

**Entwicklung analytischer Methoden zur Identifizierung und  
Quantifizierung der Inhaltsstoffe in *Populus* – Arten sowie  
Entwicklung und Testung von *Populus*-Extrakt haltigen  
halbfesten Formulierungen**

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften

**Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**



von Dipl.Pharm. Rashad Al-Mwalad  
(aus dem Jemen)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. Reinhard Neubert
2. Prof. Dr. Johannes Wohlrab
3. Prof. Dr. Stephan Reichl

Halle (Saale), den 06.12.2021

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungs- und Symbolverzeichnis</b> .....	<b>X</b>
<b>1 Einleitung und Zielstellung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Theoretischer Rahmen</b> .....	<b>3</b>
2.1 Taxonomische Einordnung und Bedeutung der Balsampappel .....	3
2.2 Medizinische Anwendung .....	5
2.2.1 Pappelblätter und -rinde .....	5
2.2.2 Pappelknospen .....	5
2.3 Inhaltsstoffe .....	6
2.3.1 Phenolglycoside .....	6
2.3.2 Flavonoide .....	7
2.3.3 Phenolsäuren .....	8
2.3.4 Ätherisches Öl mit Terpenen .....	8
2.3.5 Andere Substanzen .....	9
2.4 Anbaubedingungen der Balsampappel .....	10
2.5 Bioaktivität des Balsampappel-Extraktes .....	10
2.6 Analytische Methoden .....	10
2.6.1 Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie (HPLC-DAD-MS) .....	10
2.6.1.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	10
2.6.1.2 Massenspektrometrie (MS) .....	11
2.7 Kapillarelektrophorese (Capillary Electrophoresis, CE) .....	12
2.7.1 Aufbau einer CE-Apparatur .....	12
2.8 Material und Methoden .....	13
2.8.1 Materialien .....	13
2.8.1.1 Verwendete Lösungsmittel .....	13
2.8.1.2 Verwendete Referenzsubstanzen .....	14
2.8.1.3 Verwendete Reagenzien .....	15
2.8.1.4 Verwendete Extrakte .....	15
2.8.1.5 Herstellung des Lyophilisates .....	15
2.8.1.6 Probenvorbereitung für die Applikation der HPLC- Methoden .....	15

2.8.1.7	Probenvorbereitung für die CE- Messung .....	16
2.8.2	Geräte und Methode .....	16
2.8.2.1	HPLC-DAD-MS .....	16
2.8.2.2	Gehaltsbestimmung der Markersubstanzen im Extrakt.....	18
2.8.3	Kapillarelektrophorese (CE).....	18
2.8.4	Stabilitätsuntersuchungen .....	19
2.8.4.1	Stabilität des Extraktes in Abhängigkeit von der relativen Feuchte.....	19
2.8.4.2	Stabilität des Extraktes in topischen Formulierungen .....	19
2.8.5	Liberationsuntersuchungen am Mehrschichtmembranmodell (MSMM).....	19
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>21</b>
3.1	Messungen zur Bioaktivität des Balsampappel-Extraktes .....	21
3.1.1	Probennahme und Extraktion .....	21
3.1.2	Testung auf antimikrobielle Wirkung.....	21
3.1.3	Testung auf anti-inflammatorische Wirkung.....	24
3.1.4	Testung auf antioxidative Wirkung .....	26
3.1.5	Testung auf cytotoxische Wirkung.....	27
3.1.6	Testung auf antirheumatische Wirkung.....	28
3.2	Applikation der HPLC-Methoden auf verschiedene Pappelsorten und Pflanzenteile ....	28
3.2.1	Knospen der Pappeln <i>Muhle-Larsen</i> und <i>Androscoggin</i> .....	28
3.2.2	Die Knospen und die Rinde der Pappel <i>Max 5</i> .....	35
3.3	Analytische Ergebnisse .....	37
3.3.1	Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie (HPLC-DAD-MS) .....	37
3.3.1.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	37
3.3.2	Kapillarelektrophorese (CE).....	43
3.3.2.1	Identifizierung der Inhaltsstoffe im unhydrolysierten Extrakt mittels CE/UV ...	43
3.3.2.2	Identifizierung der Inhaltsstoffe im hydrolysierten Extrakt mittels CE/UV .....	44
<b>4</b>	<b>Galenik.....</b>	<b>46</b>
4.1	Hygroskopizität.....	46
4.2	Löslichkeitsuntersuchungen.....	46
4.3	Stabilität des Extraktes in Abhängigkeit von der relativen Feuchte .....	46
4.4	Auswahl der Extrakte.....	47
4.5	Einarbeitung des Extraktes in halbfeste Formulierungen .....	48
4.5.1	Gelsysteme.....	48
4.5.2	Mikroemulsionssysteme .....	49

4.5.3	Salbengrundlagen .....	50
4.6	Stabilität des Extraktes in Standardvehikeln.....	50
4.6.1	Gehaltbestimmung der Markersubstanzen aus dem Extrakt und den gewählten Formulierungen .....	51
4.6.1.1	Gehaltbestimmung der Markersubstanzen aus dem Extrakt .....	51
4.6.1.2	Gehaltbestimmung der Markersubstanzen aus den Formulierungen .....	51
4.7	Biopharmazeutische Charakterisierung .....	51
4.8	Ergebnisse und Diskussion der Freisetzungsuntersuchungen.....	53
4.8.1	Berechnung der benötigten Membranzahl.....	53
4.8.2	Freisetzung der Markersubstanzen aus dem 1-%-igen Gel .....	54
4.8.3	Freisetzung der Markersubstanzen aus der 1-%-igen Basiscreme .....	57
4.8.4	Freisetzung der Markersubstanzen aus der 1-%-igen Mikroemulsion .....	59
4.9	Bestimmung der Area Under the Curve (AUC).....	62
4.10	HET-CAM-Modell.....	65
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>70</b>
6.1	Bezugsgerade zur quantitativen Bestimmung der Markersubstanzen .....	70
6.2	Chromatogramme der drei Standardsubstanzen Isomere (2-, 3- und 4- Hydroxyacetophenon) mit den dazugehörigen UV-Spektren .....	70
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>72</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung einer Taxonomie der Salicaceae .....	3
Abb. 2:	Chemische Strukturen der Substanzen Salicin, Salicortin und Tremulacin .....	7
Abb. 3:	Chemische Grundstruktur der Dihydrochalkonen und deren Ableitungen .....	8
Abb. 4:	Chemische Strukturen der Trans-Zimtsäure, Trans-4-Cumarsäure und Benzyl- trans-4-coumarat .....	8
Abb. 5:	Chemische Struktur der Bisabolol .....	9
Abb. 6:	Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage (57) .....	11
Abb. 7:	Schematischer Aufbau einer CE-Apparatur (60) .....	13
Abb. 8:	Schematische Darstellung des Mehrschichtmembranmodells (MSMM) .....	20
Abb. 9:	Beispiel eines Hemmhofes auf Agarplatte QUELLE .....	22
Abb. 10:	Grafische Darstellung der antimikrobiellen Knospenwirkung der Lösungsmittel mit 30- und 70-%-igem EtOH. QUELLE .....	22
Abb. 11:	Grafische Darstellung des Vergleichs der Extraktionsmethoden mit Schüttler und Ultraschall QUELLE .....	23
Abb. 12:	Grafische Darstellung des Vergleichs der einzelnen Erntezeitpunkte der Sorte <i>Max 5</i> QUELLE .....	24
Abb. 13:	Reaktionsschema für die photometrische Messung der anti-inflammatorischen Wirkung .....	25
Abb. 14:	Testplatte bei NO-Assay .....	25
Abb. 15:	Reaktionsschema für die photometrische Messung der antioxidativen Wirkung .....	26
Abb. 16:	Darstellung der Testung von Pappelproben auf antioxidative Wirkung .....	26
Abb. 17:	Grafische Darstellung des DPPH-Assays mit Referenz Vitamin C und Mischextrakten von den Balsampappeln ( <i>Androskoggin</i> , <i>Muhle-Larsen</i> und <i>Max 5</i> ), n = 3 .....	27
Abb. 18:	Darstellung der Inhaltsstoffe in den Knospen der Pappeln <i>Muhle-Larsen</i> (links) und <i>Androskoggin</i> (rechts) im März .....	29
Abb. 19:	Darstellung der Inhaltsstoffe in den Knospen der Pappel <i>Muhle-Larsen</i> (links) und den Blättern der Pappel <i>Androskoggin</i> (rechts) im April .....	30
Abb. 20:	Darstellung der Inhaltsstoffe der Knospen der Pappel <i>Muhle-Larsen</i> im März und April .....	31
Abb. 21:	Darstellung der Inhaltsstoffe in den Knospen im März und in den Blättern im April der Pappel <i>Androskoggin</i> .....	31

Abb. 22: Darstellung der Inhaltsstoffe in der Rinde der Pappeln <i>Muhle-Larsen</i> (links) und <i>Androscoggin</i> (rechts) im März .....	32
Abb. 23: Darstellung der Inhaltsstoffe in der Rinde der Pappeln <i>Muhle-Larsen</i> (links) und <i>Androscoggin</i> (rechts) im April .....	33
Abb. 24: Darstellung der Rinde der Pappel <i>Muhle-Larsen</i> im März und April .....	34
Abb. 25: Darstellung der Inhaltsstoffe in der Rinde der Pappel <i>Androscoggin</i> im März und April .....	35
Abb. 26: Darstellung der Inhaltsstoffe (Knospe (links), Rinde (rechts)) von <i>Max 5</i> im März und April .....	36
Abb. 27: Chromatogramm der hydrolysierten Extrakte, $\lambda = 267$ nm .....	37
Abb. 28: Chromatogramm der hydrolysierten Extrakte, $\lambda = 310$ nm .....	38
Abb. 29: Chemischen Strukturen des ortho-, meta- und para-Hydroxyacetophenons .....	39
Abb. 30: Chromatogramm der Referenzsubstanz 4-Hydroxyacetophenon in Kombination mit dem Knospenextrakt .....	40
Abb. 31: Vergleich der positiven (Tandem-)MS von der Standardsubstanz (1A) und Salicin aus dem Pappel-Extrakt (2A) .....	41
Abb. 32: Vergleich der negativen (Tandem-)MS von der Standardsubstanz (1B) und der Cumarsäure aus dem Pappel-Extrakt (2B) .....	42
Abb. 33: CE-Elektropherogramm, P.-Extrakt ( <i>Androscoggin</i> ) 5 mg/ml, 20 kV, Puffer: pH-Wert: 9, 151 mM Borat, 25 mM SDS .....	43
Abb. 34: CE- Elektropherogramm, $\lambda = 200$ nm, 171 mM Boratpuffer mit 25 mM SDS, Puffer: pH-Wert 9, N = 3, 1: Salicin, 2: Ferulasäure, 3: Cumarsäure, 4: Kaffeesäure .....	44
Abb. 35: CE-Elektropherogramm, $\lambda = 200$ nm, 171 mM Boratpuffer mit 25 mM SDS, Puffer: pH-Wert 9,5, N=3 .....	45
Abb. 36: Stabilität des Extraktes in Abhängigkeit von verschiedenen Luftfeuchten .....	47
Abb. 37: Salicinfreisetzung aus dem 1%-igen Gel in den Membranen, n = 6 .....	54
Abb. 38: Gesamte Salicinfreisetzung aus dem 1%-igen Gel in den Membranen, n = 6 .....	55
Abb. 39: Cumarsäureverteilung aus dem 1%-igen Gel in den Membranen, n = 6 .....	56
Abb. 40: Gesamtfreisetzung Cumarsäure aus dem 1%-igen Gel in den Membranen, n = 6 .....	56
Abb. 41: Salicinverteilung aus der 1%-igen Basiscreme in den Membranen, n = 6 .....	57
Abb. 42: Gesamtfreisetzung Salicin aus der 1%-igen Basiscreme, n = 6 .....	57
Abb. 43: Cumarsäureverteilung aus der 1%-igen Basiscreme in den Membranen, n = 6 .....	58
Abb. 44: Gesamtfreisetzung der Cumarsäure aus der 1%-igen Basiscreme, n = 6 .....	59

Abb. 45: Salicinfreisetzung aus der 1-%-igen Mikroemulsion in den Membranen, n = 6.....	60
Abb. 46: Gesamtverteilung Salicin aus 1-%-iger Mikroemulsion in den Membranen, n = 6.....	60
Abb. 47: Cumarsäurefreisetzung aus der 1-%-igen Mikroemulsion in den Membranen, n = 6..	61
Abb. 48: Gesamtfreisetzung der Cumarsäure aus der 1-%-igen Mikroemulsion in den Membranen, n = 6.....	61
Abb. 49: AUC-Kurve für Salicin im 1-%-igen Gel.....	63
Abb. 50: AUC-Kurve für p-Cumarsäure im 1-%-igen Gel.....	63
Abb. 51: AUC-Kurve für Salicin in 1-%-iger Basiscreme.....	64
Abb. 52: AUC-Kurve für p-Cumarsäure in 1-%-iger Basiscreme.....	64
Abb. 53: AUC-Kurve für Salicin in 1-%-iger Mikroemulsion.....	64
Abb. 54: AUC-Kurve für p-Cumarsäure in 1-%-iger Mikroemulsion.....	64
Abb. 55: Salicin in 70 % EtOH + NaOH, N = 4.....	70
Abb. 56: p-Cumarsäure in 70 % EtOH + NaOH, N = 4.....	70
Abb. 57: Chromatogramm von 2- Hydroxyacetophenon bei 251 nm.....	70
Abb. 58: Chromatogramm von 3-Hydroxyacetophenon bei 250 nm.....	70
Abb. 59: Chromatogramm von 4-Hydroxyacetophenon bei 275 nm.....	71

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Darstellung der Gehaltsbestimmung der Markersubstanzen aus den Extrakten .....	18
Tab. 2:	Testorganismen für die Analyse antimikrobieller Wirkungen des Balsampappel- Extraktes .....	21
Tab. 3:	Darstellung der prozentualen Gehalte in den Knospen der Pappeln <i>Muhle-Larsen</i> (links) und <i>Androskoggin</i> (rechts) im März.....	29
Tab. 4:	Darstellung der prozentualen Gehalte in den Knospen der Pappel <i>Muhle-Larsen</i> (links) und den Blättern der Pappel <i>Androskoggin</i> (rechts) im April.....	30
Tab. 5:	Darstellung der prozentualen Gehalte in den Knospen der Pappel <i>Muhle-Larsen</i> im März und April .....	31
Tab. 6:	Darstellung der prozentualen Gehalte in den Knospen und Blättern der Pappel <i>Androskoggin</i> im März und April.....	32
Tab. 7:	Darstellung der prozentualen Gehalte in der Rinde der Pappeln <i>Muhle-Larsen</i> (links) und <i>Androskoggin</i> (rechts) im März.....	33
Tab. 8:	Darstellung der prozentualen Gehalte in der Rinde der Pappeln <i>Muhle-Larsen</i> (links) und <i>Androskoggin</i> (rechts) im April.....	33
Tab. 9:	Darstellung der prozentualen Gehalte in der Rinde der Pappel <i>Muhle-Larsen</i> im März und April .....	34
Tab. 10:	Darstellung der prozentualen Gehalte in der Rinde von Pappel- <i>Androskoggin</i> im März und April .....	35
Tab. 11:	Darstellung der prozentualen Gehalte der <i>Max 5</i> , (Knospe (links), Rinde (rechts)) ....	36
Tab. 12:	Darstellung der Bestandteile der Rezeptur .....	48
Tab. 13:	Emulgatorsystem: Tween 80/Span 20 (2:3) .....	49
Tab. 14:	Emulgatorsystem: Tagat O2/Synperonic PE/L 101 (2:3).....	49
Tab. 15:	Darstellung der Gehalte der Markersubstanzen, Salicin und Cumarsäure aus dem Extrakt, n = 3 .....	51
Tab. 16:	Darstellung der Gehalte der Markersubstanzen, Salicin und Cumarsäure in % aus den Formulierungen, n = 3 .....	51
Tab. 17:	Anzahl an Blind-, Wiederfindungs- und Probenmodellen für die einzelnen Formulierungen.....	52
Tab. 18:	Darstellung der verwendeten Membranen pro Zelle .....	53
Tab. 19:	Auflistung der zu Abb. 37 korrespondierenden Werte (mw = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = 6) .....	55

Tab. 20: Auflistung der zu Abb. 39 korrespondierenden Werte (mw = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = 6).....	56
Tab. 21: Auflistung der zu Abb. 41 korrespondierenden Werte, mw = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = 6 .....	58
Tab. 22: Auflistung der zu Abb. 43 korrespondierenden Werte (mw = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = 6 .....	59
Tab. 23: Auflistung der zu Abb. 45 korrespondierenden Werte, mw = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = 6 .....	60
Tab. 24: Auflistung der zu Abb. 47 korrespondierenden Werte, mw = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = 6 .....	62
Tab. 25: AUC-, ABC- und MDT-Werte der untersuchten Formulierungen, n = 3 .....	63
Tab. 26: Untersuchte Proben mittels HET-CAM-Test .....	65

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

AUC	Fläche unter der Kurve, „Area Under the Curve“
BGA	Bundesgesundheitsamtes
Bioassay	kurz für englisch biological assay, „biologische Untersuchung“
BP	Balsampappel
BPH	Prostatahyperplasie
BSG	Bestimmungsgrenze
BTM	Biologische Trockenmasse
CE	Capillary Electrophoresis
COX	Cyclooxygenase
DAD	Diode Array Detector
DBA-Maus	D für Dilute, B für braun und A für nicht-Agouti
Difco	Trockenkulturmedien: Granuliertes Agar
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EOF	elektroosmotischer Fluss
EtOH	Ethanol
GC	Gaschromatographie
Ger. Wasser	gereinigtes Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IS	Interner Standard
kV	Kilovolt
KT	Kühlschranktemperatur
LPS	Lipopolysaccharide
M	molar
m/m	Masse/Masse
m/V	Masse/Volumen
MEEKC	Mikroemulsions-Elektrokinetische Chromatographie
MEKC	Mizellare elektrokinetische Chromatographie
MeOH	Methanol
Min.	Minuten
MSMM	Mehrschichtmembranmodells
MS	Massenspektrometrie

N	Normal
n. k.	nicht konstant
NaOH	Natronlauge
NRF	Neue Rezeptur-Formularium
NWG	Nachweisgrenze
P.	<i>Populus</i>
PEG	Polyethylenglycol
RSD	Relative Standard Deviation (relative Standardabweichung)
RT	Raumtemperatur
S/N	Signal to Noise (Signal-Rausch-Verhältnis)
SC	Sodiumcholate (Natriumcholat)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
Sec	Sekunden
SGDC	Sodium glycodeoxycholate (Natriumglycodeoxycholat)
THF	Tetrahydrofuran
TIC	Total Ion Current
UV	Ultraviolett
WFR	Wiederfindungsrate
XTT	Na-3,3'-[1-(phenylamino)carbonyl-3,4-tetrazolium]- bis(4-methoxy-6-nitrobenzol)-sulfonsäurehydrat

## 1 Einleitung und Zielstellung

Naturstoffe sind heutzutage von besonderem Interesse. Durch die medizinische Anwendung von Naturstoffen hat sich das menschliche Leben in diversen Bereichen verbessert. Vor allem die Qualität und die Lebenserwartung jedes Einzelnen, aber auch die Möglichkeit, Krankheiten zu therapieren, sind gestiegen. Beispielsweise sind mehr als 75 % aller antibakteriellen Wirkstoffe und etwa 50 % aller Antitumorsubstanzen entweder Naturstoffe oder Naturstoffderivate (1).

Zu den Naturstoffen zählen Stoffe, die beispielsweise aus Pflanzenextrakten stammen. Sie sind in Arzneimitteln, Lebensmitteln und Kosmetikprodukten zu finden. Aus diesem Grund gewinnt die Suche nach neuen Wirkstoffen zur Herstellung von Arzneimitteln mit einer speziellen Wirkung zur Bekämpfung von Krankheiten zusehends an Bedeutung (2). Zur Extraktion werden entweder die Blätter, die Wurzeln, die Blüten oder die gesamte Pflanze verwendet. Die Ausbeute ist abhängig von der Extraktionsmethode und dem Zustand der Pflanzendroge (z. B. fein oder grob gepulvert). Die Anwendung vieler Stoffe, die eine pflanzliche Herkunft haben, ist bereits bekannt oder befindet sich noch in der Forschung (3). Balsampappeln sind besonders schnell wachsende Baumarten und werden daher als Biomasselieferant zur Gewinnung von Energieholz angebaut (4, 5). Darüber hinaus werden Blätter, Rinde und Knospen pharmazeutisch genutzt. Daraus ergibt sich ein weit gefächertes Anwendungsgebiet für pharmazeutische oder kosmetische Produkte, wie z. B. Schmerzmittel, Hautpflegeprodukte, Deodorants, Mittel zur Aknebehandlung, potenzsteigernde und muskelaufbauende Mittel bis hin zu entzündungshemmenden Formulierungen (6). Die Balsampappel weist eine Vielzahl von Inhaltsstoffen mit pharmazeutisch oder kosmetisch relevanten Eigenschaften auf (z. B. antimikrobiell, antiinflammatorisch) (7, 8). Die Untersuchung der ARGE NATURSTOFFE Wien verdeutlicht die antimikrobielle Aktivität und lichtschutzpotenziellen Merkmale der Balsampappelknospen (*Populus (P.) balsamifera*) in den entwickelten kosmetischen Präparationen (9). Balsampappel zeichnet sich gegenüber anderen Vertretern durch einfache Vermehrung über Steckhölzer, Stockausschlag, Dichtstandsverträglichkeit sowie hohe Krankheitsresistenz aus (10).

