,8	5,8	4,2	6,6	5,1	3,4
EC	36,7	22,2	26,6	30,2	19,0	19,5	18,3	29,1	22,1	10,4
ECG	74,1	59,8	53,9	58,7	55,9	55,3	46,8	59,3	50,4	30,3
EGC	55,6	44,6	40,2	46,3	29,1	29,4	26,4	43,8	32,0	14,7
EGCG	235,2	160	171	191	131,7	128,3	127,9	199,0	141,0	76,3

Tabelle 39 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit Vit C stabilisierten W/O-Emulsion (N 31) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen; der theoretische Anfangsgehalt wurde mit Hilfe des eingesetzten Grüntee-Extraktes berechnet: Gehalte [%]

Catechine [%]	theor. Gehalt	1 Mo RT	2 Mo +6°C	2 Mo RT	3 Mo RT+L	3 Mo BR	6 Mo +6°C	6 Mo RT	6 Mo RT+L	6 Mo BR
C+EC+ECG	100,0	74,3	73,4	81,1	67,4	68,2	58,8	80,4	65,7	37,4
EGC+EGCG	100,0	70,4	72,6	81,6	55,3	54,2	53,1	83,5	59,5	31,3
C	100,0	79,5	84,9	94,5	65,2	79,5	58,1	89,9	69,7	46,6
EC	100,0	60,5	72,5	82,3	51,7	53,1	49,9	79,4	60,1	28,4
ECG	100,0	80,7	72,7	79,2	75,4	74,6	63,2	80,0	68,0	40,9
EGC	100,0	80,2	72,3	83,3	52,4	52,8	47,5	78,8	57,5	26,5
EGCG	100,0	68,0	72,7	81,2	56,0	54,6	54,4	84,6	60,0	32,4

Tabelle 40 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit EDTA und Lichtschutzfiltern stabilisierten O/W-Emulsion (N 24) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen; der theoretische Anfangsgehalt wurde mit Hilfe des eingesetzten Grüntee-Extraktes berechnet: Gehalte [µg/g]

Catechine [µg/g]	theor. Gehalt	1 Mo RT	3 Mo +6°C	3 Mo RT	4 Mo RT+L	4 Mo BR	6 Mo +6°C	6 Mo RT	6 Mo RT+L	6 Mo BR
C+EC+ECG	118,1	74,3	91,0	75,3	57,8	27,6	83,9	47,8	43,6	13,4
EGC+EGCG	290,8	179,7	223,4	136,7	89,3	40,7	177,5	61,1	56,0	18,2
C	7,3	6,1	7,8	6,6	6,0	4,8	6,9	4,4	4,6	2,9
EC	36,7	22,1	33,8	27,6	19,6	8,1	29,2	16,7	14,9	4,1
ECG	74,1	46,1	49,4	41,1	32,2	14,8	47,9	26,8	24,0	6,4
EGC	55,6	58,7	53,3	39,9	26,0	11,5	51,2	16,2	13,9	4,7
EGCG	235,2	121,0	170,1	96,8	63,3	29,2	126,3	44,9	42,1	13,5

Tabelle 41 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit EDTA und Lichtschutzfiltern stabilisierten O/W-Emulsion (N 24) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen; der theoretische Anfangsgehalt wurde mit Hilfe des eingesetzten Grüntee-Extraktes berechnet: Gehalte [%]

Catechine [%]	theor. Gehalt	1 Mo RT	3 Mo +6°C	3 Mo RT	4 Mo RT+L	4 Mo BR	6 Mo +6°C	6 Mo RT	6 Mo RT+L	6 Mo BR
C+EC+ECG	100,0	62,9	77,1	63,8	49,0	23,4	71,0	40,5	36,9	11,4
EGC+EGCG	100,0	61,8	76,8	47,0	30,7	14,0	61,0	21,0	19,3	6,3
C	100,0	83,6	107,4	90,5	82,3	65,6	94,2	59,7	63,2	40,3
EC	100,0	60,2	92,0	75,1	53,5	22,0	79,4	45,5	40,6	11,2
ECG	100,0	62,2	66,7	55,5	43,5	19,9	64,6	36,2	32,4	8,6
EGC	100,0	105,6	95,8	71,8	46,8	20,6	92,0	29,1	25,0	8,5
EGCG	100,0	51,4	72,3	41,1	26,9	12,4	53,7	19,1	17,9	5,7

Tabelle 42 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit EDTA und BHT stabilisierten O/W-Emulsion (N 30) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen; der theoretische Anfangsgehalt wurde mit Hilfe des eingesetzten Grüntee-Extraktes berechnet: Gehalte [$\mu\text{g/g}$]

Catechine [$\mu\text{g/g}$]	theor. Gehalt	1 Mo RT	3 Mo +6°C	3 Mo RT	4 Mo RT+L	4 Mo BR	6 Mo +6°C	6 Mo RT	6 Mo RT+L	6 Mo BR
C+EC+ECG	118,1	88,4	103,8	95,4	48,7	40,6	99,3	76,0	35,9	19,1
EGC+EGCG	290,8	212,8	245,3	152,8	36,0	30,2	188,9	77,5	21,0	12,1
C	7,3	6,4	7,7	7,1	4,1	5,3	6,8	5,7	3,1	3,0
EC	36,7	22,2	35,4	31,1	14,4	11,7	30,7	24,3	11,3	5,8
ECG	74,1	59,8	60,7	57,3	30,3	23,6	61,8	46,0	21,5	10,2
EGC	55,6	47,1	51,6	27,5	3,7	4,0	38,2	11,6	1,6	1,3
EGCG	235,2	165,7	193,7	125,3	32,3	26,2	150,7	65,8	19,4	10,8

Tabelle 43 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit EDTA und BHT stabilisierten O/W-Emulsion (N 30) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen; der theoretische Anfangsgehalt wurde mit Hilfe des eingesetzten Grüntee-Extraktes berechnet: Gehalte [%]

Catechine [%]	theor. Gehalt	1 Mo RT	3 Mo +6°C	3 Mo RT	4 Mo RT+L	4 Mo BR	6 Mo +6°C	6 Mo RT	6 Mo RT+L	6 Mo BR
C+EC+ECG	100,0	74,9	87,9	80,8	41,3	34,4	84,1	64,4	30,4	16,2
EGC+EGCG	100,0	73,2	84,4	52,5	12,4	10,4	65,0	26,6	7,2	4,2
C	100,0	87,7	104,9	96,7	56,4	72,1	92,5	77,5	42,9	41,5
EC	100,0	60,5	96,5	84,8	39,1	31,9	83,6	66,3	30,8	15,9
ECG	100,0	80,7	81,9	77,3	40,9	31,9	83,4	62,1	29,0	13,8
EGC	100,0	84,7	92,7	49,5	6,7	7,2	68,7	20,9	2,9	2,3
EGCG	100,0	70,5	82,4	53,3	13,7	11,1	64,1	28,0	8,2	4,6

Tabelle 44 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit EDTA und Vit C stabilisierten O/W-Emulsion (N 29) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen; der theoretische Anfangsgehalt wurde mit Hilfe des eingesetzten Grüntee-Extraktes berechnet: Gehalte [$\mu\text{g/g}$]

Catechine [$\mu\text{g/g}$]	theor. Gehalt	1 Mo RT	3 Mo +6°C	3 Mo RT	4 Mo RT+L	4 Mo BR	6 Mo +6°C	6 Mo RT	6 Mo RT+L	6 Mo BR
C+EC+ECG	118,1	83,5	102,9	90,8	64,3	67,0	90,0	80,8	39,3	60,9
EGC+EGCG	290,8	198,5	262,9	234,7	144,7	144,2	187,8	168,6	85,8	119,7
C	7,3	5,8	7,4	7,0	5,0	7,1	6,2	5,9	3,0	7,2
EC	36,7	21,9	34,0	30,9	17,2	18,1	27,2	24,3	10,2	17,5
ECG	74,1	55,8	61,5	52,9	42,1	41,8	56,5	50,6	26,0	36,3
EGC	55,6	45,2	52,9	48,7	28,1	28,1	40,6	35,2	14,8	24,1
EGCG	235,2	153,3	210,0	186,0	116,6	116,1	147,2	133,4	71,0	95,6

Tabelle 45 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit EDTA und Vit C stabilisierten O/W-Emulsion (N 29) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen; der theoretische Anfangsgehalt wurde mit Hilfe des eingesetzten Grüntee-Extraktes berechnet: Gehalte [%]

Catechine [%]	theor. Gehalt	1 Mo RT	3 Mo +6°C	3 Mo RT	4 Mo RT+L	4 Mo BR	6 Mo +6°C	6 Mo RT	6 Mo RT+L	6 Mo BR
C+EC+ECG	100,0	70,7	87,1	76,9	54,5	56,7	76,2	68,4	33,3	51,6
EGC+EGCG	100,0	68,3	90,4	80,7	49,8	49,6	64,6	58,0	29,5	41,2
C	100,0	79,5	101,6	95,6	69,0	96,8	85,2	80,5	41,5	98,4
EC	100,0	59,7	92,6	84,1	46,9	49,2	74,2	66,1	27,8	47,5
ECG	100,0	75,3	83,0	71,4	56,8	56,4	76,3	68,3	35,1	49,0
EGC	100,0	81,3	95,1	87,6	50,6	50,6	73,1	63,4	26,6	43,3
EGCG	100,0	65,2	89,3	79,1	49,6	49,4	62,6	56,7	30,2	40,7

Tabelle 46 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer nicht stabilisierten W/O-Emulsion (E 26) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [µg/g]

Catechine [µg/g]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
C+EC+ECG	25,7	18,5	18,2	11,2	2,4	13,0	2,4	1,4	0,0	8,9	0,0	0,0	0,0
EGC+EGCG	84,1	54,5	55,4	26,9	7,1	28,2	3,6	2,5	0,0	24,0	0,0	0,0	0,0
C	1,9	1,5	1,5	0,8	n.	1,0	n.n.	n.n.	n.n.	0,6	n.n.	n.n.	n.n.
EC	13,7	9,9	9,7	4,8	1,1	4,9	n.	n.	n.n.	2,6	n.n.	n.n.	n.
ECG	10,1	7,1	7,0	5,6	1,3	7,0	2,4	1,4	n.n.	5,7	n.n.	n.n.	n.
EGC	43,1	22,4	25,7	7,5	1,7	6,2	n.n.	n.n.	n.n.	3,4	n.n.	n.n.	n.
EGCG	41,0	32,1	29,7	19,5	5,4	22,1	3,6	2,5	n.n.	20,6	n.n.	n.n.	n.