Für den Anbau in Deutschland eignen sich vor allem die Balsampappel und deren Hybride (*P. trichocarpa*, *P. maximowiczii*). Die Kreuzungen aus Balsampappel und Schwarzpappel (*P. maximowiczii* x *P. nigra*) (*Max Klone*) sind überaus ertragreich (7).

Im Rahmen dieser Arbeit soll eine Möglichkeit zur Nutzung der Balsampappel sowohl als nachwachsender Rohstoff als auch als potenzielles Pharmakon bzw. Kosmetikum gefunden werden.

In diesem Rahmen werden folgende Pappelklone untersucht:

- Hybride europ. Schwarzpappel x asiat. Balsampappel (Sorte *Max 5*)
- Balsam-Hybride *P. maximowiczii* x *P. trichocarpa* (Sorte *Androscoggin*)
- Balsam-Hybride *P. trichocarpa* x *P. trichocarpa* (Sorte *Muhle-Larsen*)

Um eine möglichst ökonomische Verwertung der Pflanze zu gewährleisten, müssen die Parameter beginnend bei der Pflanzenspezies, den Anbaubedingungen, den Erntezeitpunkten bis hin zur Festlegung einer Grundlage zur Einarbeitung des Extraktes optimiert werden. Hierfür muss eine geeignete Routineanalytik zur Quantifizierung ausgewählter Markersubstanzen ermittelt werden, die im Rahmen dieser Arbeit etabliert werden soll. Weiterhin sind relevante Inhaltsstoffe mittels HPLC- bzw. CE-Ultraviolett(-UV) und Gaschromatographie (GC) zu identifizieren bzw. zu quantifizieren. Daraufhin wird der Balsampappel-Extrakt auf die bioaktiven Eigenschaften getestet. Das standardisierte Extrakt soll in eine halbfeste Formulierung eingearbeitet und diese biopharmazeutisch charakterisiert werden. Dabei wird angestrebt, eine möglichst schnelle Trennmethode für die Markersubstanzen zu entwickeln, um mit dieser Methode die im weiteren Verlauf des Projektes herzustellenden Formulierungen zu standardisieren und die Stabilität sowie die Toxizität zu testen.

## 2 Theoretischer Rahmen

### 2.1 Taxonomische Einordnung und Bedeutung der Balsampappel

Die Pappel, neben der Gattung *Salix* zu den Salicaceae gehörend, umfasst etwa 160 Arten, die in verschiedene Sektionen eingeteilt werden (siehe Abb. 1) (11). Da viele Arten bastardisieren und Hybridenschwärme bilden, ist die systematische Einteilung äußerst schwierig (12).

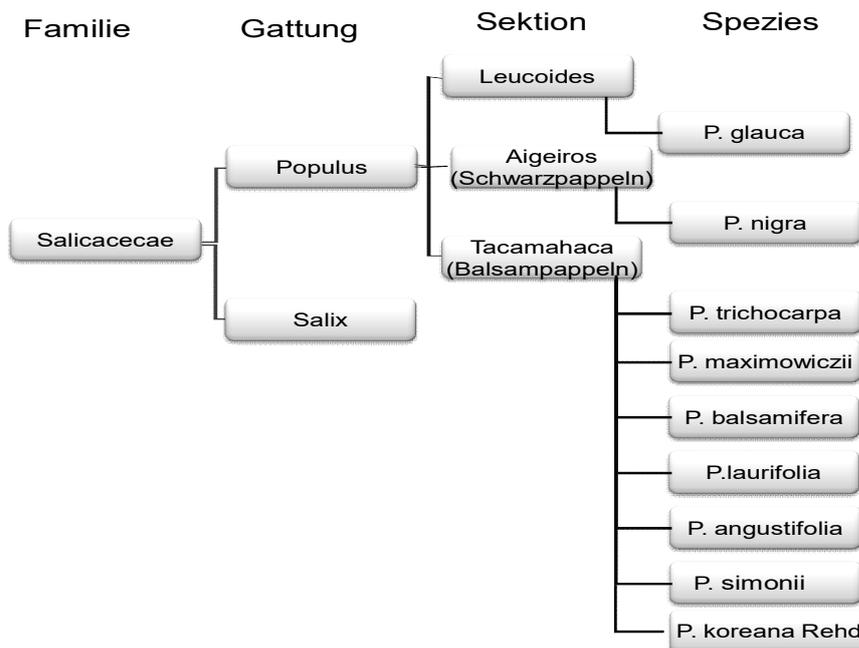


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Taxonomie der Salicaceae

Zu den Balsampappeln (*P. sect. Tacamahaca*) gehören zehn Spezies, vorkommend in Nordamerika und Ostasien. Es handelt sich dabei um 30 bis 60 m hohe Bäume, die auf der Unterseite ihrer Blätter Harz absondern, wodurch sie sich von den meisten anderen Pappeln unterscheiden (13).

Die Kenntnis der Pappelspezies ist bei den Untersuchungen von hoher Relevanz, da sich die verschiedenen Spezies in ihren Inhaltsstoffgruppen stark voneinander unterscheiden. *P. trichocarpa* ist der erste Baum, bei dem das Genom entschlüsselt wurde. Dies könnte zur Erleichterung bei der Suche nach Peptiden im Extrakt führen (14). Loeschke beschrieb Trichocarpin als fungistatisch wirksam (15).

Als uralte Heilmittel gelten die Knospen von Pappel und Weide, die als Tonikum, Adstringens, Antipyretikum, Antirheumatikum und Expectorans eingesetzt werden (16). Als Mittel gegen BPH

(Prostatahyperplasie) werden häufig die Blätter verwendet. Pharmakologische Untersuchungen zu dem auf dem Markt befindlichen Kombinationspräparat *Phytodolor N* aus einem wässrig alkoholischen Frischpflanzenauszug von 60 % *P. tremula* (Zitterpappel) sowie *Solidago virgaurea* und *Fraxinus excelsior* liegen sowohl zu den Einzelbestandteilen als auch zur Kombination vor (17).

Im Phenylchinon-Writhing-Test zeigte *P. Tremula* als Einzelbestandteil eine mit Salicylalkohol vergleichbare analgetische Wirkung. Diese wurde auch im Bierhefe-Entzündungsschmerz-Test nachgewiesen. Die antipyretische Wirkung konnte im Bierhefe-Fieber-Test belegt werden. Relativ schwache Wirkung zeigt der *P.*-Extrakt im Vergleich zu Diclofenac im Carrageenan-Ödem-Test sowie im Adjuvans-Arthritis-Test (18, 19).

Eine Hemmung der Lipoxygenase konnte für Phenolsäuren, Salicylsäurederivate und Flavonoide sowie für den Extrakt nachgewiesen werden (20). Für die Flavonoide sowie für die Phenolsäuren und den Gesamtextrakt wurde ebenfalls eine Hemmung der Synthese von freien Sauerstoffradikalen identifiziert (21). Die klinische Wirksamkeit des Kombinationspräparates konnte bei degenerativen Gelenkerkrankungen bestätigt werden (22, 23).

Hinweise auf mögliche weitere Indikationen gibt das den Knospen in der chemischen Zusammensetzung nahe verwandte Propolis, dessen Hauptbestandteil das Knospenexsudat der Pappeln ist. Dieses wird volksmedizinisch zur Wundheilung, Behandlung von Verbrennungen, bei Neurodermitis, Psoriasis, Herpes, Pruritus ani, Ekzemen und Ulcus cruris angewendet (24). Für Propolis wurden antibakterielle und antiinflammatorische (Flavanone, Flavone, Phenolsäuren und ihre Ester) sowie neben der Antitumoraktivität (Kaffeensäurephenylethylester) auch heptoprotektive (Kaffeensäure, Ferulasäure, Phenylethylester) und antioxidative Eigenschaften (Flavonoide, Phenolsäure, und ihre Ester) nachgewiesen (25). Zu beachten ist, dass sowohl für Propolis als auch bei Anwendung von Pappelknospenöl bei dermalen Applikation Kontaktdermatitiden zu beobachten waren (24, 26-28).

Auf dem Markt befindet sich darüber hinaus eine Pappelsalbe der Firma Tamany<sup>®</sup> Cosmetic. Dem Produkt, das nicht der Apothekenpflicht unterliegt, liegt kein Beipackzettel bei. Der Verpackung können jedoch Indikationsgebiete und die Zusammensetzung entnommen werden. Die Pappelsalbe soll „zur Pflege bei rissiger Haut im Afterbereich und bei Juckreiz wie z. B. bei Insektenstichen und Sonnenbrand“ verwendet werden. Laut der Auflistung der Inhaltsstoffe ist in der Zubereitung der Extrakt von *P. nigra* enthalten, die eine Spezies der Schwarzpappeln ist. Außerdem wurde Bisabolol aus der Kamille, ein Blattextrakt von *Rosmarinus officinalis* und

Kernöl von *Helianthus annuus* zugesetzt. Über die Gewinnung der Extrakte werden keine Aussagen getroffen.

## 2.2 Medizinische Anwendung

### 2.2.1 Pappelblätter und -rinde

Eine Erwähnung der Schwarz- und Weißpappelrinde bzw. deren Blätter findet sich bereits in der *Materia medica* zur Linderung von Ohren-, Gicht- und Magenschmerzen sowie bei übermäßigem Harndrang und Epilepsie. Loeschke beschreibt Trichocarpin als fungistatisch wirksam (15). Die Wirkung der Tinkturen, auf dem Markt befindlichen wässrig alkoholischen Auszüge, liegt sowohl zu den Einzelbestandteilen als auch zur Kombination vor (29).

Als Wirkmechanismus wird analog zu den nichtsteroidalen Antiphlogistika ein Einfluss der Pflanzeninhaltsstoffe auf die Arachidonsäurekaskade diskutiert. Eine Hemmung der Lipoxygenase konnte für Phenolsäuren, Salicylsäurederivate und Flavonoide sowie für den Extrakt nachgewiesen werden (20), für die zwei letzteren zusätzlich eine Hemmung der Cyclooxygenase (COX). Durch die Hemmung proteolytischer Enzyme kann den Flavonoiden eine antiexsudative Wirkung zugesprochen werden. Eine Hemmung der Synthese von freien Sauerstoffradikalen wurde ebenfalls für die Flavonoide sowie für die Phenolsäuren und den Gesamtextrakt identifiziert (21). Die klinische Wirksamkeit des Kombinationspräparates konnte bei degenerativen Gelenkerkrankungen nachgewiesen werden (22, 23). Nach oraler Applikation von Salicin tritt im Vergleich zur Applikation von Na-salicylat ein prolongierter Serumspiegel des antiphlogistisch wirksamen Prinzips Salicylsäure auf (30). Vor Oxidation zu Salicylsäure muss Salicin zuerst hydrolytisch im Dickdarm gespalten werden. Ein Teil wird zudem unverändert aufgenommen (30).

### 2.2.2 Pappelknospen

Pappelknospen waren schon im 17. Jahrhundert in Kombination mit Solanaceae in Form der *Unguentum populeum* bei akutem Fieber und als Schlafmittel in Gebrauch (31). Von der *Kommission E* des ehemaligen Bundesgesundheitsamtes (BGA) 1990 wurden die Knospen für die Anwendung bei oberflächlichen Hautverletzungen, Hämorrhoiden, Frostbeulen und Sonnenbrand positiv monografiert. Daneben sind sie volksmedizinisch intern als Diuretikum, Prostatamittel, Expektorans und als Rheumamittel in Gebrauch (32, 33). In der Volksmedizin wurde das den Knospen in der chemischen Zusammensetzung nahe verwandte Propolis, dessen Hauptbestandteil das Knospenexudat der Pappeln ist, zur Wundheilung, Ulcus cruris, Herpes und Behandlung von

Verbrennungen verwendet (26). Für Propolis wurden die Wirkung gegen Bakterien (antibakteriell), gegen Viren (antiviral) und gegen Pilze (antimykotisch) nachgewiesen (25). Zu beachten ist, dass sowohl für Propolis als auch bei Anwendung von Pappelknospenöl bei dermalen Applikation Kontaktdermatitiden zu beobachten waren (24, 26-28). Als allergene Substanzen wurden im Tierversuch Ester von Phenolsäuren, insbesondere mit ortho-ständigen Hydroxygruppen (1,1-dimethylallylkaffeat, Phenylethylkaffeat) sowie Benzylsalicylat, Tectochrysin usw. identifiziert (24, 27). Im *DAB 6* ist ein alkoholischer Extrakt der frischen Pappelknospen aufgeführt. Salben mit Pappelknospen sind auf dem Markt verfügbar, beispielsweise in Form der *Pappelknospen Salbe* der Hofapotheke St. Afra Apotheke und der *Pappelsalbe mit Bisabolol BD* der Firma Herbaria Kräuterparadies GmbH.

### 2.3 Inhaltsstoffe

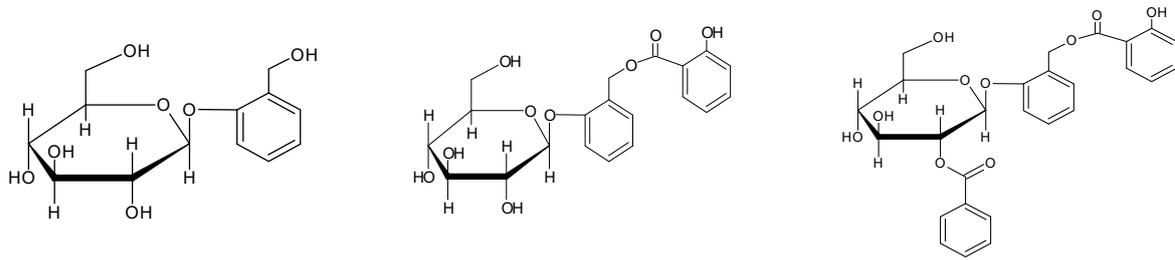
Die Balsampappel hat ein überaus breites Inhaltsstoffspektrum. Die bedeutendsten werden in diesem Kapitel vorgestellt.

#### 2.3.1 Phenolglycoside

Phenolglycoside kommen vor allem in den Blättern und Rinden vor, wobei der höchste Gehalt für *P. trichocarpa* und *P. candicans* identifiziert wurde (34). Sie weisen neben den einfachen Phenolglycosiden mit dem bedeutendsten Vertreter Salicin auch mono- und bisacylierte Derivate auf. Das lange Zeit für das Hauptglycosid gehaltene Salicin entsteht bei der Aufarbeitung mit basischen Fällungsmitteln aus den zwei Hauptglycosiden Salicortin (2, Rinde *P. trichocarpa*, *P. candicans*) und Tremulacin (3, Blatt *P. trichocarpa*). Während Salicin in relativ großer Menge auch genuin vorkommt, handelt es sich bei den von Pearl et al. isolierten Glycosiden Populin, Salicylpopulin und Salicyltremuloidin um Isolierungsartefakte. Genuin kommen in geringer Menge auch das für die Sektion Tacamahaca spezifische Trichocarpin vor (35).

Die altersabhängige Untersuchung an *P. candicans* ergab eine Abnahme des gesamten Phenolglycosidgehaltes zumindest für ein- bis fünfjährige Zweige mit zunehmendem Alter (36).

Zu beachten ist, dass die Unterschiede in den Phenolglycosidgehalten auch qualitativ abhängig von der Spezies waren.



1: Salicin

2: Salicortin

3: Tremulacin

Abb. 2: Chemische Strukturen der Substanzen Salicin, Salicortin und Tremulacin

### 2.3.2 Flavonoide

Die salicinarmen Knospen der Pappeln gelten als Flavonoiddroge. Das Knospenexsudat wurde von der Gruppe um Greenaway intensiv untersucht (37-43). Während Pappeln der Sektion *Leuce* das einfachste Exsudat produzieren (z. B. *P. alba* – nur Kohlenwasserstoffe) und *P. tremula* nur Flavonoide auf der frühesten Biosynthesestufe enthält, konnte in Pappeln der Sektion *Tacamahaca* und *Ageiros* ein komplexes Flavonoidgemisch identifiziert werden (37).

Das Knospenexsudat von *P. candicans* und *P. balsamifera* zeichnet sich im Gegensatz zu anderen Pappelspezies durch einen hohen Anteil an Dihydrochalkonen aus, deren Hauptkomponenten 4 bis 7 untenstehend (siehe Abb. 3) aufgelistet sind. Chalkone und Flavanone machen einen geringeren Anteil aus. Das Flavanon Pinocembrin und deren Derivate konnten im Knospenexsudat nicht nachgewiesen werden, während Kurkin das in ganzen Knospen festgestellte methylierte Derivat Pinostrobin zur Standardisierung von *P. balsamifera* und Propolis nutzte (44). *P. candicans* und *P. balsamifera* unterscheiden sich nur im Flavon-Anteil, der bei ersterem etwas geringer ist (z. B. Galangin 6 % des Total Ion Current (TIC) im Knospenexsudat von *P. candicans*, daneben Kämpferol, Chrysin, Tectochrysin, Apigenin in Knospen (45). Im Knospenexsudat von *P. maximowiczii* wurden insbesondere Chalkone (vor allem 2',4',6'-Trihydroxychalkon), Flavone (vor allem Galangin und Chrysin) und Flavanone identifiziert, darunter an Position 3 veresterte Pinobanksin-Derivate. Pinocembrin (ein Flavanon) und deren Derivate kommen in *P. balsamifera* nicht vor (46).

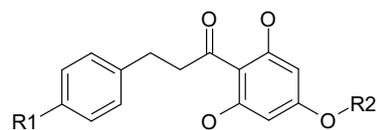
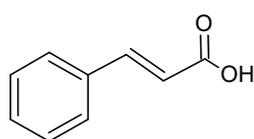


Abb. 3: Chemische Grundstruktur der Dihydrochalkonen und deren Ableitungen

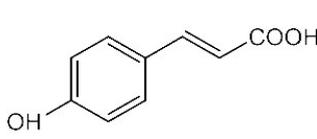
- R1= R2= H; 2',4',6'-trihydroxy-dihydrochalkon (4); in *P. candicans/balsamifera*  
 R1= OCH<sub>3</sub>, R2=H; 2',4',6'-trihydroxy-4'-methoxy-dihydrochalkon (5); *P. candicans/balsamifera/trichocarpa*  
 R1= H, R2 = OCH<sub>3</sub>; 2',4',6'-trihydroxy-4'-methoxy-dihydrochalkon (6); *P. trichocarpa*  
 R1=R2= OCH<sub>3</sub>; 2',6'-dihydroxy-4',4'-dimethoxydihydrochalkone (7); *P. trichocarpa*

### 2.3.3 Phenolsäuren

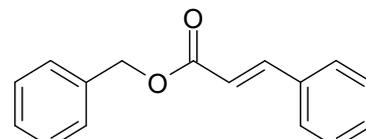
Das Knospenexsudat bzw. ihre Estern weisen einen hohen Anteil an substituierten und freien Benzoe- und Phenolsäuren auf, wobei Zimtsäure- und Cumarsäureester (8–10) den Hauptteil ausmachen (37). Während andere Phenolsäuren, z. B. Kaffeesäure und Benzoessäure, im Exsudat weitestgehend abwesend sind bzw. Ferulasäure in *P. trichocarpa* vollkommen fehlt (42, 43), wurden in den ganzen Knospen auch Kaffeesäure und deren Ester sowie Ferulasäure, Isoferulasäure und 3,4-Dimethoxysäuren identifiziert (44). In *P. trichocarpa* wird neben 4-Hydroxyacetophenon als Hauptkomponente Benzylsalicylat gebildet (43).



8 Trans-Zimtsäure



9 Trans-4-Cumarsäure



10 Benzyl-trans-4-coumarat

Abb. 4: Chemische Strukturen der Trans-Zimtsäure, Trans-4-Cumarsäure und Benzyl-trans-4-coumarat

### 2.3.4 Ätherisches Öl mit Terpenen

Die in den Knospen vorkommenden flüchtigen Terpene bedingen den balsamartigen Geruch der Sektion Tacamahaca. Im Gegensatz zur Weiß-, Schwarz- oder Zitterpappel wurde in *P. balsamifera* Bisabolol (11) sowohl in den Knospen- als auch in den Blattexsudaten (6 bzw. 2 % des TIC, Angaben schwankend) ausgemacht. Daneben kommen langkettige Kohlenwasserstoffe vor. Isidorov konnte neben Monoterpen-Kohlenwasserstoffen ( $\alpha$ -Pinen, Camphen,  $\beta$ -Pinen,  $\delta$ -Caren, Kampfer, Borneol, Limonen) vor allem Sesquiterpene (Longifolen,  $\gamma$ -Elemen,  $\alpha$ -Murolen,  $\gamma$ -Murolen, Caryophyllen und Humulen) in *P. balsamifera* identifizieren (37, 47).

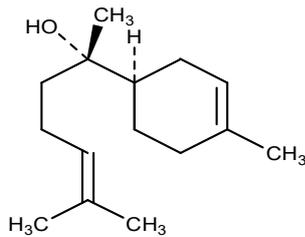


Abb. 5: Chemische Struktur der Bisabolol

### 2.3.5 Andere Substanzen

Neben den obenstehenden Inhaltsstoffgruppen sind zudem Lignane, Benzochinone, Gerbstoffe, Triterpene, Sterine, Wachse, Zucker und nicht proteinogene Aminosäuren enthalten. Das Vorkommen von Alkaloiden konnte bisher nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden (16).

#### Hydrolyse

Bei saurer Hydrolyse mit einer molaren Salzsäure konnte keine wesentliche Veränderung im Inhaltsstoffspektrum beobachtet werden. Dies ist nicht überraschend, da unter sauren Bedingungen eher die glycosidischen Bindungen der Flavonoide gespalten werden, deren Gehalt im Extrakt jedoch äußerst gering ist, da kaum spät eluierende lipophile Substanzen detektierbar waren. Der Nachteil einer sauren Hydrolyse ist überdies die schlechtere Löslichkeit der phenolischen Substanzen, die im wässrigen Zustand ausfallen würden. Zudem werden die bisacylierten Phenolglycoside zwar gespalten, es kommt allerdings simultan zur Kondensation der dabei entstehenden Aldehyde (48).

Pearl et al. belegten bei basischer Hydrolyse der Rinden von *P. trichocarpa* und *P. balsamifera* als Hauptabbauprodukte Phenolsäuren, darunter neben Ferulasäure, Vanillinsäure, p-Hydroxybenzoesäure und Syringasäure, vor allem p-Cumarsäure (49). Damit wurden die Ergebnisse von Abramovitch bestätigt, der außerdem langkettige Fettsäuren identifizieren konnte (50).

Von den Phenolglycosiden sind nur die mono- und bisacylierten Phenolglycoside überaus alkaliempfindlich. Es entstehen die entacylierten Glycoside und die Säure (48), während Salicortin im schwach Basischen sofort zu Salicin abgebaut wird (51). Tremulacin liefert abhängig von den Hydrolysebedingungen Populin, Tremuloidin oder Salicin. In Gegenwart von 1-molarer Natronlauge (NaOH) entsteht ausschließlich Salicin (36). Aus den Isomeren Populin und Tremuloidin entstehen Salicin und Benzoesäure (48). Die basische Hydrolyse wurde analog zu den Bedingungen von Nardini et al. allerdings mit 1-molarer NaOH durchgeführt (52).

## **2.4 Anbaubedingungen der Balsampappel**

Die Voruntersuchungen der Universität für Bodenkultur Wien (BOKU) zeigten, dass die für das Forschungsprojekt vorgesehenen Balsampappeln in den Knospen, den Blättern und der Rinde wertvolle Biowirkstoffe bilden. Der Stand der Technik belegt bisher das Vorkommen organischer Stoffe im Harz der frischen Pappelrinde und in den Knospen mit antimikrobiellen Potenzial und einer hohen Lichtschutzwirkung (9).

Ziel der Untersuchung war es, den Einfluss verschiedener Faktoren (Zeit, Standweiten, Dünger) auf den Gehalt aller Markersubstanzen zu quantifizieren und somit die optimalen Bedingungen für die Pflanzung beider Sorten zu bestimmen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Knospen, die Blätter (nur von *Androscoffin* im April) und die Rinden untersucht. Die Pappelsorten wurden im März und im April geerntet. Die Markersubstanzen p-Cumarsäure und Salicin wurden mittels HPLC analysiert und quantifiziert.

Bei der Auswertung wurden zunächst beide Pappelsorten innerhalb einer Erntezeit in Hinblick auf ihren Substanzgehalt miteinander verglichen. Anschließend wurde der Substanzgehalt einer Pappelsorte bei unterschiedlichen Erntezeiten untersucht.

## **2.5 Bioaktivität des Balsampappel-Extraktes**

Die Balsampappel weist eine Vielzahl von Inhaltsstoffen mit pharmazeutisch oder kosmetisch relevanten Eigenschaften auf (z. B. antimikrobiell, antiinflammatorisch) (8). Hierbei lagen die Schwerpunkte dieser Arbeit auf der Bestimmung antimikrobieller, antiinflammatorischer und antioxidativer Eigenschaften (53). Zur Ermittlung der biologischen Wirksamkeit der Rohextrakte aus der Balsampappel wurden diese, von der Hochschule Anhalt Köthen, aus verschiedenen Pflanzenteilen gewonnen und anschließend getestet (54).

## **2.6 Analytische Methoden**

### **2.6.1 Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie (HPLC-DAD-MS)**

#### **2.6.1.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) wurde entwickelt, um nichtflüchtige Mischungen in ihre Bestandteile zu zerlegen. HPLC hat sich als chromatographisches Verfahren für analytische und präparative Zwecke etabliert. Die Analyten passieren mit der flüssigen mobilen Phase unter Druck eine Trennsäule, die mit der festen stationären Phase homogen gepackt ist. An der Grenzfläche zwischen beiden Phasen

unterliegen die Analyten ständigen Adsorptions- und Verteilungsprozessen. Durch unterschiedliche Affinität zu den Phasen kommt es zur Trennung in die Einzelbestandteile. Nach Verlassen der Säule werden die Analyten durch UV-Detektion oder andere Verfahren erfasst. Als Detektoren werden häufig UV/VIS-Detektoren mit einstellbarer Wellenlänge verwendet.

In einem Chromatogramm wird die Signalintensität der detektierten Komponente gegen die Elutionszeit aufgetragen. Mit Hilfe von Referenzsubstanzen kann die Identität der Peaks aufgeklärt werden. Im Anschluss erfolgt die Quantifizierung durch Bestimmung der Peakfläche. Das anorganische Kieselgel und seine Derivate zählen zu den relevantesten Packungsmaterialien (55, 56).

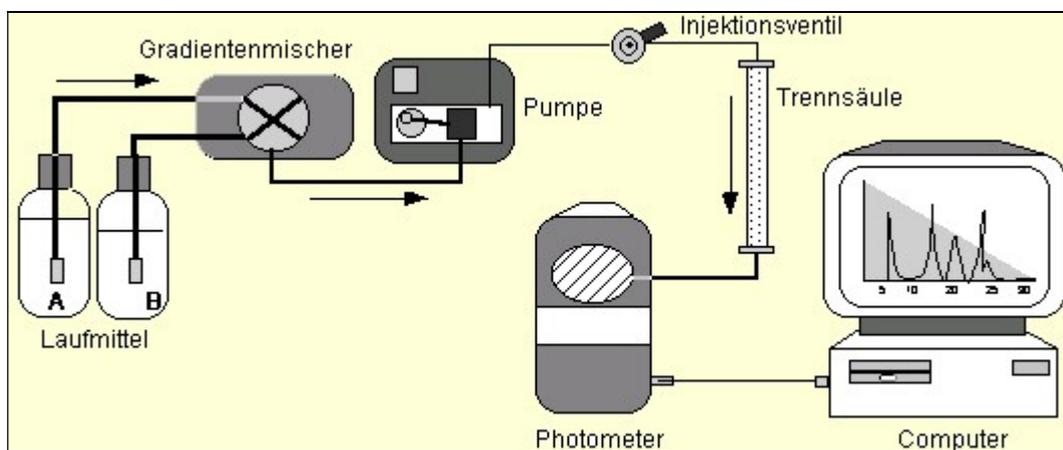


Abb. 6: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage (57)

### 2.6.1.2 Massenspektrometrie (MS)

Die MS ist eine Analysetechnik zur Bestimmung von Molekülmassen. Das Arbeitsprinzip der MS besteht darin, dass durch geeignete Ionisationsverfahren aus Atomen oder Molekülen gasförmige Ionen erzeugt werden, die daraufhin im Hochvakuum nach ihrer Masse bzw. ihrem Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) getrennt und detektiert werden. Im Massenspektrum werden die  $m/z$ -Werte der Ionen gegen deren Häufigkeit (relative Intensität in %) aufgetragen. Allgemein besteht ein MS aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor (55, 58, 59). Mit Hilfe der verschiedenen Ionisationsmodule wird von einer Einzelsubstanz ein Spektrum erhalten, mit dem es möglich ist, die Molekülmasse zu ermitteln oder sogar die Identität aus dem Fragmentierungsmuster abzuleiten.

## 2.7 Kapillarelektrophorese (Capillary Electrophoresis, CE)

In der modernen Naturstoff- bzw. Bioanalytik haben sich die elektrophoretischen Trennverfahren über weite Anwendungsbereiche in analytischer sowie präparativer Hinsicht neben den chromatographischen Methoden etabliert. Die CE ist eine Hochleistungstrenntechnologie, die im Vergleich zur HPLC besondere Vorteile hinsichtlich der Untersuchung geladener Analyte birgt. Unter Elektrophorese wird die Bewegung (Wanderung bzw. Transport) von geladenen Teilchen (Ionen) in einem (meist flüssigen) Medium unter Einfluss eines elektrischen Feldes verstanden. Die Wanderungsgeschwindigkeiten verschiedener Ionen hängen von deren Ladung, Form, effektiven Größe sowie von der Lösungsumgebung und der Stärke des elektrischen Feldes ab. Aus diesem Grund kommt es im Zuge einer elektrophoretischen Wanderung zur Trennung verschiedener Ionen. Diese kann präparativ und vor allem analytisch genutzt werden. Auf diesem Transportphänomen beruhen alle elektrophoretischen Trennverfahren, ob an festen Trägern oder in freier Elektrolytlösung. Bei der CE findet diese Trennung in einem dünnen Kapillarrohr in einer Elektrolytlösung statt. Die Probenvolumina können in einem Bereich von lediglich 10 µl liegen.

Liegt ein elektrisches Feld an, so werden die Gegenionen längs der Feldachse beschleunigt. Es bildet sich ein äußerst flaches, kolbenförmiges Strömungsprofil aus. Im Gegensatz zum Strömungsprofil laminarer Flüsse bewirkt es praktisch keine Bandenverbreiterung. Dieser der elektrophoretischen Wanderung überlagerte elektroosmotische Fluss (EOF) kann so stark sein, dass sogar Anionen entgegen ihrer elektrophoretischen Mobilität zum negativ geladenen Pol mit dem EOF transportiert werden können. Die elektrokinetische Injektion der Proben kann auf mehrere Arten erfolgen. Sie kann hydrodynamisch durch das Anlegen von Druck am Kapillareinlass oder eines Vakuums am Kapillarauslass durchgeführt werden. Hier wird das injizierte Probenvolumen durch den hydrostatischen Druckunterschied und die Zeit bestimmt. Zu den Faktoren, die die Migrationsgeschwindigkeit beeinflussen, gehören die Feldstärke, die Pufferzusammensetzung, die Temperatur, der pH-Wert, die Ladung, die Größe und die Gestalt der Teilchen (55, 59, 60). Neutrale Moleküle bewegen sich mit dem EOF und können nur durch die Mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) oder die Mikroemulsions-Elektrokinetische Chromatographie (MEEKC) getrennt werden (61).

### 2.7.1 Aufbau einer CE-Apparatur

Die wesentlichen Komponenten eines CE-Gerätes mit der allgemein üblichen kathodenseitigen Detektion sind in Abb. 7 dargestellt.

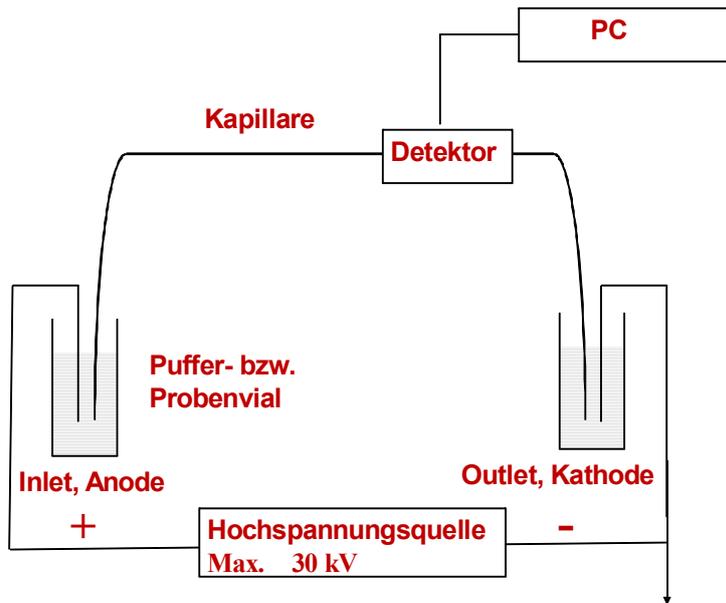


Abb. 7: Schematischer Aufbau einer CE-Apparatur (60)

- Meist werden 20 bis 100 cm lange, mit Polyimid beschichtete fused-silica-Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 50 bis 250  $\mu\text{m}$  verwendet.
- Die Kapillare taucht mit beiden Enden in die mit den Elektrolyten befüllten Gefäße.
- Eine Spannung kann durch eine regelbare Hochspannungsquelle von bis zu 30 kV zur Kathode oder zur Anode geliefert werden.
- Neben den UV-Detektoren können Fluoreszenzdetektoren, induktive Leitfähigkeitsdetektoren, elektrochemische oder radioaktive Detektoren eingesetzt werden.

## 2.8 Material und Methoden

### 2.8.1 Materialien

#### 2.8.1.1 Verwendete Lösungsmittel

Destilliertes Wasser	Hausanlage
Methanol (MeOH)	Carl Roth, Karlsruhe, BRD, $\geq 99,95 \%$
Acetonitril	Carl Roth, Karlsruhe, BRD, $\geq 99,95 \%$
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, BRD, $> 99,5 \%$
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka, Chemie GmbH, Deisenhofen, $> 98 \%$
Ethanol (EtOH), vergällt	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe $\geq 96,4 \%$
EtOH, rein	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe $\geq 99,5 \%$

### 2.8.1.2 Verwendete Referenzsubstanzen

Chlorogensäure	Carl Roth, Karlsruhe, BRD, $\geq 97$ %
Ellagsäure	Carl Roth, Karlsruhe, BRD, $\geq 96$ %
Ferulasäure	Carl Roth, Karlsruhe, BRD, $\geq 98$ %
Isoferulasäure	Carl Roth, Karlsruhe, BRD
Kaffeensäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD, $\geq 95$ %
p-Cumarsäure	Carl Roth, Karlsruhe, BRD, $\geq 97,5$ %
4-Hydroxyacetophenon	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD, $\geq 98$ %
Protocatechinsäure	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz, $\geq 97$ %
Quercetin	Chemapol, Prag, Tschechische Republik
Quercitrin	Chemapol, Prag, Tschechische Republik
Rutin	Carl Roth, Karlsruhe, BRD, $\geq 97$ %
Salicin	Carl Roth, Karlsruhe, BRD, $\geq 98,5$ %
trans-Zimtsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD, $\geq 98$ %
Vanillin	Merck, Darmstadt, BRD
Vanillinsäure	Fluka AG, Buchs Schweiz, $\geq 97$ %
Catechol	Alfa Aesar, GmbH & Co.KG, BRD, 100 %
Benzylbenzoat	Chemikalienausgabe, FB Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg
Benzylsalicylat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
$\delta$ -3-Caren	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
$\delta$ -2-Caren	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
1,8-Cineol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
2'-Hydroxyacetophenone 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
3'-Hydroxyacetophenone 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
4'-Hydroxyacetophenone	Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen
Limonen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Linalool	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Myrcen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Nerolidol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Nonylacetat, 97 %	Aldrich, Steinheim, BRD
Phoebe-Öl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
$\alpha$ -Terpinen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
$\gamma$ -Terpinen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
$\alpha$ -Terpineol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

### 2.8.1.3 Verwendete Reagenzien

Ameisensäure	Merck, Darmstadt, BRD, 98–100 %
NaOH (1N)	Carl Roth, Karlsruhe, BRD, 1 mol/l 0,2 %
Salzsäure (37 %)	Carl Roth, Karlsruhe, BRD, 36,5–38 %
Borsäure	VEB Laborchemie, Apolda, DDR, 2. AB DDR

### 2.8.1.4 Verwendete Extrakte

Pappel <i>Muhle-Larsen</i> (ML)	Ch.-B.: H-V5/10-E3
Pappel <i>Androscoggin</i> (AS)	Ch.-B.: H-V1/10-E1
Pappel <i>Max 5</i> ( <i>Max 5</i> )	Ch.-B.: H-V6/10-E2

### 2.8.1.5 Herstellung des Lyophilisates

Der EtOH-Anteil wurde von einer genau abgemessenen Menge Flüssigextrakt unter Vakuum bei max. 25–30 °C entfernt und das restliche Wasser mittels Trockeneis im Shell-Freeze-Verfahren in einem Rundkolben eingefroren. Die sich anschließende Gefriertrocknung wurde an der Anlage Alpha 2–4 LCD, Fa. Christ, Osterode, Deutschland durchgeführt. Der Eiskondensator wurde zuvor auf -85 °C abgekühlt und ein Vakuum von < 1 mbar angelegt. Der Trockenextrakt wurde gewogen und unter Vakuum in einem Exsikkator aufbewahrt.

#### 2.8.1.5.1 Hydrolyse des Extraktes

Die Hydrolyse des Extraktes erfolgte unter standardisierten Bedingungen: 25 mg Lyophilisat wurden in einen 10 ml Messkolben eingewogen, mit 5,5 ml 70-%-igem EtOH versetzt und für 30 Min. bei 30 °C in den Trockenschrank gestellt. Anschließend wurde mit 4,5 ml 1-molarer NaOH auf 10 ml aufgefüllt. Im Kleinmaßstab wurden 2,5mg Lyophilisat mit 550 µl 70-%-igem EtOH in einem Eppendorf-Tube versetzt und ebenfalls 30 Min. bei 30 °C in den Trockenschrank gestellt. Anschließend wurde mit 450 µl 1-molarer NaOH ergänzt.

#### 2.8.1.6 Probenvorbereitung für die Applikation der HPLC- Methoden

25 mg Pappel-Extrakt wurden mit 70-%-igem EtOH extrahiert. Die Lösung wurde zunächst kräftig geschüttelt und anschließend 30 Min. bei 30 °C in den Trockenschrank gestellt. Anschließend wurde die Lösung mit 4,5 ml NaOH 1,0 mol/l auf 10 ml ergänzt, kräftig geschüttelt und filtriert. Nach der Filtration wurden die Proben anhand der im Abschnitt 2.8.2.1 Analytik beschriebenen HPLC-Methode analysiert.

### 2.8.1.7 Probenvorbereitung für die CE- Messung

#### 2.8.1.7.1 Probenvorbereitung des unhydrolysierten und hydrolysierten Extrakts

Die Proben wurden wie im Kapitel 2.8.1.6 behandelt und vorbereitet. (Zusatz von NaOH nur bei der Hydrolyse )

#### 2.8.1.7.2 Herstellung der Boratstamm-Puffer

Die jeweilige Menge an Borat-Puffern wurde nach Sørensen und Clark hergestellt (62).

Der pH-Wert wurde mittels pH-Meter und mit NaOH bzw. Salzsäure eingestellt.

### 2.8.2 Geräte und Methode

#### 2.8.2.1 HPLC-DAD-MS

Zweck	Trennung und Quantifizierung von Flavonoiden und Chlorogensäure
HPLC-Gerät	HP Hewlett Packard Series 1100, Agilent Waldbronn, BRD
Stationäre Phase	LiChrospher®-60-Säule, RP-select-B (5 µm, 125 x 4) der Firma Merck (50981), BRD
Temperatur	30 °C
Detektion	UV bei 250 nm und 350 nm
Flow	siehe Gradienten-Verlauf
Injektionsvolumen	20 µl
Mobile Phase	A: MeOH / H <sub>2</sub> O (10+90 V/V) + 0,1 % Ameisensäure B: MeOH + 0,1 % Ameisensäure

#### Gradienten-Verlauf

Zeit	Gradienten	Flussrate ml/Min.
1	00 % B	2,0
2,5	02 % B	2,0
3–7	03 % B	1,0
9	20 % B	2,0
11	25 % B	1,5
12	30 % B	1,5
14	80 % B	2,5
16–17	00 % B	2,5

### Validierungsparameter:

Salicin	Nachweisgrenze (in $\mu\text{g/ml}$ ): 1,65 Präzision (in %): 4,55 Linearität: 1,00–100 $\mu\text{g/ml}$ , $r^2 = 0,99989$ , N: 4
Cumarsäure	Nachweisgrenze (in $\mu\text{g/ml}$ ): 1,24 Präzision (in %): 10,64 Linearität: 0,0 –50 $\mu\text{g/ml}$ , $r^2 = 0,99977$ , N: 4

Die Ermittlung der für die Untersuchungen notwendigen Korrelationsgeraden zeigten unabhängig von der eingesetzten Salicin- bzw. p-Cumarsäurekonzentration einen streng linearen Verlauf. Alle Proben wurden jeweils doppelt injiziert.

### Validierung der Methoden

Die Validierung der Methoden erfolgte anhand der Guideline der International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human (ICH) *Note for Guidance on Validation of analytical procedures: Methodology* (63).