Tabelle 47 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer nicht stabilisierten W/O-Emulsion (E 26) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [%]

Catechine [%]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
C+EC+ECG	100,0	72,1	70,9	43,7	9,4	50,5	9,4	5,5	0,0	34,4	0,0	0,0	0,0
EGC+EGCG	100,0	64,8	65,9	32,0	8,5	33,6	4,3	2,9	0,0	28,6	0,0	0,0	0,0
C	100,0	80,1	78,0	43,5	n.	53,4	n.n.	n.n.	n.n.	29,8	n.n.	n.n.	n.n.
EC	100,0	71,9	70,6	34,7	7,9	35,8	n.	n.	n.n.	18,8	n.n.	n.n.	n.
ECG	100,0	70,9	70,0	56,1	13,3	70,0	24,0	14,1	n.n.	56,7	n.n.	n.n.	n.
EGC	100,0	51,9	59,6	17,3	4,0	14,3	n.n.	n.n.	n.n.	7,8	n.n.	n.n.	n.
EGCG	100,0	78,4	72,5	47,5	13,2	53,8	8,8	6,0	n.n.	50,3	n.n.	n.n.	n.

Tabelle 48 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit 0,2 % Vit C stabilisierten W/O-Emulsion (E 27) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [$\mu\text{g/g}$]

Catechine [$\mu\text{g/g}$]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
C+EC+ECG	26,9	22,7	21,6	21,6	17,6	22,8	21,3	19,9	16,8	21,5	22,2	17,7	11,5
EGC+EGCG	93,2	81,4	79,4	77,5	62,9	78,1	71,0	67,0	54,4	78,9	71,3	65,0	38,0
C	2,0	2,0	1,9	1,8	1,6	2,0	1,8	1,7	1,7	2,2	2,2	1,8	1,4
EC	14,3	13,3	12,7	12,6	10,3	12,3	12,0	11,0	9,1	11,9	12,4	10,0	5,9
ECG	10,5	7,4	7,0	7,1	5,6	8,5	7,6	7,1	6,0	7,3	7,6	6,0	4,2
EGC	49,0	41,8	40,7	40,1	32,5	39,8	36,6	34,5	27,9	40,3	36,9	33,0	17,9
EGCG	44,2	39,6	38,8	37,5	30,3	38,3	34,4	32,5	26,6	38,6	34,4	32,0	20,1

Tabelle 49 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit 0,2 % Vit C stabilisierten W/O-Emulsion (E 27) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [%]

Catechine [%]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
C+EC+ECG	100,0	84,6	80,4	80,2	65,3	84,7	79,4	73,9	62,3	79,8	82,7	66,0	42,7
EGC+EGCG	100,0	87,4	85,2	83,2	67,4	83,8	76,2	71,9	58,4	84,7	76,5	69,7	40,8
C	100,0	98,0	94,1	90,2	78,9	97,1	87,3	85,3	82,8	107,4	106,4	88,7	70,1
EC	100,0	92,9	88,9	88,2	72,2	85,9	83,7	77,1	63,4	83,4	86,8	69,5	41,0
ECG	100,0	70,7	66,3	67,3	53,3	80,6	71,9	67,3	56,9	69,5	72,6	56,7	39,7
EGC	100,0	85,2	82,9	81,7	66,3	81,1	74,7	70,3	56,8	82,1	75,2	67,3	36,5
EGCG	100,0	89,7	87,8	84,8	68,7	86,7	77,9	73,7	60,2	87,5	77,9	72,4	45,6

Tabelle 50 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit 0,4 % Vit C stabilisierten W/O-Emulsion (E 29) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [$\mu\text{g/g}$]

Catechine [$\mu\text{g/g}$]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
C+EC+ECG	24,7	18,7	18,0	18,8	16,4	21,4	19,9	18,6	15,9	20,3	19,1	10,9	9,2
EGC+EGCG	86,5	66,2	64,6	66,8	58,4	72,4	66,9	61,4	49,7	73,0	68,4	38,6	29,4
C	1,8	1,6	1,6	1,6	1,5	1,9	1,8	1,6	1,6	2,0	2,0	1,1	1,0
EC	12,7	10,7	10,4	10,8	9,6	11,4	10,7	10,0	8,6	11,2	10,7	5,6	4,5
ECG	10,1	6,4	6,0	6,4	5,3	8,2	7,4	7,1	5,8	7,1	6,4	4,2	3,7
EGC	44,3	33,5	32,9	33,8	30,0	36,5	34,4	30,9	25,2	36,6	35,4	18,3	13,1
EGCG	42,1	32,8	31,6	33,0	28,4	35,9	32,5	30,5	24,5	36,4	33,1	20,3	16,4

Tabelle 51 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit 0,4 % Vit C stabilisierten W/O-Emulsion (E 29) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [%]

Catechine [%]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
C+EC+ECG	100,0	75,5	72,8	76,1	66,2	86,8	80,5	75,4	64,3	82,0	77,3	44,2	37,2
EGC+EGCG	100,0	76,6	74,7	77,3	67,5	83,8	77,3	71,1	57,5	84,4	79,1	44,6	34,0
C	100,0	87,5	85,3	87,0	79,9	101,1	96,7	86,4	84,2	107,6	109,8	57,1	55,4
EC	100,0	83,7	81,6	84,6	75,7	89,4	83,7	78,3	67,1	87,8	84,2	44,3	35,2
ECG	100,0	63,0	59,3	63,3	51,9	80,9	73,5	69,8	57,2	70,0	62,7	41,7	36,5
EGC	100,0	75,5	74,3	76,2	67,7	82,4	77,6	69,7	56,9	82,6	79,8	41,2	29,4
EGCG	100,0	77,7	75,1	78,4	67,3	85,2	77,1	72,4	58,0	86,3	78,5	48,2	38,9

Tabelle 52 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit 0,6 % Vit C stabilisierten W/O-Emulsion (E 30) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [µg/g]

Catechine [µg/g]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
C+EC+ECG	23,1	16,4	15,3	13,9	14,6	18,8	18,6	18,2	13,6	17,0	16,8	15,3	7,8
EGC+EGCG	81,5	59,1	56,8	50,7	51,1	63,3	60,4	59,8	42,0	62,1	61,1	54,8	24,7
C	1,6	1,4	1,4	1,1	1,3	1,6	1,7	1,6	1,3	1,7	1,6	1,5	0,9
EC	11,9	9,2	8,7	7,8	8,5	9,5	9,9	9,7	6,9	9,1	9,3	8,4	3,6
ECG	9,7	5,8	5,3	4,9	4,8	7,8	7,0	6,9	5,4	6,3	5,9	5,4	3,3
EGC	41,9	28,9	27,9	24,5	26,0	30,2	30,3	29,9	20,4	29,5	30,3	26,7	10,8
EGCG	39,7	30,2	29,0	26,3	25,1	33,1	30,1	30,0	21,5	32,6	30,8	28,0	13,9

Tabelle 53 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit 0,6 % Vit C stabilisierten W/O-Emulsion (E 30) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [%]

Catechine [%]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
C+EC+ECG	100,0	70,7	66,2	59,9	63,0	81,3	80,2	78,8	58,6	73,5	72,8	65,9	33,5
EGC+EGCG	100,0	72,5	69,7	62,2	62,7	77,6	74,1	73,4	51,5	76,1	74,9	67,2	30,3
C	100,0	86,0	86,6	71,3	84,7	99,4	105,7	102,5	84,7	107,6	100,6	96,8	58,6
EC	100,0	77,4	73,1	66,0	71,6	79,9	83,4	82,0	57,8	76,4	78,8	70,4	30,2
ECG	100,0	59,9	54,5	50,7	49,0	80,1	72,1	71,1	55,2	64,5	61,0	55,5	33,5
EGC	100,0	69,0	66,6	58,5	62,0	72,2	72,4	71,4	48,8	70,4	72,4	63,9	25,8
EGCG	100,0	76,1	73,0	66,1	63,3	83,3	75,9	75,5	54,3	82,1	77,6	70,6	35,1

Tabelle 54 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit EDTA stabilisierten O/W-Emulsion (E 32) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [$\mu\text{g/g}$]

Catechine [$\mu\text{g/g}$]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
C+EC+ECG	27,8	24,7	24,4	22,2	20,3	24,3	23,0	16,7	4,0	23,7	20,3	1,2	0,2
EGC+EGCG	98,2	79,0	74,8	46,1	32,6	78,4	64,0	20,0	0,0	80,0	46,2	5,3	0,0
C	2,4	2,2	2,3	2,1	2,1	2,3	2,2	1,7	0,5	2,3	2,2	n.n.	n.n.
EC	15,0	13,9	13,6	12,3	11,3	13,8	13,2	9,4	1,9	14,0	12,0	0,4	0,2
ECG	10,4	8,7	8,6	7,8	7,0	8,2	7,6	5,7	1,7	7,5	6,1	0,8	n.
EGC	52,5	42,5	39,8	22,7	15,1	40,4	32,4	7,3	n.n.	41,6	21,6	1,5	n.n.
EGCG	45,7	36,5	34,9	23,4	17,5	38,0	31,6	12,8	n.	38,3	24,6	3,7	n.n.

Tabelle 55 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit EDTA stabilisierten O/W-Emulsion (E 32) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [%]

Catechine [%]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
C+EC+ECG	100,0	88,9	87,8	79,8	73,2	87,3	82,6	60,1	14,4	85,4	73,1	4,2	0,6
EGC+EGCG	100,0	80,4	76,1	47,0	33,2	79,9	65,2	20,4	0,0	81,4	47,0	5,3	0,0
C	100,0	90,4	95,0	85,4	86,7	94,2	90,0	69,6	18,8	96,3	91,7	n.n.	n.n.
EC	100,0	92,4	90,4	82,2	75,2	91,8	88,3	62,5	12,3	93,1	80,0	2,5	1,1
ECG	100,0	83,5	82,5	75,1	67,1	79,1	72,7	54,5	16,4	71,6	58,8	7,8	n.
EGC	100,0	80,9	75,8	43,2	28,8	77,0	61,7	13,8	n.n.	79,3	41,2	2,9	n.n.
EGCG	100,0	79,9	76,5	51,3	38,2	83,2	69,2	28,0	n.	83,9	53,8	8,2	n.n.

Tabelle 56 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit EDTA und 0,2 % Vit C stabilisierten O/W-Emulsion (E 21) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [$\mu\text{g/g}$]

Catechine [$\mu\text{g/g}$]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
C+EC+ECG	27,9	23,6	21,5	20,4	21,0	22,9	21,8	17,6	19,6	22,4	21,0	10,9	17,2
EGC+EGCG	101,0	76,0	67,9	65,0	66,7	76,0	72,2	56,5	57,7	79,3	74,2	5,1	50,9
C	2,3	2,1	2,0	1,9	2,3	2,0	2,1	1,7	2,7	2,2	2,3	1,3	3,3
EC	15,1	13,1	11,9	11,1	11,5	13,0	12,3	9,5	10,7	13,1	12,2	6,2	9,0
ECG	10,5	8,5	7,6	7,4	7,2	7,9	7,5	6,3	6,2	7,2	6,5	3,5	4,9
EGC	54,0	40,7	34,6	34,4	35,7	39,3	37,0	28,1	30,2	41,5	38,8	0,7	26,3
EGCG	47,0	35,3	33,3	30,5	31,0	36,7	35,2	28,4	27,6	37,8	35,4	4,4	24,6

Tabelle 57 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit EDTA und 0,2 % Vit C stabilisierten O/W-Emulsion (E 21) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [%]

Catechine [%]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
C+EC+ECG	100,0	84,5	76,9	73,1	75,4	82,1	78,2	63,0	70,2	80,4	75,3	39,2	61,5
EGC+EGCG	100,0	75,3	67,3	64,3	66,1	75,3	71,5	55,9	57,2	78,5	73,5	5,0	50,4
C	100,0	88,7	85,3	83,5	99,6	87,0	89,2	73,6	116,0	95,2	98,7	54,5	141,1
EC	100,0	86,7	78,8	73,7	76,5	86,0	81,4	63,3	70,8	86,6	80,8	41,2	59,4
ECG	100,0	80,5	72,3	69,9	68,5	75,4	71,1	60,2	59,3	68,2	62,1	32,8	46,9
EGC	100,0	75,4	64,1	63,7	66,1	72,8	68,5	52,0	55,8	76,9	71,9	1,3	48,7
EGCG	100,0	75,2	70,9	65,0	66,0	78,2	75,0	60,5	58,7	80,4	75,3	9,3	52,3

Tabelle 58 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit EDTA und 0,4 % Vit C stabilisierten O/W-Emulsion (E 24) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [µg/g]

Catechine [µg/g]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
C+EC+ECG	29,0	24,7	23,4	24,1	23,9	25,4	24,9	20,3	21,4	24,0	23,8	13,7	19,7
EGC+EGCG	99,3	82,0	75,6	78,4	77,4	84,0	82,1	70,1	67,4	85,1	82,9	48,5	62,6
C	2,2	2,2	2,1	2,2	2,3	2,3	2,3	1,9	2,5	2,4	2,5	1,4	2,8
EC	15,2	13,7	12,8	13,4	13,3	14,8	14,5	11,4	12,2	14,1	13,8	7,5	11,1
ECG	11,6	8,8	8,4	8,6	8,3	8,4	8,1	7,0	6,8	7,5	7,5	4,8	5,8
EGC	52,7	43,6	40,1	41,7	41,2	44,0	42,8	35,6	35,3	44,8	43,1	23,6	32,7
EGCG	46,6	38,4	35,6	36,7	36,2	40,0	39,3	34,5	32,0	40,3	39,8	24,9	30,0

Tabelle 59 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit EDTA und 0,4 % Vit C stabilisierten O/W-Emulsion (E 24) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [%]

Catechine [%]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
C+EC+ECG	100,0	85,0	80,6	83,0	82,3	87,6	85,7	69,9	73,6	82,8	81,9	47,2	67,8
EGC+EGCG	100,0	82,5	76,2	78,9	77,9	84,5	82,7	70,5	67,8	85,7	83,4	48,8	63,1
C	100,0	99,5	95,9	98,2	104,1	103,2	102,7	85,1	111,8	110,4	112,2	63,8	124,4
EC	100,0	89,9	84,2	87,8	87,5	97,0	95,2	75,1	79,8	92,8	90,8	49,4	73,0
ECG	100,0	75,8	72,8	73,8	71,3	72,2	70,0	60,1	58,2	64,4	64,5	41,2	50,1
EGC	100,0	82,6	76,0	79,0	78,1	83,3	81,2	67,5	67,0	85,0	81,8	44,8	61,9
EGCG	100,0	82,4	76,3	78,7	77,7	85,9	84,3	74,0	68,7	86,4	85,3	53,4	64,3

Tabelle 60 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit EDTA und 0,6 % Vit C stabilisierten O/W-Emulsion (E 25) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [µg/g]

Catechine [µg/g]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
C+EC+ECG	29,4	23,9	22,9	23,9	20,2	24,2	24,1	23,9	22,2	24,1	23,6	16,4	20,6
EGC+EGCG	101,2	79,0	76,2	79,7	66,1	81,1	83,3	80,5	72,6	85,1	83,8	58,1	67,1
C	2,3	2,2	2,0	2,1	2,0	2,3	2,3	2,3	2,5	2,4	2,5	1,6	2,7
EC	15,8	13,3	12,8	13,4	11,4	14,4	14,3	14,2	13,2	14,1	13,8	9,3	12,0
ECG	11,4	8,4	8,1	8,4	6,8	7,5	7,5	7,4	6,5	7,6	7,4	5,5	6,0
EGC	53,7	41,6	40,2	42,4	35,2	42,1	43,7	42,4	38,6	44,7	43,9	29,2	35,4
EGCG	47,5	37,4	36,0	37,3	30,9	39,0	39,6	38,1	34,1	40,5	40,0	28,8	31,8

Tabelle 61 Stabilität von Grüntee-Catechinen in einer mit EDTA und 0,6 % Vit C stabilisierten O/W-Emulsion (E 25) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [%]

Catechine [%]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
C+EC+ECG	100,0	81,0	77,7	81,3	68,5	82,2	81,9	81,3	75,4	81,8	80,3	55,8	70,0
EGC+EGCG	100,0	78,1	75,3	78,7	65,3	80,2	82,3	79,6	71,8	84,1	82,8	57,4	66,3
C	100,0	94,3	89,1	93,4	86,0	98,7	102,2	100,0	107,0	104,8	107,4	71,6	116,2
EC	100,0	84,5	81,0	84,7	72,4	91,5	90,4	90,1	83,9	89,3	87,5	59,2	76,0
ECG	100,0	73,6	70,9	74,2	59,7	66,1	65,9	65,2	57,2	66,9	64,8	48,1	52,5
EGC	100,0	77,5	74,8	78,9	65,5	78,4	81,3	79,0	71,8	83,1	81,7	54,4	65,8
EGCG	100,0	78,7	75,8	78,6	65,1	82,1	83,4	80,2	71,7	85,2	84,1	60,7	66,9

Daten zur Untersuchung der Vit C-Gehalte

Tabelle 62 Vit C-Gehalte in O/W und W/O-Emulsionen nach einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [%]

Vit C [%]	E 21 O/W	E 24 O/W	E 25 O/W	E 27 W/O	E 29 W/O	E 30 W/O
Einsatzkonzentration	0,20	0,40	0,60	0,20	0,40	0,60
6 Monate +6°C	0,13	0,28	0,52	0,16	0,36	0,41
6 Monate RT	0,12	0,23	0,46	0,16	0,33	0,39
6 Monate RT+L	n.	0,12	0,31	0,11	0,15	0,22
6 Monate BR	0,06	0,19	0,32	0,09	0,22	0,23

Daten zur Untersuchung der Penetrationseigenschaften von Grüntee-Extrakt

Tabelle 63 Penetrationseigenschaften der Leitsubstanz Epigallocatechin: Einzeldaten [%] und statistische Daten

Verteilung [%]	1. Probe	2. Probe	3. Probe	4. Probe	Mittelwert	Stabw.	Rel. Stabw.	Vertrauensber.
Oberfläche	18,47	20,24	19,18	19,50	19,35	0,73	3,79	1,15
Hornschicht	28,75	25,02	30,74	18,92	25,86	5,20	20,10	8,13
Epidermis	1,43	0,67	1,65	1,8	1,39	0,50	35,96	0,78
Dermis	0,19	0,06	n.n.	n.n.	0,06	0,09	140,15	0,14
Rezeptorphase	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-	-	-	-
Wiederfindungsrate	48,83	45,99	51,56	40,22	46,65	4,21	9,01	6,58