Linearität:	Regressionsanalyse der Werte aus Dreifach-Injektionen mit mindesten fünf Konzentrationen im erwarteten Konzentrationsbereich der Proben.
Präzision:	Die Wiederholpräzision wurde als Mittelwert der relativen Standardabweichung von Dreifachinjektionen von drei Konzentrationen bestimmt.
Nachweisgrenze:	Die Nachweisgrenze wurde auf der Basis der Standardabweichung von Achsenabschnitt und Steigung der Regressionsgeraden berechnet (Nachweisgrenze = $3,3 \sigma/S$ , wobei $\sigma$ = Standardabweichung des Achsenabschnittes und $S$ = Geradensteigung) und durch Injektion einer entsprechenden Konzentration des Analyten verifiziert.
LC-MS-Gerät	LCQ Classic Thermo Fisher, Egelsbach, BRD
HPLC-MS-Gerät	Thermo Fisher, LCQ Classic, Spectra System P4000 / AS 3000 / SN 4000, Egelsbach, BRD
Konzentration	20 $\mu\text{m/ml}$
Flow	max. 0,5 ml/Min.

### 2.8.2.2 Gehaltsbestimmung der Markersubstanzen im Extrakt

Die Bestimmung der Gehalte erfolgt nach der Hydrolyse des Lyophilisates (Pappel *Muhle-Larsen*, Pappel *Androscoggin* und Pappel *Max 5*). Tab. 1 zeigt den Gehalt an Markersubstanzen in den verschiedenen Pappelsorten, der separat und im Gemisch vermessen wurde.

Tab. 1: Darstellung der Gehaltsbestimmung der Markersubstanzen aus den Extrakten

Substance	$\lambda$ [nm]	$ML \pm RSD$ mg/ml (%)	$AS \pm RSD$ mg/ml (%)	$Max\ 5 \pm RSD$ mg/ml (%)	Gemisch $\pm RSD$ mg/ml (%)
Salicin	267	$1,5 \pm 0,49$ (15)	$1,63 \pm 0,49$ (16,3)	$0,70 \pm 0,75$ (7,0)	$1,37 \pm 0,33$ (13,7)
Coumaric-acid	310	$0,12 \pm 0,70$ (1,2)	$0,22 \pm 0,17$ (2,2)	$0,06 \pm 0,35$ (0,6)	$0,16 \pm 0,16$ (1,6)

*ML*: Pappel *Muhle-Larsen* Ch.-B.: H-V5/10-E3  
*AS*: Pappel *Androscoggin* Ch.-B.: H-V1/10-E1  
*Max 5*: Pappel *Max 5* Ch.-B.: H-V6/10-E2  
 Gemisch: *Muhle-Larsen*, *Androscoggin*, *Max 5* zu gleichen Teilen  
 RSD%: relative Standardabweichung  
 N: 5

Die Ergebnisse zeigen, dass die Pappelsorte *Androscoggin* den höchsten Gehalt an Salicin und auch p-Cumarsäure aufweist, während in der Sorte *Max 5* der niedrigste Gehalt zu finden ist. Das Extraktgemisch der Pappelsorten brachte keine Aufkonzentrierung der Inhaltsstoffe.

### 2.8.3 Kapillarelektrophorese (CE)

CE-Gerät	Beckmann Coulter model P/ACE MDQ Molecular Characterization System (Fullerton, USA) mit UV diode array detector, im Bereich von 190–600 nm
Kapillare	Sodiumcholate-(SC-)-fused-silica-Kapillarsäule für die CE Quarzglaskapillare Länge: insgesamt 40,5 cm, Länge zum Detektor: 31 cm
Temperatur	25 °C
Spannung	30 kV
Puffer	Borat-Puffer nach Sørensen, pH zwischen 8,0 und 10,0 (62)
Kapillare	Quarzglaskapillare Länge: 64,5 cm, Länge zum Detektor: 56 cm Innendurchmesser: 50 $\mu$ m, erweiterter optischer (mit Bubble) Weg (150 mm)

## **2.8.4 Stabilitätsuntersuchungen**

### **2.8.4.1 Stabilität des Extraktes in Abhängigkeit von der relativen Feuchte**

Die Stabilität eines feuchtigkeitsempfindlichen Wirkstoffes bzw. Extraktes verhält sich je nach Lagerung vollkommen anders. Der Extrakt wurde in Kammern mit definierten relativen Luftfeuchten (r. F.) (57 % r. F., eingestellt mit Natriumbromid und 11 % r. F., eingestellt mit Lithiumchlorid) aufbewahrt, um den Einfluss der Umgebungsbedingungen auf die Stabilität des Extraktes zu bestimmen (64). Der Extrakt wurde an Salicin- und Cumarsäuregehalt nach definierten Zeitabständen mittels HPLC-Methode untersucht.

### **2.8.4.2 Stabilität des Extraktes in topischen Formulierungen**

Der ausgewählte Extrakt wurde jeweils zu 1 % Trockenextrakt in den Formulierungen, die Basiscreme, das Gel und die Mikroemulsion eingearbeitet. Um die Stabilität des Extraktes zu untersuchen, wurden die Ansätze der halbfesten Formulierungen geteilt und jeweils bei verschiedenen Temperaturen (40 °C, 30 °C, 25 °C) und im Kühlschrank für zwölf Wochen aufbewahrt. Es wurden aus jedem Ansatz der halbfesten Formulierungen drei Proben entnommen und organoleptische bzw. makroskopische Einzelprüfungen durchgeführt. Zudem wurde eine Probe anhand der HPLC-Methode auf den Gehalt an Markersubstanzen überprüft.

Zu den makroskopische Einzelprüfungen zählen:

- Visuelle Überprüfung: durch Beschreibung der Einheitlichkeit der Oberfläche, Homogenität sowie des Farb- und Glanzeindruckes
- Geruchtest: Geruch und dessen Veränderung während der Lagerung
- Streichtest: Penetration in die Haut, Schmiervermögen, Zügigkeit und Verreibbarkeit
- Ausdrücktest: Salbenstrang, der gleichmäßig aus dem Gefäß tritt

## **2.8.5 Liberationsuntersuchungen am Mehrschichtmembranmodell (MSMM)**

Das Liberationsverhalten halbfester Formulierungen lässt sich mit Hilfe von In-vitro-Modellen untersuchen, wovon diverse entwickelt wurden (65). Im Gegensatz zu anderen Liberationsmodellen, bei denen der Arzneistoff durch eine Verteilungsbarriere in die Akzeptorflüssigkeit diffundieren muss und somit Schwierigkeiten bezüglich der möglichen Diffusion des Akzeptormediums in das Vehikel bereitet, stellt das MSMM nach Fürst und Neubert einer Umgehung dieser Problematik durch die Verwendung von Membranen, in denen der Akzeptor (Dodecanol bzw. Glycerol) in eine Matrix aus Collodium eingebettet ist, dar (66).

Das Modell enthält bis zu neun Polyacrylzellen, die zwischen zwei Platten verschraubt sind. Eine Zelle besteht aus einer Grundscheibe, einer Schablone mit einer quadratischen Aussparung von genau  $4\text{ cm}^2$  als Probenraum für die zu testenden topischen Formulierung und einer Deckscheibe, die den oberen Abschluss der Zelle bildet.

Die benötigte Anzahl von Membranen ist zwischen Grundscheibe und Schablone platziert. Die Membranen bestehen aus einer Kollodium-Matrix. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung kamen drei Membranen pro Zelle zum Einsatz, bei denen Collodium als membranstabilisierende Matrix und Dodecanol als Akzeptor dient.

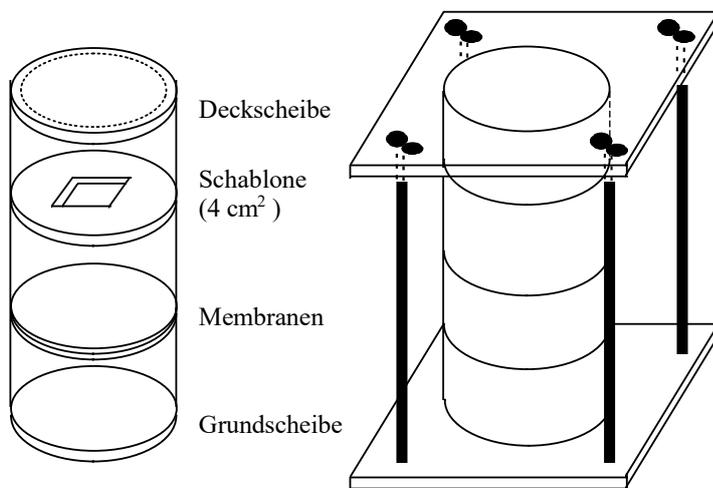


Abb. 8: Schematische Darstellung des Mehrschichtmembranmodells (MSMM)

Die Lösung zur Herstellung der Membranen setzt sich aus 2 g Dodecanol, 100 g einer Ether/EtOH-Mischung (85 + 15, V/V) sowie 96 g einer 4-%-igen Collodiumlösung zusammen. Mit Hilfe eines Filmziehgerätes (Eigenbau mechanische Werkstatt des Fachbereichs Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (MLU)) wurde die Mischung bei definierter Spaltenbreite gleichmäßig auf einer Glasplatte verteilt. Nach vollständigem Verdampfen der Lösungsmittel wurde die Membran von der Glasplatte abgezogen. Am gleichen Tag erfolgte das Ausstechen kreisförmiger Stücke, die im MSMM verwendet wurden.

Auf die oberste Membran jeder Zelle wurde die definierte Menge an der Formulierung gleichmäßig aufgetragen und über einen Zeitraum von 30 bis 300 Min. bei  $32\text{ °C}$  inkubiert. Nach der Trennung der Membranen erfolgte die Extraktion und anschließend die Quantifizierung der Markersubstanzen anhand der HPLC-Methode. Um mögliche Störsignale zu umgehen, wurden als Extraktionsmittel 70 % EtOH festgelegt.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Messungen zur Bioaktivität des Balsampappel-Extraktes

#### 3.1.1 Probennahme und Extraktion

Zur Ermittlung biologisch aktiver Substanzen der Rohextrakte wurden verschiedene Pflanzenteile der Sorten *Androscoggin*, *Muhle-Larsen* und *Max 5* verwendet. Die Probennahme fand monatlich zwischen März und Oktober statt. Dabei wurden jeweils 6 g Feuchtbioasse von Knospen, Blättern und Rinde in 84 ml EtOH extrahiert. Die Verwendung von EtOH als Lösungsmittel wurde aufgrund des späteren Einsatzes für kosmetische und pharmakologische Produkte gewählt, da diese dermatologisch eingesetzt werden. Insgesamt betrug die Extraktionszeit für die Proben 24 Stunden mit einer anschließenden Filtration und Einengung bis zur Trocknung.

Die biologische Trockenmasse (BTM) wurde für das Bioassay wieder zurückgelöst (100 mg BTM in 1 ml EtOH). In dem Vorgang wurde zwischen Schüttler und Ultraschall variiert, um die effektivste Aufschlussmethode zu ermitteln. Ebenso wurden 30%-iger und 70%-iger EtOH als Lösungsmittel eingesetzt, um das erhaltene Extrakt hinsichtlich ihrer biologischen Wirksamkeit zu vergleichen (54).

#### 3.1.2 Testung auf antimikrobielle Wirkung

Der untersuchte Extrakt wurde in Anlehnung an die DIN 58940-3 *Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika* durchgeführt (67). Die Testorganismen (siehe Tab. 2) wurden in Festmedien kultiviert, nach vier Tagen abgeschwemmt und auf Isosensitivagar (Difco) ausgespatelt (54).

Tab. 2: Testorganismen für die Analyse antimikrobieller Wirkungen des Balsampappel-Extraktes

Gram-positive Bakterien	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Micrococcus luteus</i>
	<i>Staphylococcus capitis</i>
Gram-negative Bakterien	<i>Escherichia coli (E. coli)</i>
	<i>Proteus myxofaciens</i>
Hefe	<i>Candida glabrata</i>

Die Testsubstanz wurde mit jeweils 1 mg auf ein steriles Testplättchen aufgebracht. Je Petrischale wurde zusätzlich ein Antibiotikaplättchen, das als Positivkontrolle diente, aufgelegt. Die

Inkubationszeit betrug 24 und 35 Stunden. Zur Auswertung wurden die Hemmhöfe, die sich um die Testplättchen gebildet hatten, vermessen. In Abb. 9 wird ein Beispiel aus den Messungen dargestellt.

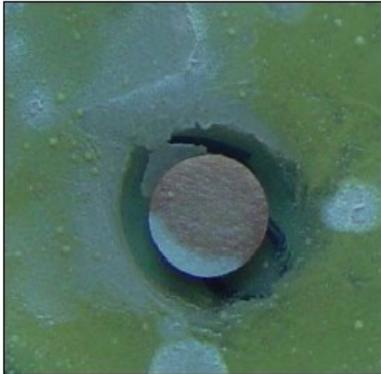


Abb. 9: Beispiel eines Hemmhofes auf Agarplatte (54)

In Abb. 10 sind die Hemmwirkungen der zu vergleichenden Knospenextrakte (30- bzw. 70-%iger EtOH) veranschaulicht. Es werden ausschließlich Mikroorganismen angeführt, bei denen eine Hemmung nachgewiesen wurde. In Extrakten aus den Blättern und der Rinde konnten keine antimikrobiellen Wirkungen belegt werden.

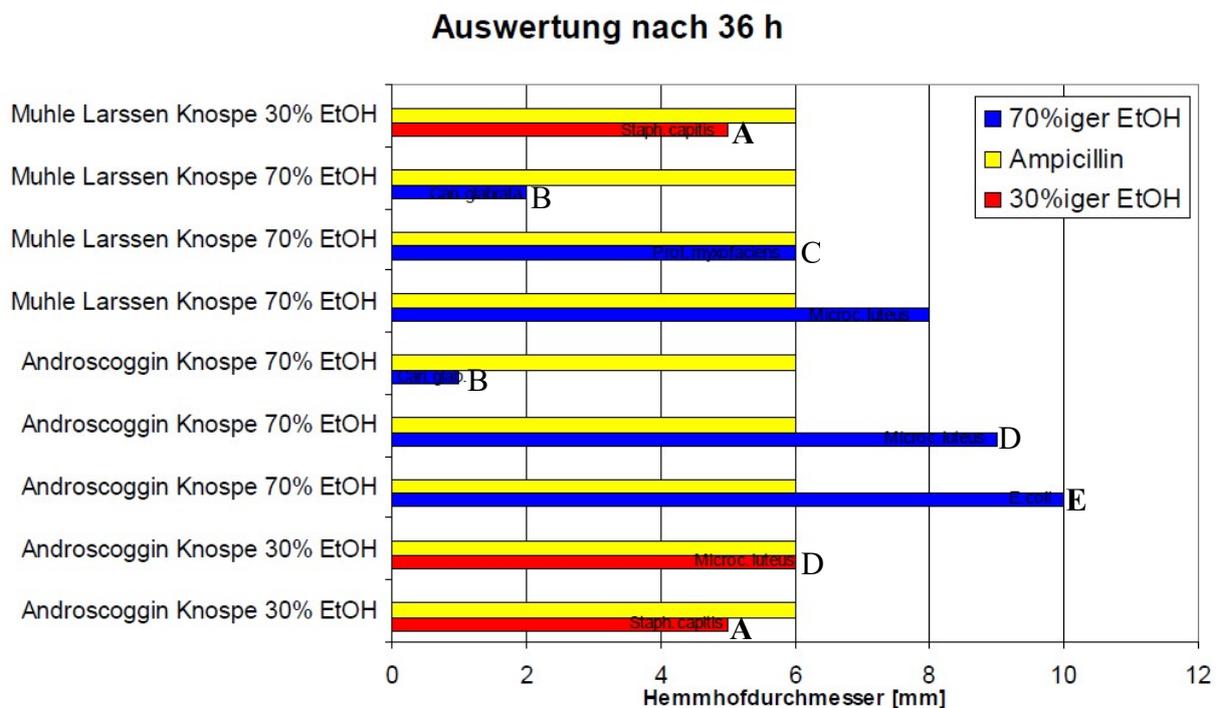


Abb. 10: Grafische Darstellung der antimikrobiellen Knospenwirkung der Lösungsmittel mit 30- und 70-%igem EtOH. (54)

A: *Staphylococcus capitis*, B: *Candida glabrata*, C: *Proteus myxofaciens*, D: *Micrococcus luteus*, E: *Escherichia coli* (*E. coli*)

Aus den Ergebnissen des Assays ist ersichtlich, dass bei der Verwendung von 70%-igem EtOH als Extraktionsmittel eine deutlich höhere antimikrobielle Wirkung nachweisbar ist. So konnten bei den Extraktionen mit 70%-igem EtOH jeweils drei Hemmwirkungen pro Extrakt festgestellt werden. Bei Extrakten mit 30%-igem EtOH bei *Muhle-Larsen* wurde hingegen nur eine Hemmung und bei *Androscoggin* wurden zwei Hemmungen identifiziert. Im Vergleich zur Ampicillin-Referenz konnte herausgestellt werden, dass die Extrakte, die mit 70%-igem EtOH extrahiert wurden, bei den Mikroorganismen *Micrococcus luteus* und *E. coli* deutlich höhere antimikrobielle Wirksamkeit zeigten als das Antibiotikum Ampicillin.

Darüber hinaus wurden die Aufschlussmethoden mittels Schüttler und Ultraschall verglichen (siehe Abb. 11).

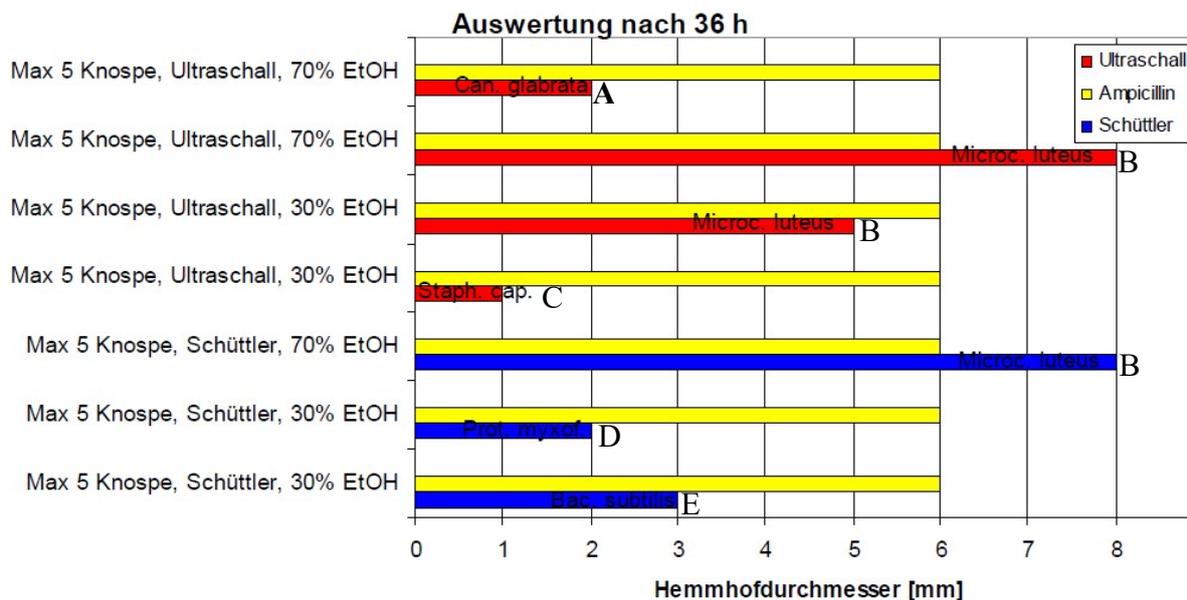


Abb. 11: Grafische Darstellung des Vergleichs der Extraktionsmethoden mit Schüttler und Ultraschall (54)

A: *Candida glabrata*, B: *Micrococcus luteus*, C: *Staphylococcus capitis*, D: *Proteus myxofaciens*, E: *Bacillus subtilis*.

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich (siehe Abb. 11), dass mit Ultraschall ein deutlich höherer Aufschlussgrad erreicht werden konnte, da eine höhere antimikrobielle Wirkung nachweisbar war. Es wird daher als zukünftige Methode empfohlen, die Pflanzenteile mit 70%-igem EtOH als Lösungsmittel und mit Ultraschall als Aufschlussmethode zu extrahieren.

Weiterhin wurden Untersuchungen hinsichtlich des optimalen Erntezeitpunktes durchgeführt. Hierzu wurde ebenfalls der Agardiffusionstest eingesetzt. Hierbei kamen Extrakte der Sorte *Max 5* zum Einsatz, die aus Pflanzenteilen von verschiedenen Erntezeitpunkten stammten.