Tabelle 64 Penetrationseigenschaften der Leitsubstanz Epigallocatechingallat: Einzeldaten [%] und statistische Daten

Verteilung [%]	1. Probe	2. Probe	3. Probe	4. Probe	Mittelwert	Stabw.	Rel. Stabw.	Vertrauensber.
Oberfläche	18,89	21,71	28,45	29,40	24,61	5,13	20,83	8,02
Hornschicht	36,12	30,17	51,05	29,82	36,79	9,94	27,01	15,54
Epidermis	2,74	1,93	3,31	3,32	2,83	0,66	23,27	1,03
Dermis	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-	-	-	-
Rezeptorphase	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-	-	-	-
Wiederfindungsrate	57,75	53,80	82,82	62,55	64,23	11,17	17,39	17,47

Tabelle 65 Penetrationseigenschaften der Leitsubstanz Catechin: Einzeldaten [%] und statistische Daten

Verteilung [%]	1. Probe	2. Probe	3. Probe	4. Probe	Mittelwert	Stabw.	Rel. Stabw.	Vertrauensber.
Oberfläche	22,76	25,56	30,44	32,83	27,90	4,57	16,39	7,15
Hornschicht	38,56	37,35	52,46	27,78	39,04	10,17	26,04	15,90
Epidermis	1,90	n.n.	2,59	3,16	1,91	1,37	71,92	2,15
Dermis	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-	-	-	-
Rezeptorphase	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-	-	-	-
Wiederfindungsrate	63,21	62,91	85,49	63,76	68,84	9,62	13,97	15,04

Tabelle 66 Penetrationseigenschaften der Leitsubstanz Epicatechin: Einzeldaten [%] und statistische Daten

Verteilung [%]	1. Probe	2. Probe	3. Probe	4. Probe	Mittelwert	Stabw.	Rel. Stabw.	Vertrauensber.
Oberfläche	20,81	24,40	28,36	30,48	26,02	4,29	16,48	6,71
Hornschicht	40,82	39,06	53,93	31,59	41,35	9,29	22,47	14,53
Epidermis	2,12	1,15	2,59	3,03	2,22	0,80	36,17	1,26
Dermis	0,40	0,21	0,21	0,20	0,26	0,10	38,75	0,15
Rezeptorphase	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-	-	-	-
Wiederfindungsrate	64,15	64,82	85,09	65,31	69,84	8,81	12,62	13,78

Tabelle 67 Penetrationseigenschaften der Leitsubstanz Epicatechingallat: Einzeldaten [%] und statistische Daten

Verteilung [%]	1. Probe	2. Probe	3. Probe	4. Probe	Mittelwert	Stabw.	Rel. Stabw.	Vertrauensber.
Oberfläche	18,34	21,42	30,10	32,41	25,57	6,76	26,43	10,57
Hornschicht	38,71	37,56	59,91	35,32	42,87	11,44	26,69	17,90
Epidermis	3,20	2,41	4,17	3,78	3,39	0,76	22,54	1,20
Dermis	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-	-	-	-
Rezeptorphase	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-	-	-	-
Wiederfindungsrate	60,24	61,39	94,19	71,51	71,83	13,63	18,96	21,32

9.3.2 Calendula officinalis

Daten zur Untersuchung der Lagerstabilität von Calendula-Extrakt

Tabelle 68 Stabilität von Calendula-CO₂-Extrakt in einer O/W-Emulsion (E 35) anhand der Leitsubstanzen Faradiolmyristat und Faradiolpalmitat während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [%]

Calendula-E. [%]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
F.-myristat	0,096	0,094	0,092	0,077	0,095	0,094	0,094	0,055	0,094	0,094	0,096	0,048	0,095
F.-palmitat	0,095	0,095	0,093	0,079	0,096	0,093	0,091	0,056	0,091	0,096	0,096	0,048	0,093
Mittelwert	0,096	0,095	0,093	0,078	0,096	0,094	0,093	0,056	0,093	0,095	0,096	0,048	0,094
WFR [%]	100,0	98,8	96,7	81,5	99,8	97,8	96,7	58,0	96,7	99,3	100,4	50,2	98,3

Tabelle 69 Stabilität von Calendula-CO₂-Extrakt in einer O/W-Emulsion (E 41) anhand der Leitsubstanzen Faradiolmyristat und Faradiolpalmitat während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [%]

Calendula-E. [%]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
F.-myristat	0,099	0,100	0,101	0,058	0,103	0,099	0,096	0,037	0,100	0,097	0,093	0,040	0,097
F.-palmitat	0,098	0,100	0,099	0,055	0,100	0,096	0,095	0,035	0,098	0,093	0,092	0,035	0,095
Mittelwert	0,099	0,100	0,100	0,057	0,102	0,098	0,096	0,036	0,099	0,095	0,093	0,038	0,096
WFR [%]	100,0	101,5	101,5	57,4	103,0	99,0	97,0	36,5	100,5	96,4	93,9	38,1	97,5

Tabelle 70 Stabilität von Calendula-CO₂-Extrakt in einer nicht stabilisierten O/W-Emulsion (E 37) anhand der Leitsubstanzen Faradiolmyristat und Faradiolpalmitat während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [%]

Calendula-E. [%]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
F.-myristat	0,097	0,096	0,098	0,067	0,099	0,096	0,097	0,051	0,094	0,090	0,087	0,051	0,092
F.-palmitat	0,098	0,097	0,095	0,064	0,098	0,094	0,095	0,049	0,094	0,090	0,086	0,052	0,091
Mittelwert	0,098	0,097	0,097	0,066	0,099	0,095	0,096	0,050	0,094	0,090	0,087	0,052	0,092
WFR [%]	100,0	99,0	99,0	67,2	101,0	97,4	98,5	51,3	96,4	92,3	88,7	52,8	93,8

Tabelle 71 Stabilität von Calendula-CO₂-Extrakt in einer mit Tocopherolacetat stabilisierten O/W-Emulsion (E 38) anhand der Leitsubstanzen Faradiolmyristat und Faradiolpalmitat während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [%]

Calendula-E. [%]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
F.-myristat	0,081	0,080	0,081	0,066	0,082	0,082	0,083	0,065	0,082	0,075	0,074	0,055	0,078
F.-palmitat	0,082	0,077	0,080	0,064	0,082	0,080	0,082	0,063	0,084	0,079	0,076	0,055	0,080
Mittelwert	0,082	0,079	0,081	0,065	0,082	0,081	0,083	0,064	0,083	0,077	0,075	0,055	0,079
WFR [%]	100,0	96,3	98,8	79,8	100,6	99,4	101,2	78,5	101,8	94,5	92,0	67,5	96,9

Tabelle 72 Stabilität von Calendula-CO₂-Extrakt in einer mit Tocopherolacetat und BHT stabilisierten O/W-Emulsion (E 38) anhand der Leitsubstanzen Faradiolmyristat und Faradiolpalmitat während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [%]

Calendula-E. [%]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
F.-myristat	0,099	0,107	0,099	0,096	0,105	0,102	0,104	0,088	0,103	0,094	0,097	0,078	0,098
F.-palmitat	0,100	0,105	0,102	0,095	0,105	0,103	0,101	0,086	0,101	0,093	0,093	0,075	0,097
Mittelwert	0,100	0,106	0,101	0,096	0,105	0,103	0,103	0,087	0,102	0,094	0,095	0,077	0,098
WFR [%]	100,0	106,5	101,0	96,0	105,5	103,0	103,0	87,4	102,5	94,0	95,5	76,9	98,0

Daten zur Untersuchung der Penetrationseigenschaften von Calendula-Extrakt

Tabelle 73 Penetrationseigenschaften von Calendula-Extrakt anhand der Leitsubstanz Faradiolmyristat: Einzeldaten [%] und statistische Daten

Verteilung [%]	1. Probe	2. Probe	Mittelwert	Stabw.	Rel. Stabw.	Vertrauensbereich
Oberfläche	31,32	43,83	37,58	8,85	23,54	79,48
Hornschicht	40,82	30,14	35,48	7,55	21,28	67,83
Epidermis	0,86	0,99	0,92	0,10	10,34	0,86
Dermis	n.n.	n.n.	-	-	-	-
Rezeptorphase	n.n.	n.n.	-	-	-	-
Wiederfindungsrate	72,99	74,96	73,98	0,98	1,33	8,85

Tabelle 74 Penetrationseigenschaften von Calendula-Extrakt anhand der Leitsubstanz Faradiolpalmitat: Einzeldaten [%] und statistische Daten

Verteilung [%]	1. Probe	2. Probe	Mittelwert	Stabw.	Rel. Stabw.	Vertrauensbereich
Oberfläche	32,13	44,54	38,34	8,78	22,9	78,89
Hornschicht	36,73	29,10	32,92	5,39	16,39	48,46
Epidermis	0,65	0,83	0,74	0,13	17,08	1,14
Dermis	n.n.	n.n.	-	-	-	-
Rezeptorphase	n.n.	n.n.	-	-	-	-
Wiederfindungsrate	69,51	74,48	71,99	2,48	3,45	22,32

9.3.3 Glycyrrhiza glabra

Daten zur Untersuchung der Lagerstabilität von Süßholzwurzel-Extrakt

Tabelle 75 Stabilität von Glycyrrhizinsäure und Glycyrrhetinsäure in einer O/W-Emulsion (E 43) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [$\mu\text{g/g}$]

Gehalte [$\mu\text{g/g}$]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
Glycyrrhizins.	20,7	19,9	19,8	19,3	19,3	19,6	20,0	20,0	19,9	20,4	20,2	20,4	20,8
Glycyrrhetins.	0,26	0,21	0,26	0,26	0,21	0,23	0,27	0,30	0,29	0,21	0,24	0,26	0,31