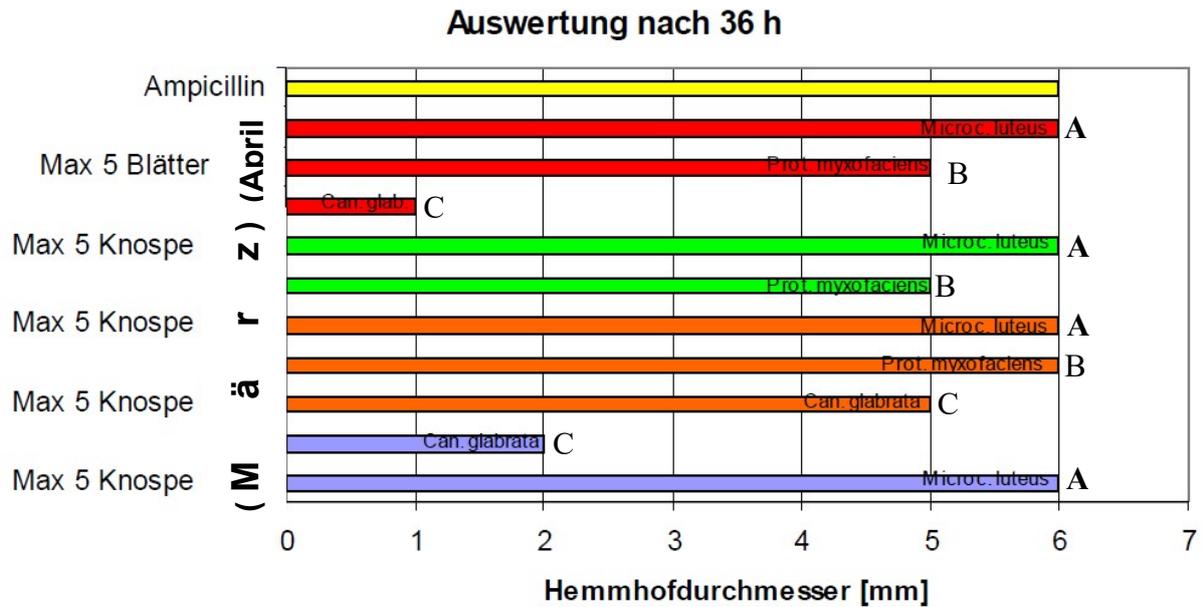


Abb. 12: Grafische Darstellung des Vergleichs der einzelnen Erntezeitpunkte der Sorte *Max 5* (54)

A: *Micrococcus luteus*, B: *Proteus myxofaciens*, C: *Candida glabrata*

Aus den Ergebnissen (siehe Abb. 12) lässt sich der März als optimaler Erntezeitpunkt festlegen, da bei diesen Knospenextrakten die höchste antimikrobielle Wirkung nachweisbar war. Zu diesem Zeitpunkt waren die Knospen noch nicht geöffnet. Es wird daher empfohlen, die Knospenernte vor der Öffnung der Knospen durchzuführen und diese in den Zeitraum Mitte bis Ende März zu legen, je nach Wetterlage und Reifegrad der Knospen.

Die gesamten Erntevorgänge inklusive Extraktion und Untersuchung wurden nach zwei Jahren wiederholt. Dabei konnten die bisher erzielten Ergebnisse reproduziert und bestätigt werden.

Zudem wurde der Agardiffusionstest mit Mischproben von allen drei Pappelklonen vorgenommen. Diese entstanden durch das Häckseln von Pappelruten und nachfolgender Extraktion. Im Assay konnten die antimikrobiellen Wirkungen bestätigt werden. Allerdings war außerdem erkennbar, dass die dreifache Menge an Extrakt eingesetzt werden musste, um die vergleichbare Wirkung des reinen Knospenextrakts zu erreichen. Darüber hinaus konnte kein nennenswerter Unterschied in der antimikrobiellen Wirkung der drei Pappelklone (*Muhle-Larsen*, *Androscoggin*, *Max 5*) festgestellt werden. Zudem wurde keine nennenswerte Abweichung der Aktivitäten bei den Parametern Pflanzenabstand und Düngung nachgewiesen (54).

### 3.1.3 Testung auf anti-inflammatorische Wirkung

In einem weiteren Schritt wurde die Identifizierung der entzündungshemmenden (anti-inflammatorischen) Wirkung bzw. Aktivität des Pappel-Extraktes getestet. Hierzu wurden Nitrat

und Nitrit photometrisch analysiert. Inflammatorische Zellen sondern Stickstoffmonoxid (NO) ab, das in Flüssigkeit schnell zu Nitrat und Nitrit reagieren. Nitrat und Nitrit sind photometrisch leichter zu erfassen als das instabile NO. Durch die Zugabe von Nitratreduktase wurde Nitrat zu Nitrit reduziert. Zusammen mit dem Griess-Reagenz entstand ein lila gefärbter Komplex, der gemessen wurde. Die Abb. 13 zeigt das Reaktionsschema der Messung (54).

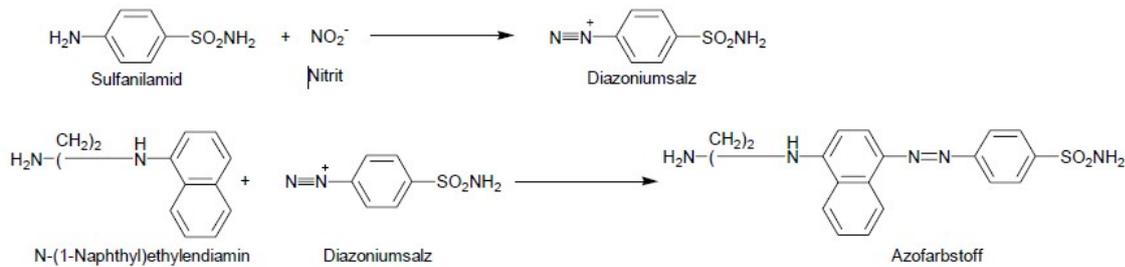


Abb. 13: Reaktionsschema für die photometrische Messung der anti-inflammatorischen Wirkung

Durch die photometrische Messung (bei 540 nm) lässt sich die quantitative Menge des gebildeten Nitrits bestimmen und damit auch indirekt die Menge an NO. Eine anti-inflammatorische Wirkung tritt auf, wenn die NO-Konzentration um 15 bis 20 % reduziert wird.

Für das Assay wurde an der Hochschule Anhalt die Zelllinie U937 verwendet. Durch Stimulation mit LPS (Lipopolysaccharide) aus den Zellwänden von gram-negativen Bakterien sollte die NO-Ausschüttung erreicht werden. In den Proben wurde daraufhin jeweils 1 mg Pappel-Extrakt (aus Knospen, Blättern, Rinde) hinzugefügt und für fünf Stunden inkubiert. Die Nitratreduktase und das Griess-Reagenz wurden erst vor der photometrischen Messung beigemischt.

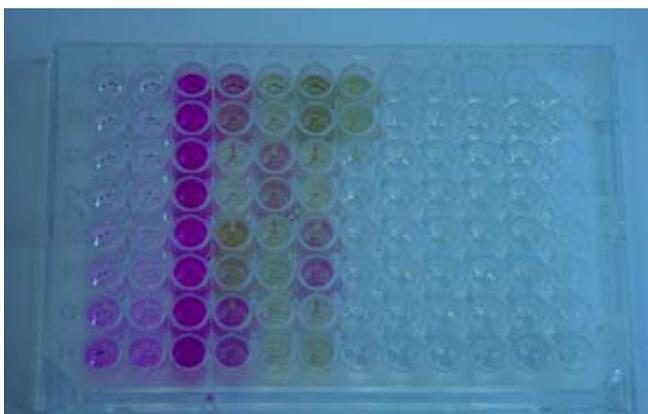


Abb. 14: Testplatte bei NO-Assay

Es konnte ausschließlich für Proben aus der Rinde der getesteten Pappelklone eine antiinflammatorische Wirkung festgestellt werden. Bei Extrakten aus Knospen und Blättern konnte keine entzündungshemmende Wirkung detektiert werden. Dies liegt daran, dass die Rinden

dieser Gattung meist Verbindungen mit antiinflammatorischer Wirkung wie Salicin und deren Derivaten enthalten.

### 3.1.4 Testung auf antioxidative Wirkung

Die antioxidative Wirkung des Balsampappel-Extraktes wurde mittelst 2,2-Diphenyl-1-pikrylhydrazyl-(DPPH-)Test untersucht, der die Redoxreaktion mit dem stabilen DPPH-Radikal ausnutzt (68). Das DPPH-Radikal besitzt durch ungepaarte Elektronen am Stickstoffatom eine violette Färbung und kann somit photometrisch bei 517 nm erfasst werden. In diesem Fall gilt das Balsampappel-Extrakt als ein direktes Antioxidans. Das Reaktionsschema ist in Abb. 15 dargestellt. Die Färbung der Probe ändert sich von violett zu gelb, wenn das Radikal eine Bindung mit einem Wasserstoffatom eines Radikalfängers eingeht und das reduzierte DPPH-H (2,2-Diphenyl-1-pikrylhydrazin) entsteht. Damit kann die antioxidative Wirkung des Balsampappel-Extraktes quantitativ bestimmt werden.

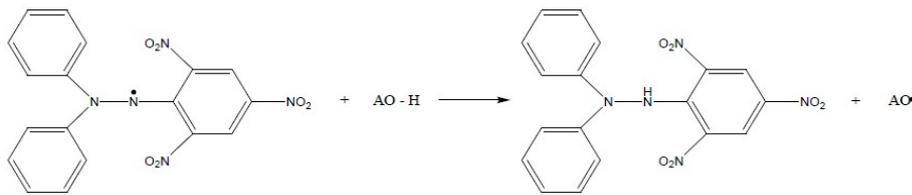


Abb. 15: Reaktionsschema für die photometrische Messung der antioxidativen Wirkung

Zu Beginn der Untersuchungen erfolgte ein Vorversuch auf einer Dünnschichtplatte (Abb. 16), wobei jeweils 10 mg Pappel-Extrakt (Knospe, Blätter, Rinde) gegen 1 mg Vitamin C (starkes Antioxidans) aufgetragen wurden. Daraufhin erfolgte das Besprühen der Platte mit DPPH-Lösung.

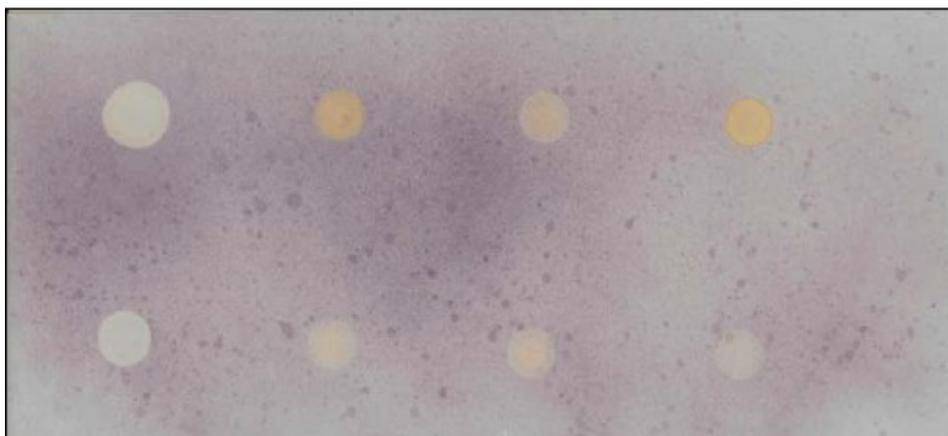


Abb. 16: Darstellung der Testung von Pappelproben auf antioxidative Wirkung  
(links: Referenz Vitamin C, daneben: drei Pappelproben (Knospe, Blätter, Rinde))

In diesem Vorversuch konnte eine antioxidative Wirkung von allen drei Pflanzenbestandteilen nachgewiesen werden, da sich um alle Proben eine entfärbte Zone bildete. Die Auswertung erfolgte über ein DPPH-Assay im Küvettentest und anschließender photometrischer Untersuchung. Da das Extrakt eine Eigenfarbe besitzt, wurden die Proben stark verdünnt, um ein störungsfreies Messen bei 517 nm zu ermöglichen. Die Verdünnungsstufen aller Proben betragen zwischen 0,01 und 0,002 mg/ml.

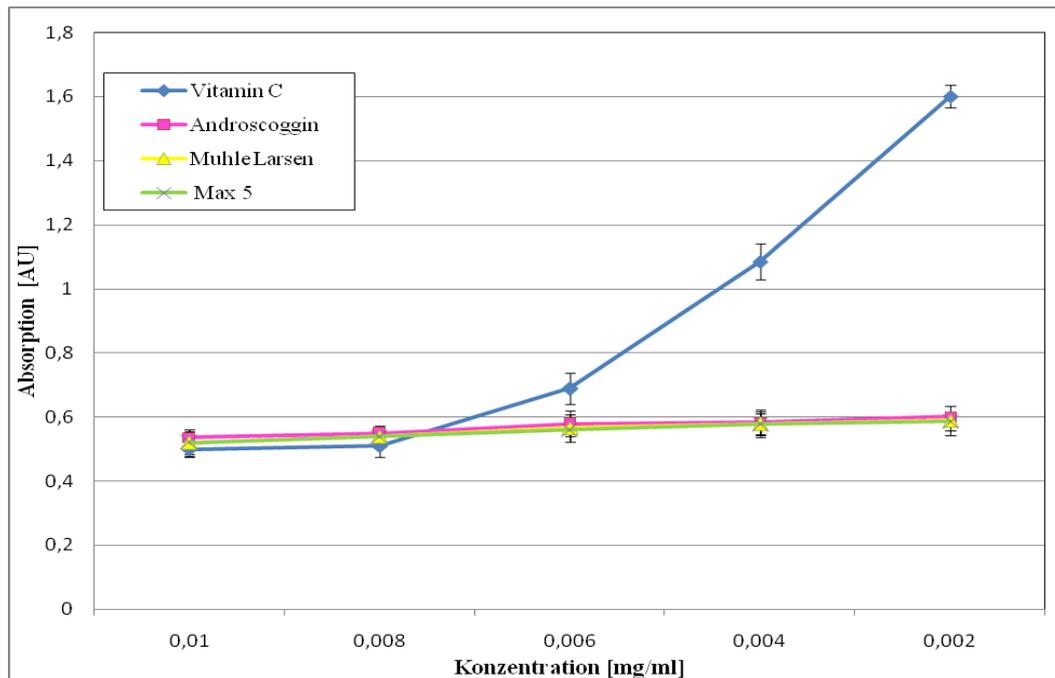


Abb. 17: Grafische Darstellung des DPPH-Assays mit Referenz Vitamin C und Mischextrakten von den Balsampappeln (*Androscoggin*, *Muhle-Larsen* und *Max 5*),  $n = 3$

Aus den Ergebnissen (siehe Abb. 17) ist ersichtlich, dass alle drei Extrakte der verschiedenen Pappelklone antioxidativ wirksam sind, es ist jedoch kein nennenswerter Unterschied in der antioxidativen Aktivität feststellbar. Bei den Konzentrationen von 0,01 und 0,008 mg/ml ist die Radikalfängereigenschaft der Pappel-Extrakte vergleichbar mit jener von Vitamin C in der gleichen Konzentration. Bei den folgenden geringeren Konzentrationen war zu beobachten, dass die Extrakte der Pappeln eine deutlich höhere Wirkung zeigten als die vergleichbare Konzentration der Referenzsubstanz. Dies verdeutlicht, dass die Balsampappelmischextrakte auch in äußerst geringen Konzentrationen als Antioxidantien geeignet sind (54).

#### 3.1.5 Testung auf cytotoxische Wirkung

Zur Bestimmung cytotoxischer Eigenschaften wurden sowohl die Pappel-Extrakte (im Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB) Halle (Saale)) unter Verwendung des XTT-Assays mit zwei

humanen Krebszelllinien (HAT-29 und PC-3) untersucht. Es konnten sowohl bei den Extrakten der Pappelbestandteile (Knospen, Blätter, Rinde) als auch bei den Mischextrakten (ganze Ruten) keine cytotoxischen Wirkungen der Balsampappel-Extrakte festgestellt werden.

#### **3.1.6 Testung auf antirheumatische Wirkung**

Die Untersuchung hinsichtlich der antirheumatischen Wirkung fand an dem Institut für klinische Immunologie in Leipzig statt. Um Aufschluss über die antirheumatische Wirkung zu erhalten, wurde in DBA-Mäusen eine kollageninduzierte Arthritis ausgelöst (Kollagen II + CFA geboostet mit Kollagen II und IFA). Diese Mäuse wurden daraufhin täglich an allen vier Pfoten mit dem Balsampappelbalsam eingerieben. Es konnten keine antirheumatischen Wirkungen nachgewiesen werden.

### **3.2 Applikation der HPLC-Methoden auf verschiedene Pappelsorten und Pflanzenteile**

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es, den Einfluss verschiedener Faktoren (Zeit, Standweite, Dünger) auf den Gehalt aller Markersubstanzen zu quantifizieren und somit die optimalen Bedingungen für die Pflanzung und Erntezeit der Pappelsorten zu bestimmen. Im Rahmen dieser Thesis wurden die Knospen, Blätter (nur von *Androskoggin* im April) und die Rinde untersucht. Die Pappelsorten wurden im März und im April geerntet. Die Markersubstanzen p-Cumarsäure, Salicin und Ferulasäure wurden mittels HPLC analysiert und quantifiziert. Ferulasäure kommt in nur geringen Mengen vor, weshalb sie aus den Markersubstanzen in den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen ist. Die Probenvorbereitungen für diese Messungen werden in Abschnitt 2.8.1.6 beschrieben. In Hinblick auf die Auswertung wurden zunächst beide Pappelsorten innerhalb einer Erntezeit und anschließend der Substanzgehalt einer Pappelsorte bei unterschiedlichen Erntezeiten bezüglich ihres Substanzgehalts miteinander verglichen.

#### **3.2.1 Knospen der Pappeln *Muhle-Larsen* und *Androskoggin***

Die Analyse der Knospen der Pappeln *Muhle-Larsen* und *Androskoggin* erfolgte nach der Hydrolyse des Lyophilisates (Pappel *Muhle-Larsen* und Pappel-*Androskoggin*). Es wurde der Einfluss folgender Parameter auf den Gehalt der Substanzen untersucht: *Zeit*, *Standweiten* und *Düngerzusatz*. Die Abb. 18 und die Tab. 3 verdeutlichen den prozentualen Anteil der Inhaltsstoffe beider Pappelsorten im Monat März.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

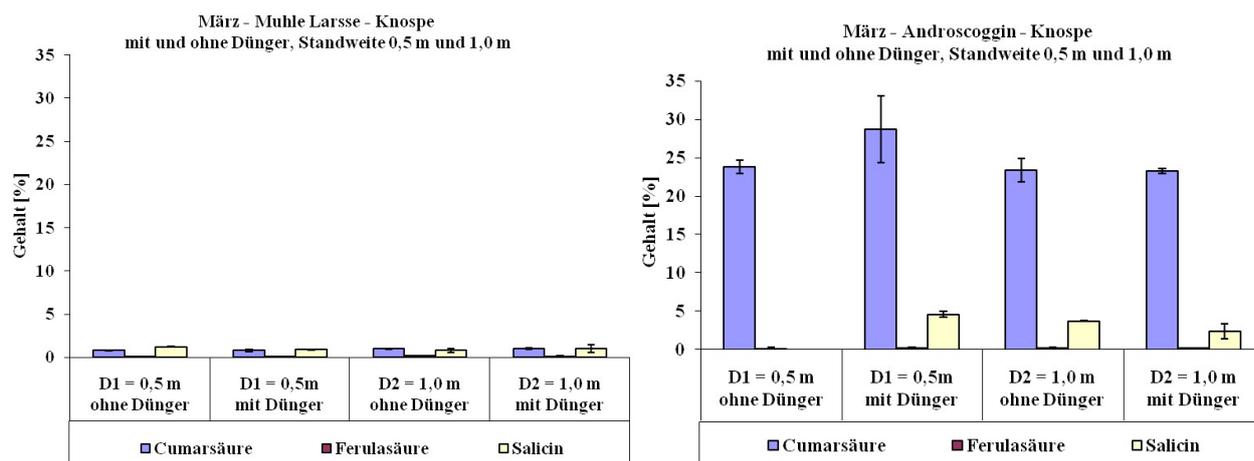


Abb. 18: Darstellung der Inhaltsstoffe in den Knospen der Pappeln *Muhle-Larsen* (links) und *Androscoggin* (rechts) im März

Tab. 3: Darstellung der prozentualen Gehalte in den Knospen der Pappeln *Muhle-Larsen* (links) und *Androscoggin* (rechts) im März

Sub.	D1, ohne Dünger	D1, mit Dünger	D2, ohne Dünger	D2, mit Dünger	Sub.	D1, ohne Dünger	D1, mit Dünger	D2, ohne Dünger	D2, mit Dünger
C.	0,775	0,81	0,981	0,999	C.	23,847	28,682	23,413	23,296
S.	1,191	0,864	0,778	0,971	S.	0	4,601	3,726	2,372
F.	0,121	0,125	0,14	0,137	F.	0,129	0,252	0,237	0,178

Sub.: Substanz, D.: Standweite (m), C.: Cumarsäure, S.: Salicin, F.: Ferulasäure

Die Knospen der Pappel *Androscoggin* zeigen einen wesentlich höheren p-Cumarsäuregehalt. Salicin ist bei einer Standweite von 0,5 m und ohne Dünger kaum vorhanden. In den Knospen der Pappel *Muhle-Larsen* ist der Gehalt an p-Cumarsäure und Salicin gering und wird weder durch die Standweite noch durch Düngerzusatz beeinflusst. Generell spielen die Standweiten und der Düngerzusatz im März in beiden Pappelsorten keine Rolle.

Im April lieferte die Pappel *Androscoggin* keine Knospen mehr, stattdessen wurden die Blätter dieser Sorte vermessen. In der Abb. 19 und der Tab. 4 sind die Messergebnisse der Knospen der Pappel *Muhle-Larsen* und der Blätter der Pappel *Androscoggin* im April dargestellt.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

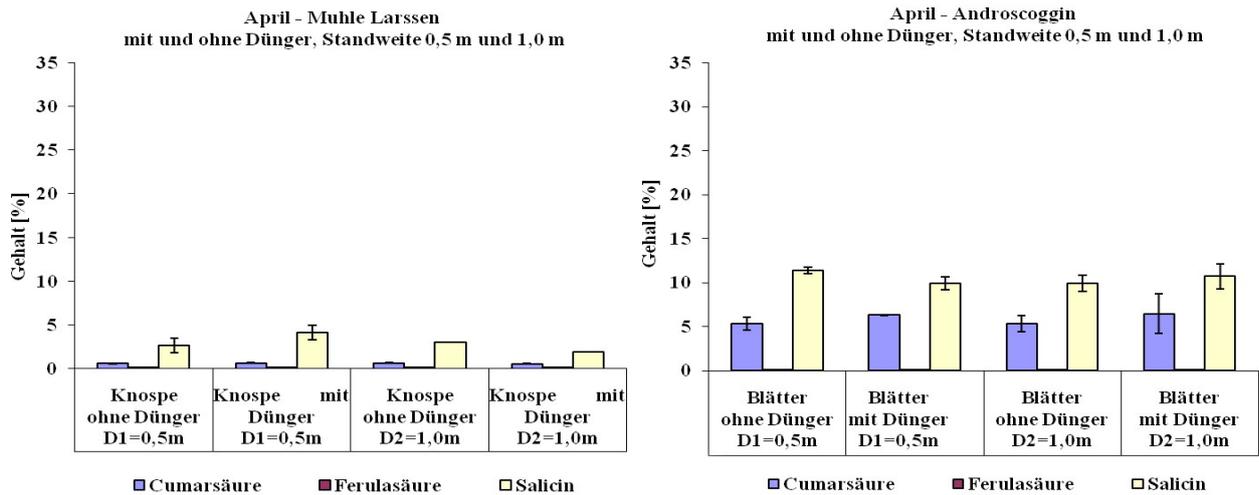


Abb. 19: Darstellung der Inhaltsstoffe in den Knospen der Pappel *Muhle-Larsen* (links) und den Blättern der Pappel *Androscoggin* (rechts) im April

Tab. 4: Darstellung der prozentualen Gehalte in den Knospen der Pappel *Muhle-Larsen* (links) und den Blättern der Pappel *Androscoggin* (rechts) im April

Sub.	D1, ohne Dünger	D1, mit Dünger	D2, ohne Dünger	D2, mit Dünger	Sub.	D1, ohne Dünger	D1, mit Dünger	D2, ohne Dünger	D2, mit Dünger
C.	0,587	0,649	0,647	0,561	C.	5,361	6,32	5,347	6,459
S.	2,644	4,169	3,037	1,912	S.	11,393	9,937	9,917	10,714
F.	0,116	0,164	0,151	0,129	F.	0,119	0,111	0,125	0,116

Sub.: Substanz, D.: Standweite (m), C.: Cumarsäure, S.: Salicin, F.: Ferulasäure

Im Vergleich der Substanzen aus den Knospen der Pappel *Muhle-Larsen* mit den Blättern der Pappel *Androscoggin* zeigen die Blätter ein deutlich höheres Maß an p-Cumarsäure und Salicin. Die Standweite und der Düngerzusatz haben keinen wesentlichen Einfluss auf den Gehalt der Inhaltsstoffe.

In der Abb. 20 und der Tab. 5 sind die Inhaltsstoffe der Knospen der Pappelsorte *Muhle-Larsen* im März und April dargestellt.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

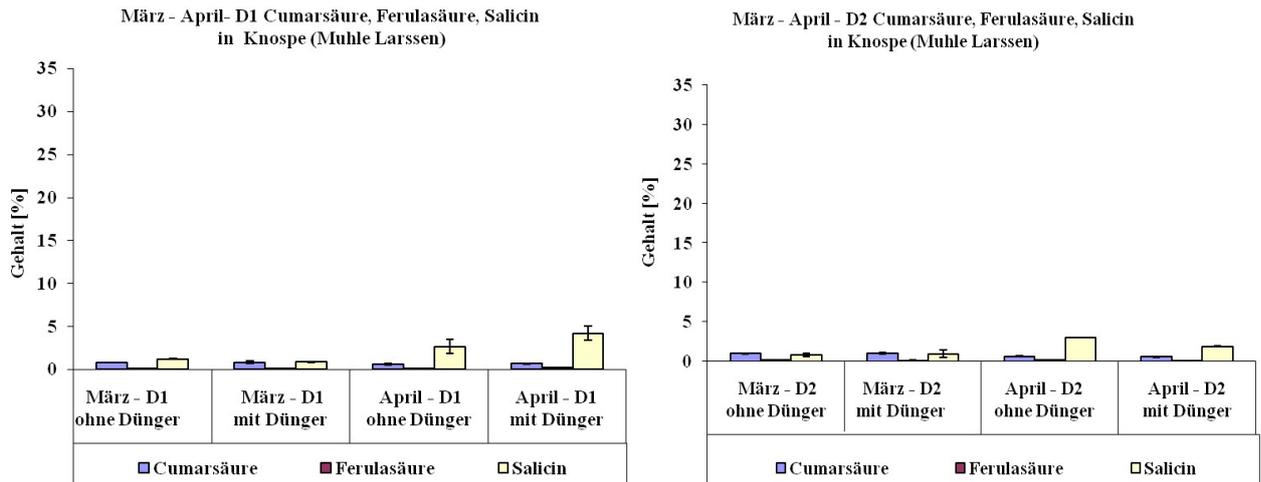


Abb. 20: Darstellung der Inhaltsstoffe der Knospen der Pappel *Muhle-Larsen* im März und April

Tab. 5: Darstellung der prozentualen Gehalte in den Knospen der Pappel *Muhle-Larsen* im März und April

Sub .	D1, ohne Dünger	D1, mit Dünger	D2, ohne Dünger	D2, mit Dünger	Sub .	D1, ohne Dünger	D1, mit Dünger	D2, ohne Dünger	D2, mit Dünger
C.	0,775	0,81	0,587	0,649	C.	0,981	0,999	0,647	0,561
S.	1,191	0,864	2,644	4,169	S.	0,778	0,971	3,037	1,912
F.	0,121	0,125	0,116	0,164	F.	0,14	0,137	0,151	0,129

Sub.: Substanz, D.: Standweite (m), C.: Cumarsäure, S.: Salicin, F.: Ferulasäure

Im April ist unter Einsatz von Düngung der Salicingehalt mit ca. 4 % am höchsten. Die Standweiten und der Düngerzusatz beeinflussen den Gehalt der Inhaltsstoffe nicht wesentlich.

Bei der Pappelsorte *Androscoffin* wurden, wie in Abb. 21 und Tab. 6 ersichtlich, die Knospen vom März mit den Blättern vom April verglichen, da die Knospen im April bei dieser Pappelsorte nicht mehr vorhanden waren.

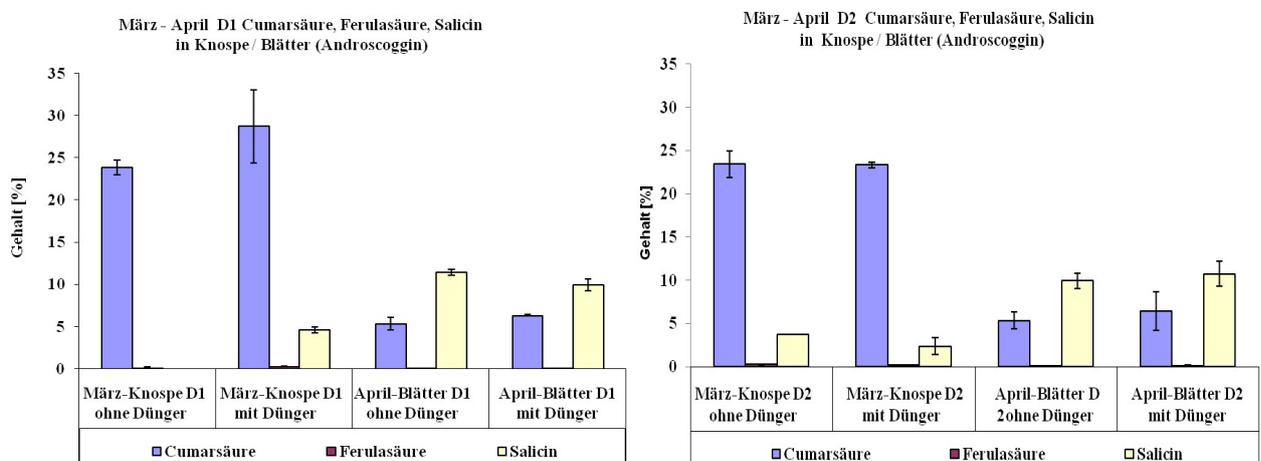


Abb. 21: Darstellung der Inhaltsstoffe in den Knospen im März und in den Blättern im April der Pappel *Androscoffin*

Tab. 6: Darstellung der prozentualen Gehalte in den Knospen und Blättern der Pappel *Androscoogin* im März und April

Sub .	D1, ohne Dünger	D1, mit Dünger	D1, ohne Dünger	D1, mit Dünger	Sub .	D2, ohne Dünger	D2, mit Dünger	D2, ohne Dünger	D2, mit Dünger
C.	23,847	28,682	5,361	6,32	C.	23,413	23,296	5,347	6,459
S.	0	4,601	11,393	9,937	S.	3,726	2,372	9,917	10,714
F.	0,129	0,252	0,119	0,111	F.	0,237	0,178	0,125	0,116

Sub.: Substanz, D.: Standweite (m), C.: Cumarsäure, S.: Salicin, F.: Ferulasäure

Im Gegensatz zu den Blättern zeigen die Knospen einen deutlich höheren Gehalt an Cumarsäure. Im März ist Salicin ohne Dünger bei einer Standweite von 0,5 m in den Knospen nicht nachweisbar, mit Dünger jedoch zu ca. 5 %. In den Blättern im April liegt der Salicingehalt bei ca. 10 %. Auch in diesem Zusammenhang ergeben die Standweiten und der Düngerzusatz sowohl im März als auch im April keinen großen Unterschied in Bezug auf die Inhaltsstoffe.

### Die Rinde der Pappeln *Muhle-Larsen* und *Androscoogin*

Die Analyse der Markersubstanzen aus der Rinde erfolgte nach der Hydrolyse des Lyophilisates beider Pappelsorten (*Muhle-Larsen* und *Androscoogin*). Untersucht wurde der Einfluss folgender Parameter auf den Gehalt der Inhaltsstoffe: *Zeit*, *Standweiten* und *Dünger*. Diese werden in Abb. 22 dargestellt. Die dazugehörigen prozentualen Gehalte im Monat März sind der Tab. 7 zu entnehmen.

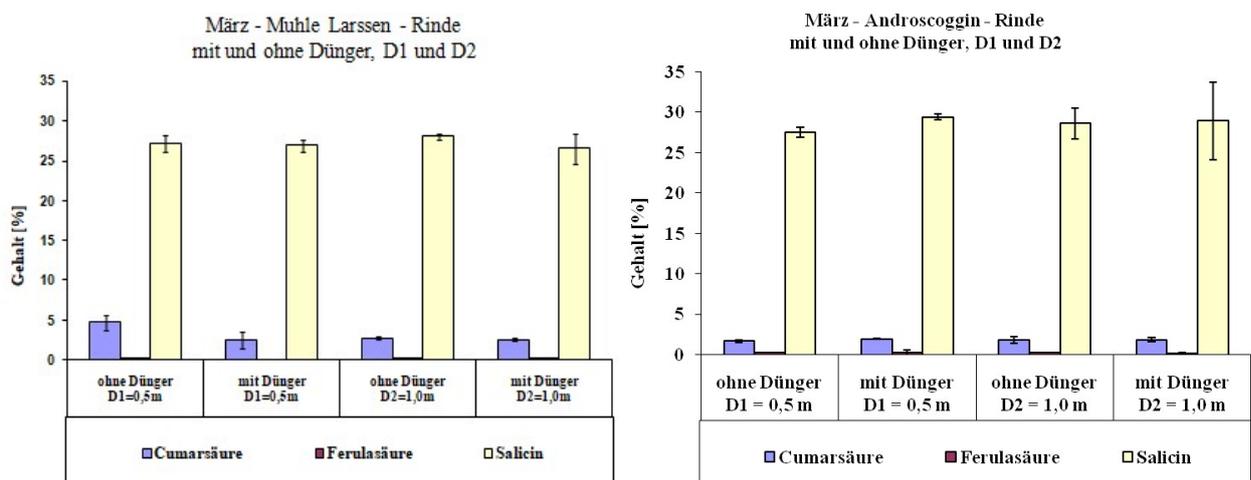


Abb. 22: Darstellung der Inhaltsstoffe in der Rinde der Pappeln *Muhle-Larsen* (links) und *Androscoogin* (rechts) im März

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Tab. 7: Darstellung der prozentualen Gehalte in der Rinde der Pappeln *Muhle-Larsen* (links) und *Androscoggin* (rechts) im März

Sub.	D1, ohne Dünger	D1, mit Dünger	D2, ohne Dünger	D2, mit Dünger	Sub.	D1, ohne Dünger	D1, mit Dünger	D2, ohne Dünger	D2, mit Dünger
C.	4,731	2,543	2,751	2,573	C.	1,683	1,98	1,856	1,860
S.	27,069	26,868	28,03	26,542	S.	27,504	29,421	28,624	28,962
F.	0,208	0,098	0,13	0,150	F.	0,25	0,275	0,281	0,212

Sub.: Substanz, D.: Standweite (m), C.: Cumarsäure, S.: Salicin, F.: Ferulasäure

Der Salicingehalt in der Rinde ist mit ca. 30 % signifikant höher als in den Knospen beider P.-Arten. Die Standweiten und der Düngerzusatz in beiden Sorten weisen keinen erheblichen Unterschied auf. Im April ist eine Zunahme des Salicingehalts von ca. 5 % in der Pappel *Androscoggin* zu verzeichnen, die in der Abb. 23 und der dazugehörigen Tab. 8 ersichtlich ist.

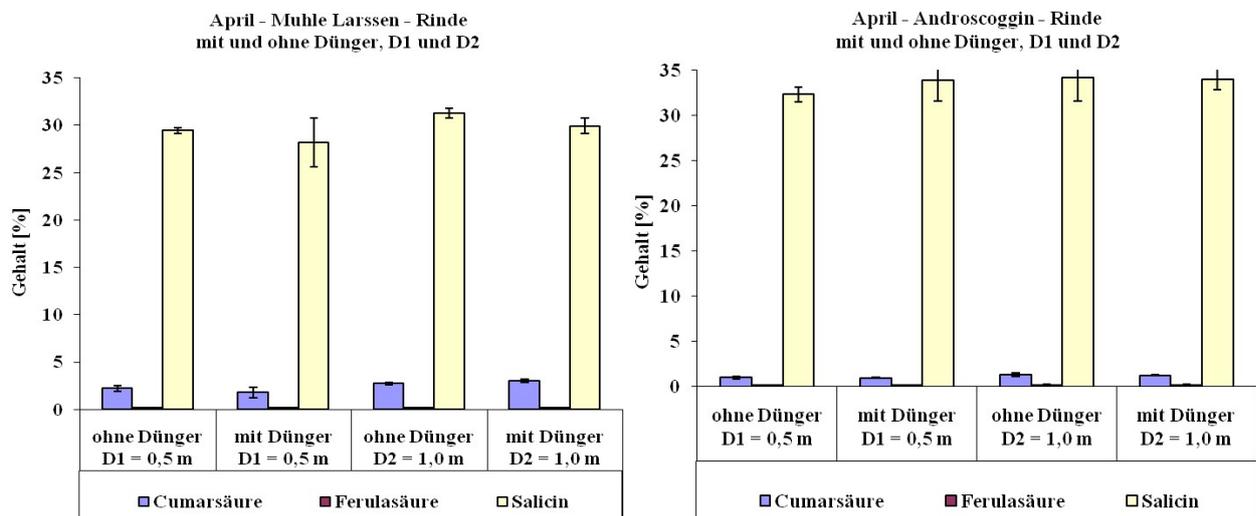


Abb. 23: Darstellung der Inhaltsstoffe in der Rinde der Pappeln *Muhle-Larsen* (links) und *Androscoggin* (rechts) im April

Tab. 8: Darstellung der prozentualen Gehalte in der Rinde der Pappeln *Muhle-Larsen* (links) und *Androscoggin* (rechts) im April

Sub.	D1, ohne Dünger	D1, mit Dünger	D2, ohne Dünger	D2, mit Dünger	Sub.	D1, ohne Dünger	D1, mit Dünger	D2, ohne Dünger	D2, mit Dünger
C.	2,204	1,82	2,743	3,001	C.	1,038	1,003	1,335	1,295
S.	29,478	28,191	31,273	29,937	S.	32,317	33,868	34,17	34,034
F.	0,182	0,184	0,17	0,185	F.	0,204	0,212	0,232	0,228

Sub.: Substanz, D.: Standweite (m), C.: Cumarsäure, S.: Salicin, F.: Ferulasäure

Auch bei dieser Messung beeinflussen die Faktoren *Standweite* und *Düngerzusatz* nicht den Gehalt der Inhaltsstoffe.

Beim Vergleich beider Erntezeiten der Pappel *Muhle-Larsen* (siehe Abb. 24 und Tab. 9) ergeben die Standweiten und der Düngerzusatz erneut keine Änderungen in Bezug auf den Gehalt der Inhaltsstoffe.

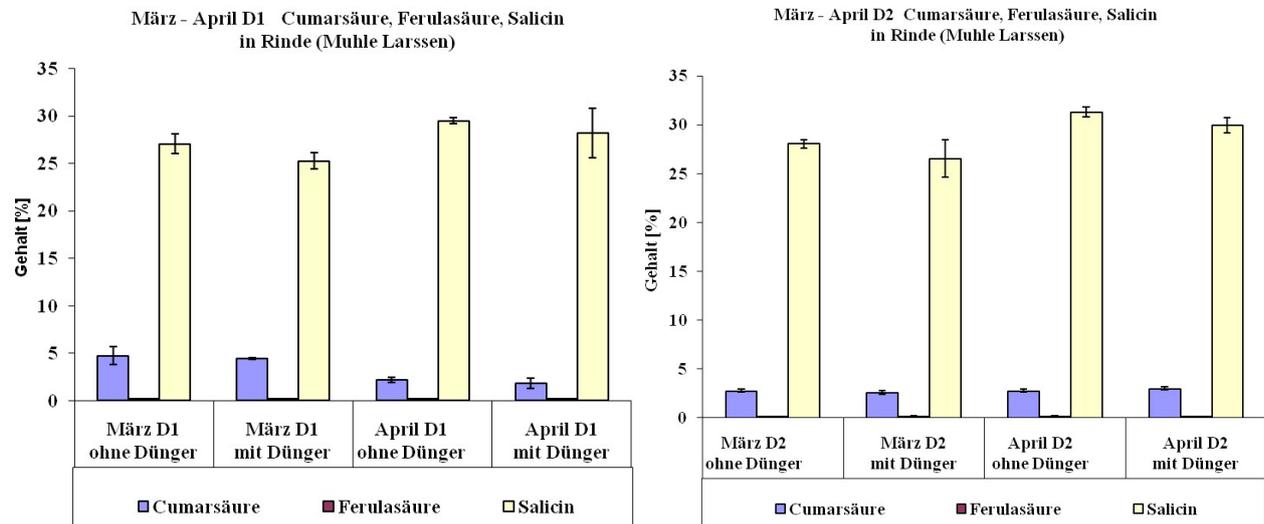


Abb. 24: Darstellung der Rinde der Pappel *Muhle-Larsen* im März und April

Tab. 9: Darstellung der prozentualen Gehalte in der Rinde der Pappel *Muhle-Larsen* im März und April

Sub.	D1, ohne Dünger	D1, mit Dünger	D1, ohne Dünger	D1, mit Dünger	Sub.	D2, ohne Dünger	D2, mit Dünger	D2, ohne Dünger	D2, mit Dünger
C.	4,731	4,422	2,204	1,820	C.	2,751	2,573	2,743	3,001
S.	27,069	25,297	29,478	28,191	S.	28,035	26,542	31,273	29,937
F.	0,208	0,169	0,182	0,184	F.	0,13	0,15	0,17	0,185

Sub.: Substanz, D.: Standweite (m), C.: Cumarsäure, S.: Salicin, F.: Ferulasäure

Der höchste Salicingehalt von ca. 30 % wird im April ohne Dünger bei einer Standweite von 1,0 m erreicht. P-Cumarsäure zeigt mit ca. 5 % im März ohne Dünger bei einer Standweite von 0,5 m den höchsten Gehalt.

In Abb. 25 und Tab. 10 sind hinsichtlich der Untersuchungskriterien in beiden Monaten bei der Pappel *Androscoffin* ebenfalls keine wesentlichen Effekte nachweisbar.