Tabelle 76 Stabilität von Glycyrrhizinsäure und Glycyrrhetinsäure in einer O/W-Emulsion (E 43) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [%]

Gehalte [%]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
Glycyrrhizins.	100,0	96,1	95,7	93,2	93,2	94,7	96,6	96,6	96,1	98,6	97,4	98,6	100,6
Glycyrrhetins.	100,0	80,8	100,0	100,0	80,8	88,5	103,8	115,4	111,5	80,8	92,3	100,0	119,2

Tabelle 77 Stabilität von Glycyrrhizinsäure und Glycyrrhetinsäure in einer W/O-Emulsion (E 44) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [$\mu\text{g/g}$]

Gehalte [$\mu\text{g/g}$]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
Glycyrrhizins.	20,5	20,2	19,6	19,6	18,7	20,4	20,5	20,0	19,5	21,2	20,0	20,2	19,4
Glycyrrhetins.	0,27	0,26	0,26	0,25	0,27	0,29	0,29	0,2	0,30	0,27	0,26	0,26	0,30

Tabelle 78 Stabilität von Glycyrrhizinsäure und Glycyrrhetinsäure in einer W/O-Emulsion (E 44) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [%]

Gehalte [%]	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
Glycyrrhizins.	100,0	98,5	95,6	95,6	91,2	99,5	100,0	97,6	95,1	103,3	97,6	98,5	94,7
Glycyrrhetins.	100,0	96,3	96,3	92,6	100,0	107,4	107,4	96,3	111,1	100,0	96,3	96,3	111,1

Daten zur Untersuchung der Penetrationseigenschaften von Süßholzwurzel-Extrakt**Tabelle 79 Penetrationseigenschaften der Leitsubstanz Glycyrrhizinsäure: Einzeldaten [%] und statistische Daten**

Verteilung [%]	1. Probe	2. Probe	3. Probe	4. Probe	Mittelwert	Stabw.	Rel. Stabw.	Vertrauensber.
Oberfläche	43,71	52,49	51,72	45,78	48,43	4,34	8,97	6,79
Hornschicht	20,07	23,82	26,40	23,37	23,41	2,60	11,10	4,06
Epidermis	1,18	1,53	1,36	1,21	1,32	0,16	12,32	0,25
Dermis	0,12	0,15	0,14	0,13	0,14	0,01	8,21	0,02
Rezeptorphase	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-	-	-	-
Wiederfindungsrate	65,09	77,99	79,62	70,48	73,26	5,86	7,99	9,16

9.3.4 Terminalia sericeaDaten zur Untersuchung der Lagerstabilität von Terminalia-Extrakt**Tabelle 80 Stabilität von Sericosid in einer O/W-Emulsion (E 48) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [µg/g] und Gehalte [%]**

Sericosid	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
Gehalte [µg/g]	45,2	43,9	45,4	44,2	43,5	44,8	46,3	43,6	42,5	45,2	43,7	40,6	42,3
Gehalte [%]	100,0	97,2	100,4	97,8	96,2	99,2	102,5	96,4	94,0	100,1	96,7	89,8	93,7

Tabelle 81 Stabilität von Sericosid in einer W/O-Emulsion (E 47) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [µg/g] und Gehalte [%]

Sericosid	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
Gehalte [µg/g]	46,8	48,1	47,8	46,9	46,5	49,1	48,9	46,6	46,1	47,6	47,0	46,5	47,0
Gehalte [%]	100,0	102,8	102,2	100,3	99,4	105,0	104,4	99,5	98,4	101,6	100,4	99,4	100,3

Daten zur Untersuchung der Penetrationseigenschaften von Terminalia-Extrakt**Tabelle 82 Penetrationseigenschaften der Leitsubstanz Sericosid: Einzeldaten [%] und statistische Daten**

Verteilung [%]	1. Probe	2. Probe	3. Probe	Mittelwert	Stabw.	Rel. Stabw.	Vertrauensber.
Oberfläche	66,08	71,51	65,47	67,69	3,33	4,92	8,27
Hornschicht	26,76	19,62	26,61	24,33	4,08	16,76	10,13
Epidermis	0,72	1,47	1,00	1,06	0,38	35,84	0,95
Dermis	0,18	0,41	0,23	0,28	0,12	44,15	0,30
Rezeptorphase	n.n.	n.n.	n.n.	-	-	-	-
Wiederfindungsrate	93,74	93,02	93,31	93,36	0,29	0,32	0,73

9.3.5 Echinacea purpurea

Daten zur Untersuchung der Lagerstabilität von Echinacea-Extrakt

Tabelle 83 Stabilität von Cichoriensäure in einer O/W-Emulsion (D 16) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [$\mu\text{g/g}$] und Gehalte [%]

Cichoriensäure	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
Gehalte [$\mu\text{g/g}$]	205,1	195,8	195,4	197,9	174,4	193,9	179,8	179,9	147,7	192,3	170,1	154,5	144,1
Gehalte [%]	100,0	95,5	95,3	96,5	85,0	94,5	87,7	87,7	72,0	93,8	82,9	75,3	70,3

Tabelle 84 Stabilität von Cichoriensäure in einer W/O-Emulsion (D 17) während einer Lagerzeit von 6 Monaten unter verschiedenen Lagerungsbedingungen: Gehalte [$\mu\text{g/g}$] und Gehalte [%]

Cichoriensäure	0 Mo	1 Mo +6°C	1 Mo RT	1 Mo RT+L	1 Mo BR	3Mo +6°C	3Mo RT	3Mo RT+L	3Mo BR	6Mo +6°C	6Mo RT	6Mo RT+L	6Mo BR
Gehalte [$\mu\text{g/g}$]	215,6	207,5	201,2	198,2	190,0	207,0	206,4	197,0	184,8	202,3	202,2	192,9	174,6
Gehalte [%]	100,0	96,2	93,3	91,9	88,1	96,0	95,7	91,4	85,7	93,8	93,8	89,5	81,0

Daten zur Untersuchung der Penetrationseigenschaften von Echinacea-Extrakt

Tabelle 85 Penetrationseigenschaften der Leitsubstanz Cichoriensäure: Einzeldaten [%] und statistische Daten

Verteilung [%]	1. Probe	2. Probe	3. Probe	4. Probe	Mittelwert	Stabw.	Rel. Stabw.	Vertrauensber.
Oberfläche	53,36	32,76	49,19	34,16	42,37	10,44	24,64	16,33
Hornschicht	15,22	14,15	22,02	21,01	18,10	3,99	22,04	6,24
Epidermis	1,04	1,70	2,12	3,42	2,07	1,01	48,55	1,57
Dermis	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-	-	-	-
Rezeptorphase	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-	-	-	-
Wiederfindungsrate	69,61	48,61	73,32	58,59	62,53	9,69	15,50	15,16

9.4 Chemikalien und Geräte

9.4.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller	R- und S-Sätze	MAK-Wert [ml/m ³]	Gefahren- symbol
Ameisensäure	Merck	R 35 S 23.2-26-45	5	C
Ammoniumacetat	Merck			
Anisaldehyd-Sprühreagenz	Sigma	R 11-8-49-23/24/25-34 S 16-17-45-36/37/39		T+
Ascorbinsäure	Meck			
Butylhydroxyanisol	Merck			
Butylhydroxytoluol	Merck			
tert-Butylmethylether	Merck	R 11 S 9-16-29-43.3		F
(±)-Catechin	Sigma	R 36/37/38 S 26-36		Xi
(-)-Catechingallat	Sigma	R 36/37/38 S 26-36		Xi
Chloroform	Merck	R 22-38-40-48/20/22 S 36/37	10	Xn
Chloroform-D1	Merck	R 22-38-40-48/20/22 S 36/37	10	Xn
Cichoriensäure	Madaus			
(-)-Epicatechin	Sigma	R 36/37/38 S 26-36		Xi
(-)-Epicatechingallat	Sigma	R 36/37/38 S 26-36		Xi
(-)-Epigallocatechin	Sigma	R 36/37/38 S 26-36		Xi
(-)-Epigallocatechingallat	Sigma	R 36/37/38 S 26-36		Xi
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz-Lösung	Merck			
(-)-Galocatechin	Sigma	R 36/37/38 S 26-36		Xi
(-)-Galocatechingallat	Sigma	R 36/37/38 S 26-36		Xi

Gallussäure	Roth			
18 β -Glycyrrhetinsäure	Sigma	R 22 S 36		Xn
Glycyrrhizinsäure, Ammonium-Salz	Sigma	R 22 S 36		Xn
n-Hexan	Merck	R 11-48/20 S 9-16-24/25-29-51	50	F, Xn
Methanol	Merck	R 11-23/25 S 7-16-24-45	200	T, F
d ₄ -Methanol	Merck	R 11-23/25 S 7-16-24-45	200	T, F
meta-Phosphorsäure	Merck	R 34 S 26-36/37/39-45		C
2-Propanol	Merck	R 11 S 7-16	200	F
Sericosid	Indena			
Tetrahydrofuran	Merck	R 11-19-36/37 S 16-129-33	50	F, Xi
Tetramethylsilan	Sigma			
α -Tocopherolacetat	Sigma			