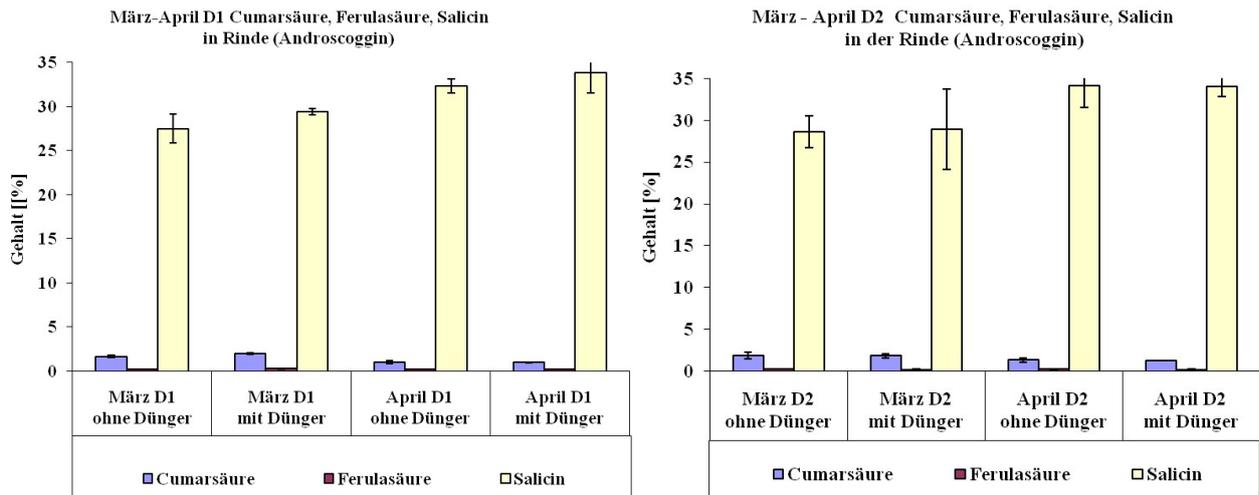


Abb. 25: Darstellung der Inhaltsstoffe in der Rinde der Pappel *Androscoggin* im März und April

Tab. 10: Darstellung der prozentualen Gehalte in der Rinde von Pappel- *Androscoggin* im März und April

Sub.	D1, ohne Dünger	D1, mit Dünger	D1, ohne Dünger	D1, mit Dünger	Sub.	D2, ohne Dünger	D2, mit Dünger	D2, ohne Dünger	D2, mit Dünger
C.	1,683	1,98	1,038	1,003	C.	1,856	1,86	1,335	1,295
S.	27,504	29,421	32,317	33,868	S.	28,624	28,962	34,17	34,034
F.	0,25	0,275	0,204	0,212	F.	0,281	0,212	0,232	0,228

Sub.: Substanz, D.: Standweite (m), C.: Cumarsäure, S.: Salicin, F.: Ferulasäure

Der höchste Anteil an Salicin wird im April mit Dünger und einer Standweite von 0,5 m mit ca. 35 % erreicht.

#### 3.2.2 Die Knospen und die Rinde der Pappel *Max 5*

Für die Auswertung der Pappel *Max 5* wurden jeweils vier Proben von den Knospen und der Rinde entnommen. Bei der Pappel *Max 5* beeinflussen die Faktoren Standweite und Düngerzusatz den Gehalt der Inhaltsstoffe nicht. Die Abb. 26 und die Tab. 11 zeigen, dass Ende März der höchste Gehalt an Salicin in den Knospen zu verzeichnen ist, während sich jener in der Rinde kaum verändert.

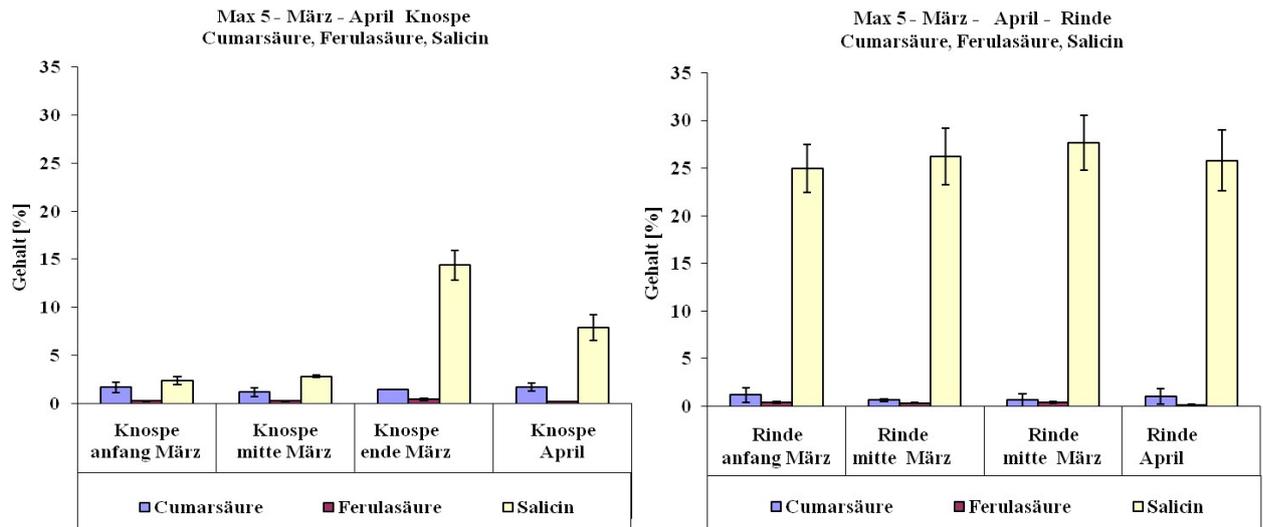


Abb. 26: Darstellung der Inhaltsstoffe (Knospe (links), Rinde (rechts)) von *Max 5* im März und April

Tab. 11: Darstellung der prozentualen Gehalte der *Max 5*, (Knospe (links), Rinde (rechts))

Sub	Knosp Anfang März	Knospe Mitte März	Knospe Ende März	Knospe April	Sub	Rinde Anfang März	Rinde Mitte März	Rinde Ende März	Rinde April
C.	1,706	1,209	1,49	1,751	C.	1,206	0,674	0,674	1,087
S.	2,383	2,84	14,417	7,898	S.	24,991	26,24	27,664	25,83
F.	0,273	0,289	0,458	0,243	F.	0,459	0,384	0,474	0,21

Sub.: Substanz, D.: Standweite (m), C.: Cumarsäure, S.: Salicin, F.: Ferulasäure

Die Pappelsorte *Max 5* hat einen hohen Anteil an Salicin, ca. 30 % davon sind in der Rinde nachweisbar. p-Cumarsäure ist in den Knospen lediglich zu ca. 2 % vertreten und in der Rinde mit noch weniger Gehalt.

Im Allgemeinen lässt sich schlussfolgern, dass weder die Standweiten noch der Düngerzusatz einen signifikanten Einfluss auf den Gehalt der Inhaltsstoffe der Pappelpflanzen haben. Die Pappel *Androscoggin* zeigt den höchsten Gehalt der Inhaltsstoffe. In den Knospen der Pflanze wurden im März ca. 30 % p-Cumarsäure nachgewiesen, in den Blättern im April ca. 11 % Salicin. In der Rinde der Pappel *Androscoggin* wurde der höchste Salicingehalt mit ca. 35 % festgestellt. Die Untersuchungen zeigen, dass die Konzentration der Inhaltsstoffe im März und Anfang April am höchsten ist. Somit sind diese Monate als optimale Erntezeitpunkte zu betrachten.

### 3.3 Analytische Ergebnisse

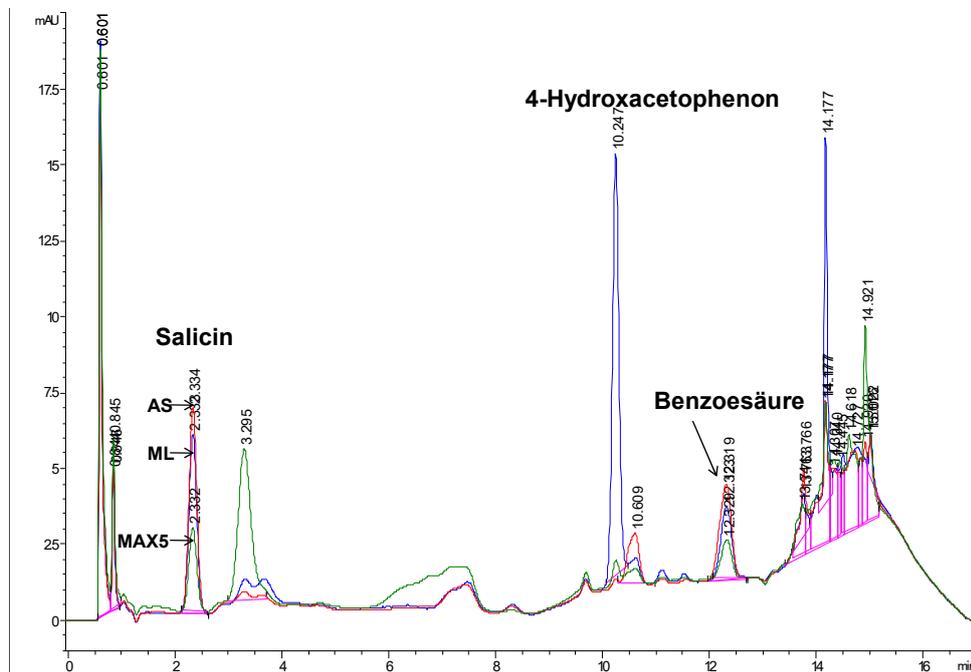
#### 3.3.1 Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie (HPLC-DAD-MS)

##### 3.3.1.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Um die Inhaltsstoffe der Pappel zu identifizieren und anschließend aus diesem Substanz-Pool mögliche Leitsubstanzen festzulegen, müssen die Inhaltsstoffe zunächst aufgetrennt werden. Mit Hilfe einer Referenzmischung der in der Literatur angeführten und kommerziell erhältlichen Substanzen wurde die Trennung optimiert. Die Auswahl der Substanzen wurde unter Berücksichtigung der zu erwartenden pharmakologischen Eigenschaften getroffen.

Um eine Reduzierung der Inhaltsstoffe auf die wesentlichen Phenolglycoside und Phenolsäuren bzw. Flavonoid-Aglyca zu garantieren und damit die Trennung zu vereinfachen, wurde der Extrakt basisch hydrolysiert, was in Kapitel 2.3.5 beschrieben wurde.

Die Hauptpeaks (siehe Abb. 27 und 28) in den Extrakten, Salicin und p-Cumarsäure, dienen künftig als Markersubstanzen.



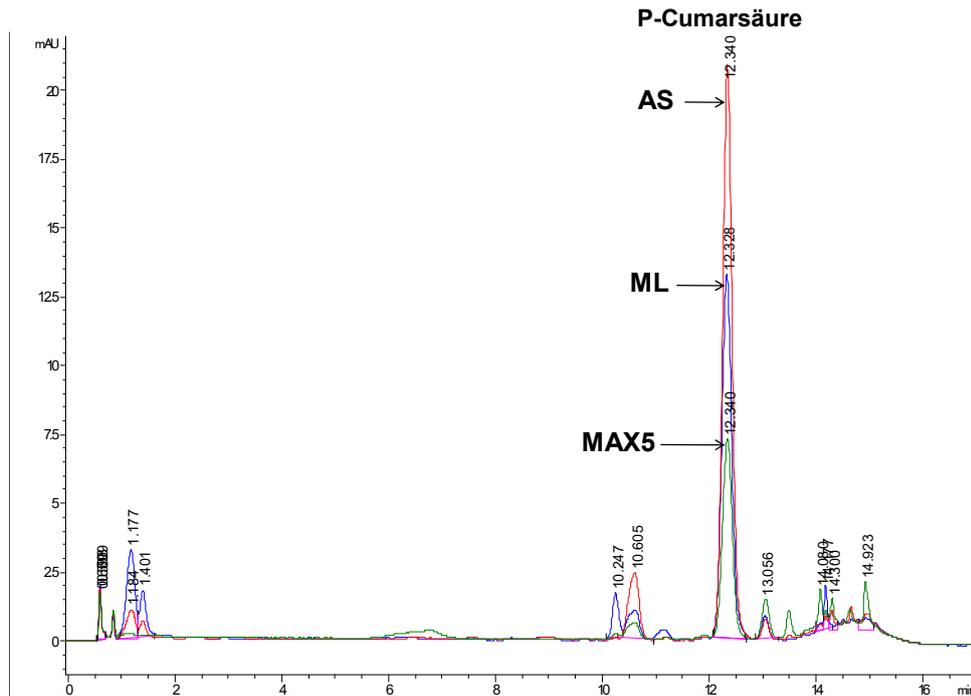
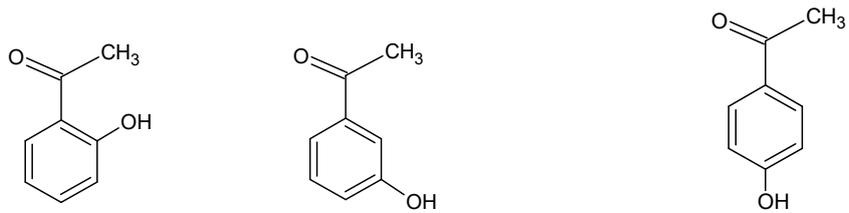


Abb. 28: Chromatogramm der hydrolysierten Extrakte,  $\lambda = 310 \text{ nm}$

AS: Sorte *Androskoggin*, ML: Sorte *Muhle-Larsen*, MAX5: Sorte *Max 5*

In der Abb. 27 weist *Muhle-Larsen* einen Peak auf, der auf die Untersuchungen der einzelnen Pflanzenteile der Sorte aus der Knospe zurückzuführen ist. Es konnte anhand der Kombination aus drei verschiedenen analytischen Methoden (HPLC/UV, HPLC/MS und GC/MS) die Identität des unbekanntes Stoffes – 4-Hydroxyacetophenon – eindeutig aufgeklärt werden. Dafür wurden 6 g Knospen der *Muhle-Larsen* (*P. trichocarpa*) mit 84 ml 70%-igem EtOH für 24 Stunden extrahiert, der Überstand filtriert und mittels Vakuumdestillation in einer Falcon-Tube bis zur Trocknung eingengt.

Analog die Probenvorbereitung wurde der trockene Extrakt behandelt. Es konnte mittels HPLC/MS eine Masse von 136 g/mol ermittelt werden. Die Identität und der strukturelle Aufbau des Hydroxyacetophenons wurden mit Hilfe der in der GC/MS Software enthaltenen Spektrenbibliotheken des Instituts für pharmazeutische Biotechnologie ermittelt. Allerdings konnte nicht eindeutig zugeordnet werden, ob es sich um 2-, 3- oder 4-Hydroxyacetophenone handelt, die sich nicht in ihrer molaren Masse, sondern lediglich in der Stellung der Hydroxygruppen unterscheiden.



A: 2-Hydroxyacetophenon

B: 4-Hydroxyacetophenon

C: 3-Hydroxyacetophenon

Abb. 29: Chemischen Strukturen des ortho-, meta- und para-Hydroxyacetophenons

A: 2-Hydroxyacetophenon, B: 4-Hydroxyacetophenon, C: 3-Hydroxyacetophenon

Hierfür wurden Lösungen der drei Standardsubstanzen von 2-, 3- und 4-Hydroxyacetophenone in MeOH hergestellt und gemessen (siehe Chromatogramme im Anhang). Hierbei stellte sich aufgrund des Vergleichs der Retentionszeiten und der UV-Spektren heraus, dass es sich um das 4-Hydroxyacetophenon handelte.

Die Abb. 30 zeigt eine Kombination aus drei verschiedenen Chromatogrammen (alle werden bei einer Wellenlänge von 275 nm dargestellt):

- A: Bildet den Lauf des Chromatogramms der Referenzsubstanz 4-Hydroxyacetophenon ab.
- B: Hier ist der Verlauf des Knospenextrakts in Form eines Chromatogramms zu sehen.
- C: Stellt das Chromatogramm einer Mischung aus dem Knospenextrakt und dem 4-Hydroxyacetophenon dar.

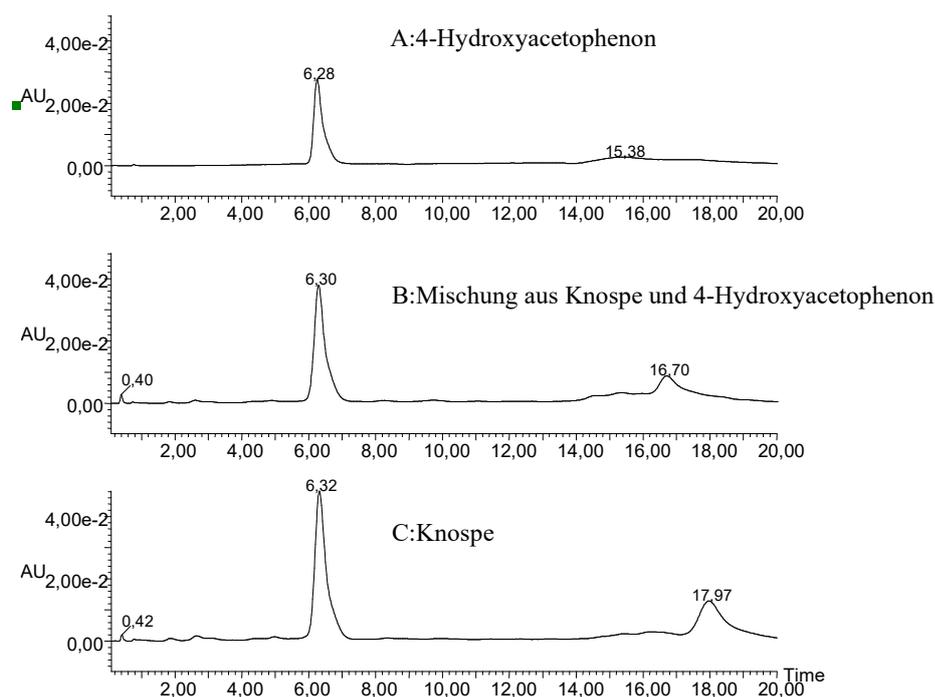


Abb. 30: Chromatogramm der Referenzsubstanz 4-Hydroxyacetophenon in Kombination mit dem Knospenextrakt  
A: 4-Hydroxyacetophenon, B: Mischung aus Knospe und 4-Hydroxyacetophenon, C: Knospe

Mit Hilfe der HPLC konnte das Isoform der Hydroxyacetophenone bestimmt werden (Piceol).

Die in der GC-/MS-Software enthaltene Spektrenbibliotheken und in die Ergebnisse der Literaturrecherche (43) bestätigten, dass 4-Hydroxyacetophenon ein Bestandteil von *P. trichocarpa* ist.

#### 3.3.1.1.1 Identifizierung der Markersubstanzen mittels Massenspektrometrie (LC/MS).

In vielen Fällen ist die Identifizierung der mittels HPLC aufgenommenen Peaks durch Vergleich mit Referenzsubstanzen oder durch Aufnahme des UV-Spektrums zur absolut sicheren Identifikation eines Analyten nicht ausreichend. Zur Bestätigung der Markersubstanzen wurde das HPLC-System mit einem MS gekoppelt.

Die Identität der jeweiligen Substanzen wurde durch deren MS und Tandem-MS eindeutig sichergestellt. Zunächst wurde ein MS-Fullscan im Massenbereich ( $m/z$ -Wert) von 50 bis 1000 mit negativer und positiver Polarität der Reinsubstanzen durchgeführt und deren Daten wurden aufgenommen. Durch die Wahl der Polarität (Positiv- oder Negativ-Modus) werden unterschiedliche Fragmente geliefert. Mit Hilfe eines Splitters lassen sich Konzentration und Flow ideal einstellen. Die Konzentration der Referenzsubstanzen sollte 20  $\mu\text{m}/\text{ml}$  und der Flow 0,5

### 3 Ergebnisse und Diskussion

ml/min nicht überschreiten. Die Messung kann mit oder ohne UV-Kontrolle erfolgen, wobei deren Anwendung empfohlen wird. Die Identität der jeweiligen Substanzen wurde durch deren MS und Tandem-MS eindeutig bestätigt.