9.4.2 Geräte und Zubehör

Material	Bezeichnung	Hersteller
DC Fertigplatten	Kieselgel G 60 F ₂₅₄ , 10x20 cm, 0,25 mm Schichtdicke	Merck
DC Trennkammern	20x10 cm, mit Stahldeckel	Desaga
Dioden Array Detektor	DAD 1100	Agilent
HPLC-Anlage	Entgaser 1100	Agilent
	Quarternäre Pumpe 1100	
	Probengeber 1100	
	Säulenthermostat 1100	
HPLC-Säulen	Grom-Sil 120 ODS-3 CP, 3 µm 125x8 mm	Grom
	Grom-Sil 120 ODS-3 CP, 3 µm 60x2 mm	
	Grom-Sil 120 ODS-3 CP, 5 µm 60x2 mm	
	Grom-Sil 120 ODS-0 AB, 3 µm 60x2 mm	
	Grom-Sil 120 Octyl-5 CP, 5 µm 60x2 mm	
	RP select B LiChrospher, 5 µm 250x4 mm	Merck
Kulturröhrchen	12 ml	Sarstedt
Massenspektrometer	ESQUIRE-LC	Bruker
	MSD 1100	Agilent
Membranfilter	SRP 25, 0,45 µm	Sartorius
	RC 25, 0,45 µm	
Mikroliterspritze	Gastight 1725	Hamilton
Reinstwasseranlage	Milli Q A 10	Millipore
Spritzenpumpe	74900	Cole-Parmer
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 H	Bandelin
UV-Lampe	TL-900	Camag
Vials, Schraubkappen	N 8	Macherey & Nagel
Septen (PTFE)		
Vortex Mixer	REAX top	Heidolph
Zentrifuge	EBA 3 S	Hettich

10 Literatur

1. De Smet, P. A. G. M. (1997) The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. *Drugs* 54: 801-840
2. Dweck, A. C. (1996) Botanicals – research of actives. *Cosm & Toil* 111: 45-57
3. Dweck, A. C. (1992) Natural extracts and herbal oils: concentrated benefits for the skin. *Cosm & Toil* 107: 89-98
4. Lee, O.-S., Kang, H.-H., Han, S.-h. (1997) Oriental herbs in cosmetics. *Cosm & Toil* 112: 57-63
5. Industrieverband Körperpflege- und Waschmittel e.V. (IKW) Verbraucher-broschüre Kosmetika – Inhaltsstoffe – Funktionen, 1998
6. Kühni, M., Holzer, R. (1998) Pflanzliche Antioxidantien. *SÖFW-Journal* 124: 414-419
7. Schmidt, P. C. (1997) Standardisierung – Ein Mittel zur Sicherung der pharmazeutischen Qualität von pflanzlichen Arzneimitteln. *Dtsch Apoth. Ztg.* 137: 315-321
8. Barel, A. O., Clarys, P., Manou, I. (1997) Objective evaluation of the cosmetic use of some selected essential oils as “active ingredients“ in skin care products. In: Proceedings In Cosmetics 1997 in Düsseldorf, S. 109-121
9. Nowak, G. A. (1989) Statement zur Standardisierung und Gütebewertung von Pflanzenextrakten. *SÖFW-Journal* 115: 40-41
10. Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Neubekanntmachung vom 19.10.1994), Fassung vom 11.12.1998. In: C.H Beck'sche Verlagsbuchhal-tung, München.
11. Umbach, W. Vortrag anlässlich des 11. Symposiums der Deutschen Gesell-schaft für Wissenschaftliche und Angewandte Kosmetik (DGK) vom 03.-05.05.1995 in Hamburg

12. Verordnung über Kosmetische Mittel (Neubekanntmachung vom 19.06.1985), 28. ÄndV v. 18.12.1998. In: C.H Beck'sche Verlagsbuchhaltung, München
13. Raddatz, H. (1999) Analytik von Naturstoffen in kosmetischen Mitteln. *Lebensmittelchemie* 53: 140-141
14. Scholz, E., Bertram, B. (1995) *Camellia sinensis* (L.) O. KUNTZE – Der Tee-strauch. *Z. Phytother.* 17: 235-250
15. Chu, D.-C. (1997) Green tea – its cultivation, processing of the leaves for drinking materials, and kinds of green tea. In: Yamamoto, T., Juneja, L.R., Chu, D.-C., Kim, M. Chemistry and application of green tea. CRC Press, Boca Raton, New York, S. 1-11
16. Hänsel, R., Keller, K., Rimpler, H., Schneider, G. (Hrsg.) (1992) Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis – Drogen A-D. Springer-Verlag, Berlin, 5. Auflage
17. Balentine, D. A., Wiseman, S. A., Bouwens, L. C. M. (1997) The chemistry of tea flavonoids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37: 693-704
18. Herrman, K. (1983) Wertgebende Bestandteile des Tees – eine Übersicht. *Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem.* 37: 30-35
19. Chu, D.-C., Juneja, L. R. (1997) General chemical composition of green tea and its infusion. In: Yamamoto, T., Juneja, L. R., Chu, D.-C., Kim, M. Chemistry and application of green tea. CRC Press, Boca Raton, S. 13-22
20. Tsuchiya, H., Sato, M., Kato, H., Okubo, T., Juneja, L. R., Kim, M. (1997) Simultaneous determination of catechins in human saliva by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 703: 253-258
21. Balentine, D. A. (1992) Manufacturing and chemistry of tea. In: Ho, C. T., Lee, C. Y., Huang, M. T. (Hrsg.) Phenolic compounds in food and their effects on health. ACS Symposium Series 506, Washington, S. 102-117
22. Engelhardt, U. H., Finger, A., Herzig, B., Kuhr, S. (1992) Determination of flavonol glycosides in black tea. *Dtsch. Lebensm. Rdsch.* 88: 69-73

23. Kuhr, S., Engelhardt, U. H. (1991) Determination of flavanols, theogallin, gallic acid and caffeine in tea using HPLC. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 192: 526-529
24. Neumann, K., Montag, A. (1983) Beitrag zur Kenntnis einiger Stickstoffsubstanzen des Tees (*Camellia sinensis*). *Dtsch. Lebensm. Rdsch.* 79: 160-164
25. Pistorius, A. (1996) Biologische und pharmakologische Wirkung des grünen Tees. *SÖFW* 122: 468-471
26. Alexis, A. F., Jones, V. A., Stiller, M. J. (1999) Potential therapeutic applications of tea in dermatology. *Int. J. Dermatol.* 38: 735-743
27. Dweck, A. C. (1999) Detoxification. *Soap, Perfumery and Cosmetics* 10: 42-48
28. Wiseman, S. A., Balentine, D. A., Frei, B. (1997) Antioxidants in tea. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37: 705-718
29. Koketsu, M. (1997) Antioxidative activity of tea polyphenols. In: Yamamoto, T., Juneja, L. R., Chu, D.-C., Kim, M. Chemistry and application of green tea. CRC Press, Boca Raton, S. 37-50
30. Kumamoto, M., Sonda, T. (1998) Evaluation of the antioxidative activity of tea by an oxygen electrode method. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 175-177
31. Yen, G.-C., Chen, H.-Y. (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* 43: 27-32
32. Ley, R. D., Reeve, V. E. (1997) Chemoprevention of ultraviolet radiation-induced skin cancer. *Environ Health Perspect* 105: 981-984
33. Mukhtar, H., Katiyar, S. K., Argarwal, R. (1994) Green tea and skin – anticarcinogenic effects. *Soc. Invest. Dermatol.* 102: 3-7
34. Ruch, R. J., Cheng, S.-j., Klaunig, J. E. (1989) Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis* 10: 1003-1008

35. Zhao, J. F., Zhang, Y. J., Jin, X. H., Athar, M., Santella, R. M., Bickers, D. R., Wang, Z. Y. (1999) Green tea protects against psoralen plus ultraviolet A-induced photochemical damage to skin. *Soc. Invest. Dermatol.* 113: 1070-1075
36. Katiyar, S. K., Matsui, M. S., Elmets, C. A., Mukhtar, H. (1999) Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory response and infiltration of leukocytes in human skin. *Photochem. Photobiol.* 69: 148-153
37. Pelle, E., Muizzuddin, N., Mammone, T., Marenus, K., Maes, D. (1999) Protection against endogenous and UVB-induced oxidative damage in stratum corneum lipids by an antioxidant-containing cosmetic formulation. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 15: 115-119
38. Fisher, L. B., Smithey, T., Majmudar, G. (1999) In vivo assessment of irritants and anti-irritants. *J. Cosm. Sci.* 50: 192-193
39. Hibino, M., Sakanaka, S. (1997) Deodorizing effect of green tea extracts. In: Yamamoto, T., Juneja, L. R., Chu, D.-C., Kim, M. Chemistry and application of green tea. CRC Press, Boca Raton, S. 123-127
40. Otake, S., Makimura, M., Kuroki, T., Nishihara, Y., Hirasawa, M. (1991) Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Res.* 25: 438-443
41. Sakanaka, S. (1997) Green tea polyphenols for prevention of dental caries. In: Yamamoto, T., Juneja, L. R., Chu, D.-C., Kim, M. Chemistry and application of green tea. CRC Press, Boca Raton, S. 87-101
42. Takahashi, H., Ninomiya, M. (1997) Metabolism of tea polyphenols. In: Yamamoto, T., Juneja, L. R., Chu, D.-C., Kim, M. Chemistry and application of green tea. CRC Press, Boca Raton, S. 51-59
43. Isaac, O. (1992) Die Ringelblume, Botanik, Chemie, Pharmakologie, Toxikologie, Pharmazie und therapeutische Verwendung. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

44. Isaac, O. (1994) *Calendula officinalis* L. – Die Ringelblume, Portrait einer Arzneipflanze. *Z. Phytother.* 16: 357-370
45. Wichtl, M. (Hrsg.) (1997) Teedrogen und Phytopharmaka. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
46. Wojciechowski, Z., Bohenska-Hryniewicz, M., Kucharczak, B., Kasprzyk, Z. (1972) Sterol and triterpene alcohol esters from *Calendula officinalis*. *Phytochem.* 11: 1165-1168
47. Wilkomirski, B. (1987) Intracellular localization of metabolism of lupeol and its palmitate in *Calendula officinalis* flowers. *Phytochem.* 26: 1635-1637
48. Wilkomirski, B., Kasprzyk, Z. (1979) Free and ester-bound triterpene alcohols and sterol in cellular subfractions of *Calendula officinalis*. *Phytochem.* 18: 253-255
49. Kasprzyk, Z., Pyrek, J. (1968) Triterpenic alcohols of *Calendula officinalis* L. flowers. *Phytochem.* 7: 1631-1639
50. Adler, G., Kasprzyk, Z. (1976) Distribution of triterpene alcohols in subcellular fractions from *Calendula officinalis* flowers. *Phytochem.* 15: 205-207
51. Kasprzyk, Z., Pyrek, J., Jolad, S. D., Steelink, C. (1970) The identity of calenduladiol and thurberin: a lupenediol found in marigold flowers and organ pipe cactus. *Phytochem.* 9: 2065-2066
52. Sliwowski, J., Dziwanowska, K., Kasprzyk, Z. (1973) Ursadiol: a new triterpene diol from *Calendula officinalis* flowers. *Phytochem.* 12: 157-160
53. Avramova, S., Potarska, F., Apostolova, B., Petkova, S., Konteva, M., Tsekova, M., Kapitanova, T., Maneva, K. (1988) *MBI Med. Biol. Inf.* 28-33
54. Steinegger, E. Hänsel, R. (1988) Lehrbuch der Pharmakognosie und Phytopharmazie. Springer Verlag, Berlin, 4. Auflage

-
55. Piccaglia, R., Marotti, M., Chiavari, G., Gandini, N. (1997) Effects of harvesting date and climate on the flavonoid and carotinoid contents of marigold (*Calendula officinalis* L.). *Flavour and Fragrance J.* 12: 85-90
 56. Wagner, H., Proksch, A., Riess-Maurer, I., Vollmar, A., Odenthal, S., Stuppner, H., Jurcic, K., Le Turdu, M., Heur, Y. H. (1984) *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 34: 659-661
 57. Wagner, H., Proksch, A., Riess-Maurer, I., Vollmar, A., Odenthal, S., Stuppner, H., Jurcic, K., Le Turdu, M., Fang, J. V. (1985) Immunstimulierend wirkende Polysaccharide (Heteroglykane) aus höheren Pflanzen. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 35: 1069-1075
 58. Varljen, J., Liptak, A., Wagner, H. (1989). Structural analysis of a rhamnoarabinogalactan and arabinogalactans with immuno-stimulating activity from *Calendula officinalis*. *Phytochem.* 28: 2379-2383
 59. Yatsuno, A. I., Belova, L. F., Lipkina, G. S., Sokolov, S.Y., Turtneva, E. A. (1978) Pharmacology of calendulose B. A new terpene glycoside obtained from the roots of *Calendula officinalis*. *Russian Pharmacol. Toxicol.* 41: 1149-1153
 60. Della Loggia, R., Becker, H., Isaac, O., Tubaro, A. (1990) Topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* extracts. *Planta Med.* 56: 658
 61. Della Loggia, R., Tubaro, A., Sosa, S., Becker, H., Saar, S., Isaac, O., (1994) The role Triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med.* 60: 516-520
 62. Tubaro, A., Dri, P., Delbello, G., Zilli, C., Della Loggia, R. (1985) The croton oil ear test revisited. *Agents and Actions* 17: 347-349
 63. Zitterl-Eglseer, K., Sosa, S., Jurenitsch, J., Schubert-Zsilavec, M., Della-Loggia, R., Tubaro, A., Bertoldi, M., Franz, C. (1997) Anti-oedematous activities of the main triterpenediol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). *J Ethnopharm.* 57: 139-144

-
64. Theis, B., Theis, P. (1989) *Gesünder leben mit Heilkräutern*. Wilhelm Heyne Verlag, München, S. 293
 65. Council of Europe (1989) *Plant preparations used as ingredients of cosmetic products*, Strasbourg
 66. Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association (CTFA) (1980) *Acute oral toxicity of Calendula officinalis extract*.
 67. Hänsel, R., Keller, K., Rimpler, H., Schneider, G. (Hrsg.) (1993) *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis – Drogen E-O*. Springer-Verlag, Berlin, 5. Auflage
 68. Pahlow, M. (1993) *Heilpflanzen – Gesund durch die Heilkräfte der Natur*. Gräfe und Unzer Verlag, München
 69. Heeger, E. F. (1956) *Handbuch des Arznei- und Gewürzpflanzenbaues – Drogengewinnung*. Deutscher Bauernverlag, Berlin, S. 409-414
 70. Hoppe, H. A. (1975) *Drogenkunde*. Band 1, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, 8. Auflage, S. 541-544
 71. Lutomski, J. (1983) *Chemie und therapeutische Verwendung von Süßholz (Glycyrrhiza glabra L.)*. *Pharmazie in unserer Zeit* 12: 49-54
 72. Reiners, W. (1964) *Cumarine und Hydroxyzimtsäuren aus Süßholzwurzel*. *Naturwissensch.* 51: 193
 73. Eggensperger, H., Wilker, M. (1998) *Wasserlösliche Inhaltsstoffe der Süßholzwurzel als Wirkstoffe in der Kosmetik und Pharmazie*. *SÖFW* 124: 920-922
 74. Eggensperger, H., Wilker, M. (1996) *Glycyrrhetinsäure – und was man von einem multiaktiven Wirkstoff für die Kosmetik und Dermatologie erwarten darf*. *SÖFW* 122: 990-997

-
75. Tamura, Y, Nishikawa, T. Yamada, K., Yamamoto, M., Kumagai, A. (1979) Effects of glycyrrhetic acid and its derivatives on Δ -5 α - and 5 β -reductase in rat liver. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 29: 647-649
 76. Collin-Jones, E., Sommer, G. F. (1957) A non-steroidal anti-inflammatory agent in dermatology. *Medical Press* 238: 206-212
 77. Evans, F. (1958) The rational use of glycyrrhetic acid in dermatology. *Brit. J. Clinical Practise* 12: 135-141
 78. Mabberley, D. J. (1990) The plant book. Cambridge University Press, Cambridge, S. 573
 79. Palmer, E., Pitman, N. (1972) Trees of Southern Africa. A. A. Balkema, Kapstadt
 80. Hänsel, R., Keller, K., Rimpler, H., Schneider, G. (Hrsg.) (1994) Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis – Drogen P-Z. Springer-Verlag, Berlin, 5. Auflage
 81. Hegnauer, R. (1962-1992) Chemotaxonomie der Pflanzen. Band III, Birkhäuser Verlag, Basel, Stuttgart, S. 438-447
 82. Bombardelli, E., Bonati, A., Gabetta, B., Mustich, G. (1974) Triterpenoids of *Terminalia sericea*. *Phytochem.* 13: 2559-2562
 83. Watt, T. M., Breyer-Brandwijk, M. G. (1972) Medical and poisonous plants of southern and eastern Africa. Livingstone Ltd., Edinburgh, London
 84. Koenen, E. (1978) Heil- und Giftpflanzen in Südwestafrika. Akademischer Verlag, Windhuk, S. 112
 85. Bombardelli, E., Crippa, F., Pifferi, G. (1986) Sericoside, a new glucoside in functional cosmetics. In: Preprints Del 14. Congreso De La Federacion Internacional De Sociedades De Quimicos Cosméticos, Volume 2, S. 975-986

-
86. Pifferi, G., Zini, G. F., Cristoni, A. (1986) Sericoside: Antiinflammatory activity and occurrence in plants of the Terminalia genus. Presented at: Phytochemical Society of Europe – Symposium “ Biologically Active Natural Products“. Lausanne (abstract, poster)
 87. Hopf, G. (1965) Empfehlungen für die Prüfung kosmetischer Präparate auf Hautverträglichkeit und Sensibilisierung. *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 67: 974-977
 88. McGregor, R. L. (1968) The taxonomie of the genus Echinacea (Compositae). *The University of Kansas Science Bulletin* 48: 113-142
 89. Bauer, R., Remiger, P., Wagner, H. (1988) Echinacea – Vergleichende DC- und HPLC-Analyse der Herba-Drogen von Echinacea purpurea, E. palladia und E. angustifolia. *Dtsch. Apoth. Ztg.* 128: 174-180
 90. Bauer, R. (1997) Echinacea – Pharmazeutische Qualität und therapeutischer Wert. *Z. Phytother.* 18: 207-214
 91. Bauer, R. (1996) Echinacea-Drogen – Wirkungen und Wirksubstanzen. *Z. ärztl. Fortb.* 90: 111-115
 92. Bauer, R. (1988) Echinacea – Der Sonnenhut – Stand der Forschung. *Z. Phytother.* 9: 151-159
 93. Bauer, R., Wagner, H. (1990) Echinacea – Handbuch für Ärzte, Apotheker und andere Naturwissenschaftler. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
 94. Bauer, R., Khan, I., Wagner, H. (1986) Echinacea-Drogen – Standardisierung mittels HPLC und DC. *Dtsch. Apoth. Ztg* 126: 1065-1070
 95. Becker, H., Hsieh, W. C. (1985) Chicoree-Säure und deren Derivate aus Echinacea-Arten. *Z. Naturforsch* 40: 585-587
 96. Malonga-Makosi, J.-P. (1983) Untersuchung der Flavonoide von Echinacea angustifolia DC. Und Echinacea purpurea MOENCH. Dissertation, Heidelberg

-
97. Röder, E., Wiedenfeld, H., Hille, T., Britz-Kirstgen, R. (1984) Pyrrolizidine in *Echinacea angustifolia* DC. und *Echinacea purpurea* M. – Isolierung und Analytik. *Dtsch. Apoth. Ztg.* 124: 2316-2318
 98. Maffai Facino, R., Carini, M., Aldini, C., Marinello, C., Arlandini, E., Franzoi, L., Colombo, M., Pietta, P., Mauri, P. (1993) Direct characterization of caffeoyl esters with antihyaluronidase activity in crude extracts from *Echinacea angustifolia* roots by fast atom bombardement tandem mass spectrometry. *Il Farmaco* 48: 1447-1461
 99. Maffai Facino, R., Carini, M., Aldini, C., Saibene, L., Pietta, P., Mauri, P. (1995) Echinocoid and caffeoyl conjugates protect collagen from free radical-induced degradation: a potential use of *Echinacea* extracts in the prevention of skin photodamage. *Planta Med.* 61: 510-514
 100. Bauer, R., Remiger, P., Jurcic, K., Wagner, H. (1989) Beeinflussung der Phagozytoseaktivität durch *Echinacea*-Extrakte. *Z. Phytother.* 10: 43-48
 101. Müller-Jakic, B., Breu, W., Pröbstle, A., Redl, K., Greger, H., Bauer, R. (1994) In vitro inhibition of cyclooxygenase and 5-Lipoxygenase by alkylamides from *Echinacea* and *Achillea* species. *Planta Med.* 60: 37-40
 102. Mengs, U., Clare, C. B., Poiley, J. A. (1991) Toxicity of *Echinacea purpurea* – acute, subacute and genotoxicity studies. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 41: 1076-1081
 103. Kraus, C., Abel, G., Schimmer, O. (1985) Untersuchung einiger Pyrrolizidinalkaloide auf chromosomenschädigende Wirkung in menschlichen Lymphocyten in vitro. *Planta Med.* 51: 89-91
 104. Bauer, R. (1997) Standardisierung von *Echinacea-purpurea*-Preßsaft auf Cichoriensäure und Alkamide. *Z. Phytother.* 18: 270-276
 105. Umbach, W. (Hrsg.) (1995) Kosmetik – Entwicklung, Herstellung und Anwendung kosmetischer Mittel. Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage
 106. Beiersdorf AG (1998) Eucerin – Inhaltsstoffe, Galenik, Methoden

-
107. Podhaisky, H. P., Huschka, C., Wohlrab, W. (1999) Optimierung der topischen Therapie: Einsatz von In-vitro-Modellen. *Pharmazie* 54: 871-875
 108. Diembeck, W., Beck, H., Benech-Kieffer, F., Courtellemont, P., Dupius, J., Lovell, W., Paye, M., Spengler, J., Steiling, W. (1999) Test guidelines for in vitro assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. *Food and Chemical Toxicologie* 37: 191-205
 109. Franz, T. J. (1975) Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *J. Invest. Dermatol.* 64: 190-195
 110. Feldmann, R. J., Maibach, H. J. (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest. Dermatol.* 54: 399-404
 111. Busch, P., Müller, R., Pittermann, W. (1996) Use and limitations of the porcine skin model in cosmetic research. *Parfümerie und Kosmetik* 77: 20-27
 112. Richert, S., Schrader, A. (2000) Untersuchungen zum Penetrationsverhalten relevanter kosmetischer Wirkstoffe anhand des Schweinehautmodells. *SÖFW-Journal* 126: 56-62
 113. Diembeck, W., Düsing, H.-J., Grimmert, A., Akhiani, M., Hoppe, U. (1997) Dermal absorption and penetration of cosmetic and dermatologic ingredients in vivo modelled on excised pig skin in vitro. *J. Invest. Dermatol.* 108: 669-672
 114. Wolfender, J.-L., Hostettmann, K. (1996) Importance of LC/MS in plant analysis. *Spectroscopy Europe* 8: 7-12
 115. Mück, W. (1999) Quantitative analysis of pharmacokinetic study samples by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Pharmazie* 54: 639-644
 116. Whitehouse, R. C., Dreyer, R. N., Yamashita, M., Fenn, J. B. (1985) Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal. Chem.* 57: 675-679

-
117. Schmelzeisen-Redecker, G., Buttering, L., Röllgen, F. W. (1989) Desolvation of ions and molecules in thermospray mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 90: 139-150
 118. Iribarne, J. V., Thomson, B. A. (1976) On the evaporation of small ions from charged droplets, *J. Chem. Phys.* 64: 2237-2294
 119. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry for large biomolecules. *Science* 246: 64-71
 120. HP LC-MSD Reference Collection, Fa. Agilent, Waldbronn
 121. Creaser, C. S., Stygall, J. W. (1998) Recent developments in analytical ion trap mass spectrometry. *Trends Anal. Chem.* 17: 583-593
 122. Bruins, A. P. (1994) Atmospheric-pressure-ionization mass spectrometry. 1. Instrumentation and ionization techniques. *Trends Anal. Chem.* 13: 37-43
 123. Kaiser, R., Gottschalk, G. (1971) Elementare Tests zur Beurteilung von Meßdaten. B.I.-Wissenschaftsverlag, Mannheim
 124. Breemen, R. B. van (1995) Electrospray liquid chromatography-mass spectrometry of carotinoids. *Anal. Chem.* 67: 2004-2009
 125. Soicke, H., Al-Hassan, G., Görler, K. (1988) Weitere Kaffeesäure-Derivate aus *Echinacea purpurea*. *Planta Med.* 54: 175-176
 126. Höhne, H., Engelhardt, U. H. (1996) Analyse von Catechinen in Tee mittels Kapillarelektrophorese. *Lebensmittelchemie* 50: 161-162
 127. Arce, L., Rios, A., Valcarcel, M. (1998) Determination of anti-carcinogenic polyphenols present in green tea using capillary electrophoresis coupled to a flow injection system. *J. Chromatogr. A* 827: 113-120
 128. Kiehne, A., Engelhardt, U. H. (1996) Thermospray-LC-MS analysis of various groups of polyphenols in tea - I. Catechins, flavonol O-glycosides and flavone C-glycosides. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 202: 48-54

-
129. Dvorakova, K., Dorr, R. T., Valcic, S., Timmermann, B., Alberts, D. S. (1999) Pharmacokinetics of green tea derivative, EGCG, by the topical route of administration in mouse and human skin. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 43: 331-335
130. Grande, M., Torres, P., Piera, F., Bellido, I. S. (1992) Triterpenoids from *Dittrichia viscosa*. *Phytochem.* 31: 1826-1828
131. Reznicek, G., Zitterl-Eglseer, K., Franz, C., Jurenitsch, J. (2000) Analytik der Faradiolmonoester in Ringelblumenblüten, Extrakten und Salben. *Z. Phytother.* 21: 152-153
132. Zitterl-Eglseer, K., Novak, J., Franz, C. (1996) Content of triterpendiol esters in *Calendula officinalis* L.. *Beitr. Züchtungsforsch.* 2: 372-373
133. Chen, H.-R., Sheu, S.-J. (1993) Determination of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in traditional Chinese medicinal preparations by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 653: 184-188
134. Raggi, M. A., Maffei, F., Bugamelli, F., Cantelli Forti, G. (1994) Bioavailability of glycyrrhizin and licorice extract in rat and human plasma as detected by a HPLC method. *Pharmazie* 49: 269-272
135. Matissek, R., Spöer, P. (1996) Bestimmung von Glycyrrhizin in Lakritzwaren und Rohlakritz mittels RP-HPLC. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 92: 381-387
136. Marks, A. (1985) Natürliche Wirkstoffe in der Kosmetik. *SÖFW-Journal* 111: 19-22
137. Bauer, R., Khan, I. A., Wagner, H. (1987) Echinacea – Nachweis einer Verfälschung von *Echinacea purpurea* (L.) Moench mit *Parthenium integrifolium* L.. *Dtsch. Apoth. Ztg.* 127: 1325-1330
138. Zitterl-Eglseer, K., Reznicek, G., Novak, J., Franz, C., Jurenitsch, J. (2000) Morphogenetische Variabilität und Stabilität von Faradiolmonoestern in Ringelblumen. *Z. Phytother.* 21: 154-156

-
139. Bruchhausen, E. von, Ebel, S., Frahm, A. W., Hackenthal, E. (Hrsg.) (1993) Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis – Stoffe A-D. Springer-Verlag, Berlin, 5. Auflage
140. MacMillian, R. (Hrsg.) (1996) COLIPA Guidelines; Cosmetic Ingredients: Guidelines for percutaneous absorption/penetration. Brüssel
141. Förster, T., Jackwerth, B., Pittermann, W., Rybinski, R. von, Schmitt, M. (1997) Properties of emulsions – Structure and skin penetration. *Cosm. & Toil.* 112: 73-82
142. Landmann, L. (1991) Die Permeabilitätsbarriere der Haut. *Pharmazie in unserer Zeit* 20: 155-163

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Markus Frauen
geboren 14.08.1970 in Heide/Holstein

Schulbildung

Grundschule, Lunden 1977 - 1981
Werner-Heisenberg-Gymnasium, Heide 1981 - 1990
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

1./Nachschubbataillon 610, Seeth 1990 - 1991

Hochschulausbildung

Studium der Lebensmittelchemie 1991 - 1998
an der Universität Hamburg

Diplomarbeit 08.1995 – 05.1996
Untersuchung sekundärer Oxidationsprodukte
in Fleisch mittels GC und HPLC

Praktisches Jahr
Gesellschaft für Bioanalytik, Hamburg 11.1996 – 04.1997
Hygiene Institut, Hamburg 05.1997 – 10.1997

Berufliche Erfahrungen

Wissenschaftlicher Mitarbeiter in einem 03.1998 – 08.1998
Institut zur Lebensmittelüberwachung
CSL Food Science Laboratory, Norwich, England

Promotion

in der Analytischen Forschung der Beiersdorf AG, Hamburg 10.1998 – 02.2001