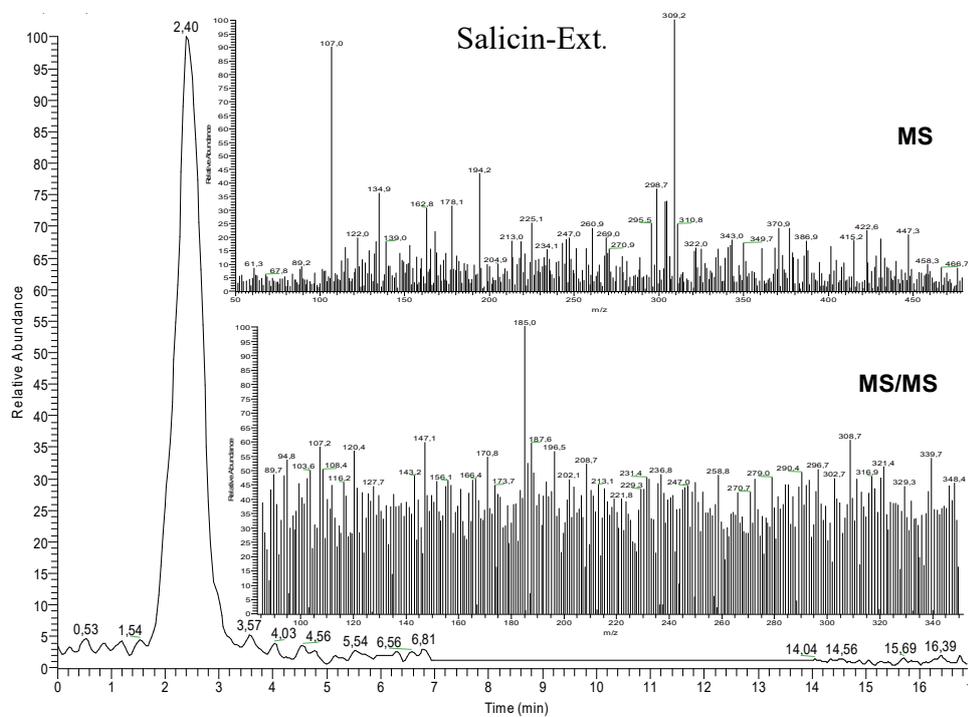
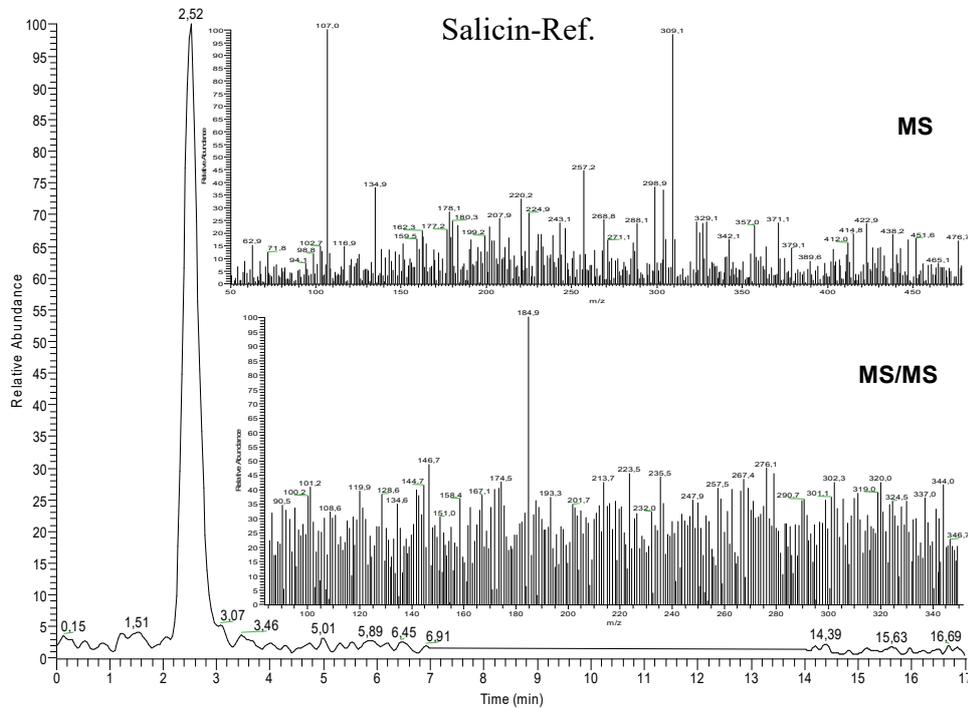


Abb. 31: Vergleich der positiven (Tandem-)MS von der Standardsubstanz (1A) und Salicin aus dem Pappel-Extrakt (2A)

### 3 Ergebnisse und Diskussion

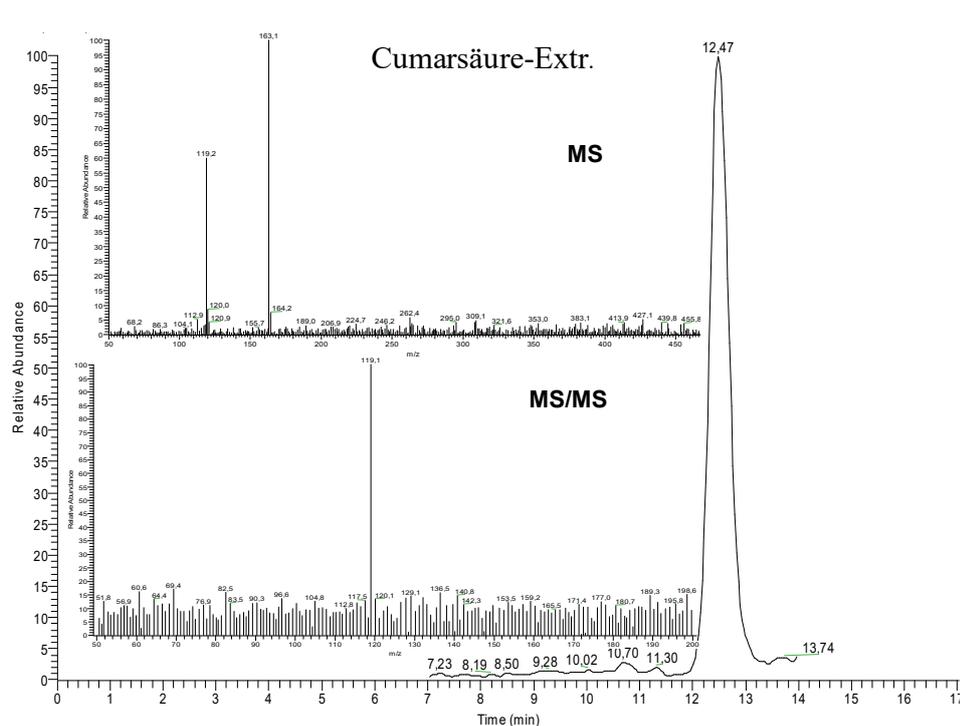
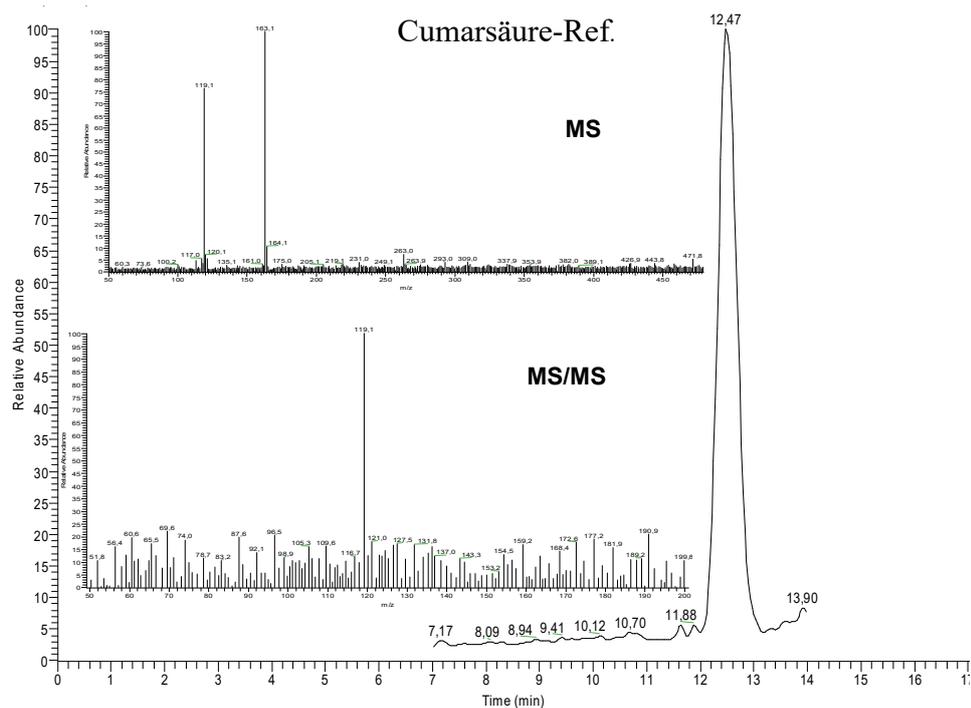


Abb. 32: Vergleich der negativen (Tandem-)MS von der Standardsubstanz (1B) und der Cumarsäure aus dem Pappel-Extrakt (2B)

Wie die obigen Abb. 31 und 32 verdeutlichen, werden für die im Extrakt identifizierten Substanzen die Masse-Ladungs-Verhältnisse in MS aufgenommen. Bei der Messung der Standardsubstanzen war Cumarsäure im negativen Modus und Salicin im positiven Modus zu detektieren. Ein Vergleich der Tandem-MS aus dem Extrakt mit dem Tandem-MS der Reinsubstanzen beweist eindeutig, dass es sich um die zwei genannten Substanzen handelt.

### 3.3.2 Kapillarelektrophorese (CE)

Die Extrakte wurden mittels CE untersucht, um mit Hilfe einer weiteren Methode die HPLC-Ergebnisse zu bestätigen sowie gleichzeitig neue Substanzen zu erfassen und zu definieren. Eine optimale CE- Messung kann bis 10 Min. dauern. Für Pflanzenextrakte, die als Stoffgemische vorliegen, wird eine längere Laufzeit empfohlen. Im Rahmen der Vorversuche wurden die drei Pappelsorten untersucht, um eine Aussage hinsichtlich der optimalen Messbedingungen zu treffen.

Die analytischen Ergebnisse zeigen, dass die Pappelsorte *Androscoggin* den höchsten Gehalt an Markersubstanzen (Salicin und p-Cumarsäure) aufweist, daher wurden mit dieser die CE-Untersuchungen durchgeführt. Die Probenvorbereitung für die CE-Untersuchungen wird in Kapitel 2.8.1.7 beschrieben.

#### 3.3.2.1 Identifizierung der Inhaltsstoffe im unhydrolysierten Extrakt mittels CE/UV

Es wurde systematisch die Trennung der Inhaltsstoffe des unhydrolysierten Extraktes in Abhängigkeit vom pH-Wert, der Pufferkonzentration, dem Zusatz organischer Solventien sowie dem Zusatz von Mizellbildnern wie SDS untersucht. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass keine befriedigende Trennung des unhydrolysierten Extraktes erreicht werden konnte. Allerdings konnten Salicin, Zimtsäure, Ferulasäure, p-Cumarsäure und Benzoessäure anhand von Spektren, Laufzeit sowie eine Peakvergrößerung nach Referenzzugabe identifiziert werden.

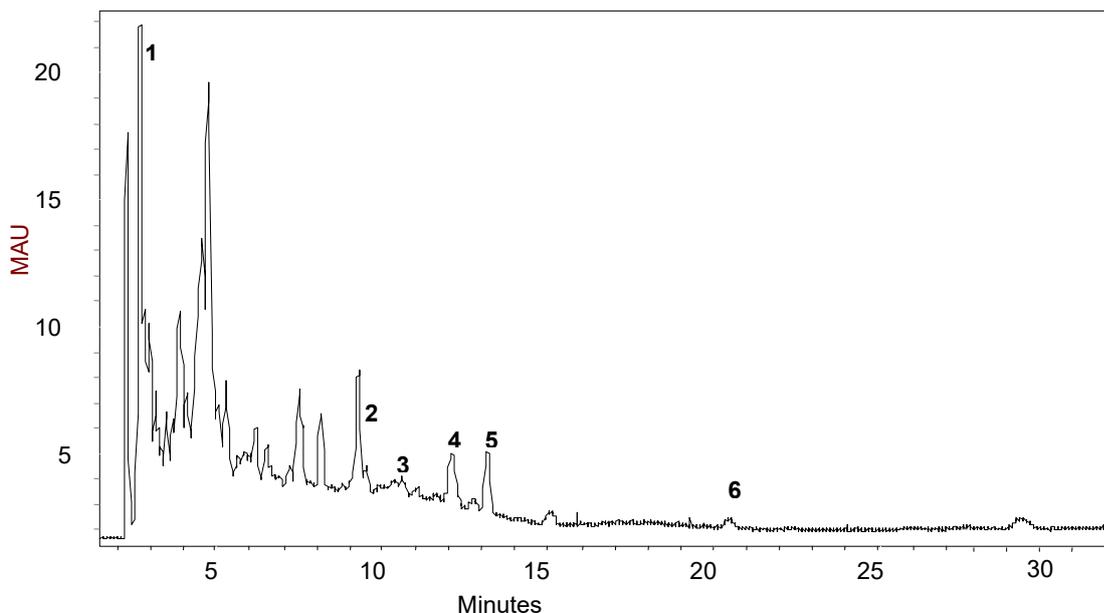


Abb. 33: CE-Elektropherogramm, P.-Extrakt (Androscoggin) 5 mg/ml, 20 kV, Puffer: pH-Wert: 9, 151 mM Borat, 25 mM SDS

1: Salicin, 2: Zimtsäure (Nebenpeak), 3: Ferulasäure, 4: p-Cumarsäure, 5: Benzoessäure, 6: Kaffeesäure

### 3.3.2.2 Identifizierung der Inhaltsstoffe im hydrolysierten Extrakt mittels CE/UV

Die Hauptpeaks nach Hydrolyse wurden zunächst mittels Spektren und Laufzeit identifiziert. Eine Peakvergrößerung gilt nach Referenzzugabe als Identifizierungskriterium.

Salicin, Ferulasäure, Cumarsäure und Kaffeesäure waren bei einem pH-Wert von 9 einfacher zu detektieren. In den Elektropherogrammen wurden dem Extrakt Ferulasäure (A), Cumarsäure (B), Kaffeesäure (C) und Salicin (D) als Referenzen zugegeben. In den nachstehenden Elektropherogrammen sind die Ergebnisse der untersuchten Pappelsorte (zu gleichen Teilen gemischt) abgebildet (siehe Abb. 34).

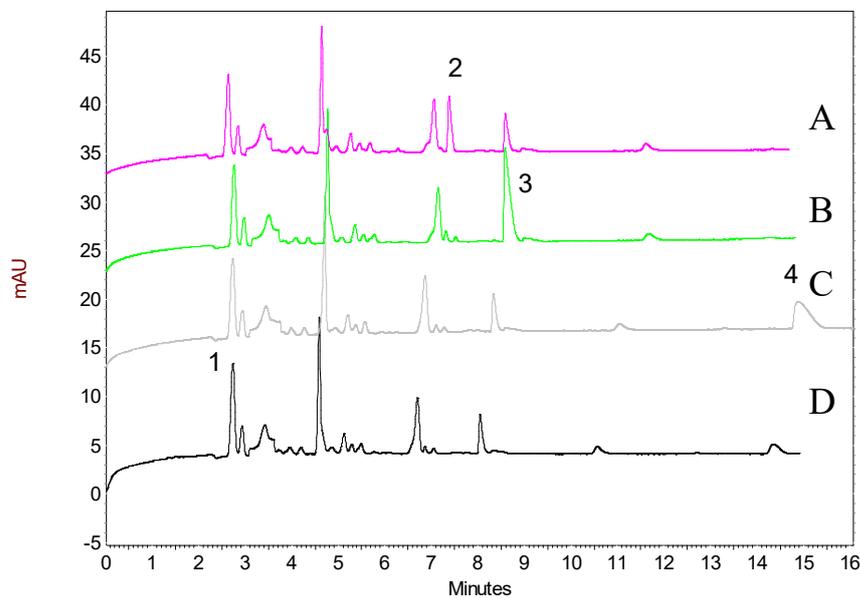


Abb. 34: CE- Elektropherogramm,  $\lambda=200$  nm, 171 mM Boratpuffer mit 25 mM SDS, Puffer: pH-Wert 9, N = 3, 1: Salicin, 2: Ferulasäure, 3: Cumarsäure, 4: Kaffeesäure.

A: Zusatz von Ferulasäure Rf, B: Zusatz von Cumarsäure Rf, C: Zusatz von Kaffeesäure Rf, D: Zusatz von Salicin Rf.

Die Benzoessäure und Zimtsäure waren bei einem pH-Wert von 9,2 besser zu detektieren. Im ersten Elektropherogramm wurde dem Extrakt Benzoessäure und Zimtsäure als Referenz zugegeben, das zweite (F) zeigt die reine Extraktmessung (siehe Abb. 35).

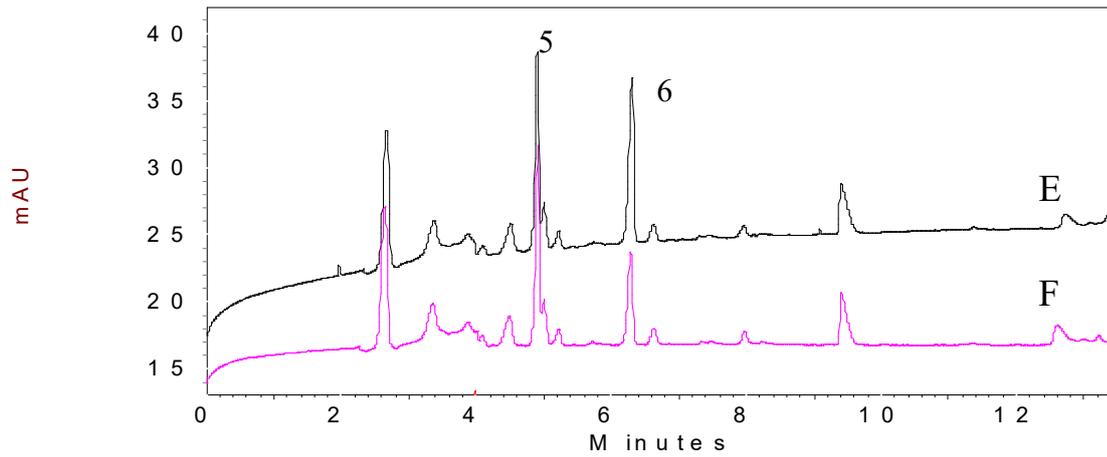


Abb. 35: CE-Elektropherogramm,  $\lambda = 200$  nm, 171 mM Boratpuffer mit 25 mM SDS, Puffer: pH-Wert 9,5, N=3

(E): Zusatz von Zimtsäure (5) und Benzoesäure (6) Referenzen zum Extrakt

(F): Zimtsäure (5) und Benzoesäure (6) im Extrakt ohne Referenzzugabe

## **4 Galenik**

### **4.1 Hygroskopizität**

Native Trockenextrakte sind häufig hygroskopisch. Aufgrund ihrer Hygroskopizität zeigen sie eine negative physikalische Stabilität. Diese haben Auswirkungen auf die galenische Verarbeitbarkeit (Verklumpung verbunden mit einer langsameren Auflösung in Vehikeln) (69). Der Zusatz von inerten Hilfsstoffen, wie hochdisperses Siliziumdioxid, Lactose, Stärke, Saccharose oder Maltodextrin, erwies sich bei der Weiterverarbeitung als nützlich (70, 71). In Bezug auf den Pappel-Extrakt birgt der Zusatz von inerten Hilfsstoffen sowie deren Gemisch keinen Vorteil und führte zudem zur Störung der analytischen Messungen. Der Pappel-Extrakt wurde unter Vakuum im Exsikkator bei niedriger Temperatur aufbewahrt.

### **4.2 Löslichkeitsuntersuchungen**

Zur Voruntersuchung wurde die Löslichkeit des Lyophilisates in verschiedenen Hilfsstoffen, wie z. B. Ölsäure, Propylenglycol, Pentylenglycol, Glycerol (85 % und 95,5 %), Lavendelöl sowie Polyethylenglycol (PEG) 400, überprüft. Das Ziel bestand darin, Formulierungen mit 1 % Extrakt herzustellen, daher wurde versucht, 1 bis 5 % Extrakt in die jeweiligen Hilfsstoffe einzuarbeiten (die Löslichkeit wurde nach visueller Beurteilung der Niederschlagsgröße ermittelt).

In Pentylenglycol und Propylenglycol ist der Extrakt bis zu 5 % vollständig gelöst, weshalb für die weiteren Experimente Pentylenglycol bzw. Propylenglycol als Lösungsmittel gewählt wurden. Nach Beurteilung der Lösung mit Propylenglycol war nach vier Tagen allerdings in dem 3-, 4- und 5-%-igen Extrakt ein geringfügiger Niederschlag zu beobachten.

Darüber hinaus wurde die Löslichkeit in Dodecanol und Glycerol untersucht, um einen Hinweis auf einen geeigneten Akzeptor für die Liberationsuntersuchungen zu erhalten. Der Zusatz von Stoffen, die die Löslichkeit verbessern, wie z. B. DMSO oder Pentylenglycol, verbessert die Löslichkeit des Extraktes, führt jedoch zur Trübung und Auskristallisierung bei der Liberationsuntersuchungen.

### **4.3 Stabilität des Extraktes in Abhängigkeit von der relativen Feuchte**

Der Extrakt besitzt eine hohe hygroskopische Eigenschaft. Dadurch werden das Aufbewahren und die Lagerung bei Raumtemperatur (RT) erschwert. Aus diesem Grund wurde der Extrakt bei 22 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit (von 11 % r. F., eingestellt mit Lithiumchlorid, und 57 % r. F.,

eingestellt mit Natriumbromid) über einen Zeitraum von 24 Wochen aufbewahrt, um eine Aussage über die Stabilität der Inhaltsstoffe zu treffen. Der Gehalt an Salicin und Cumarsäure wurde in regelmäßigen Abständen gemessen. Die Ergebnisse lassen sich nicht statistisch auswerten, da die Untersuchungen an jeweils nur einer Probe durchgeführt wurden.

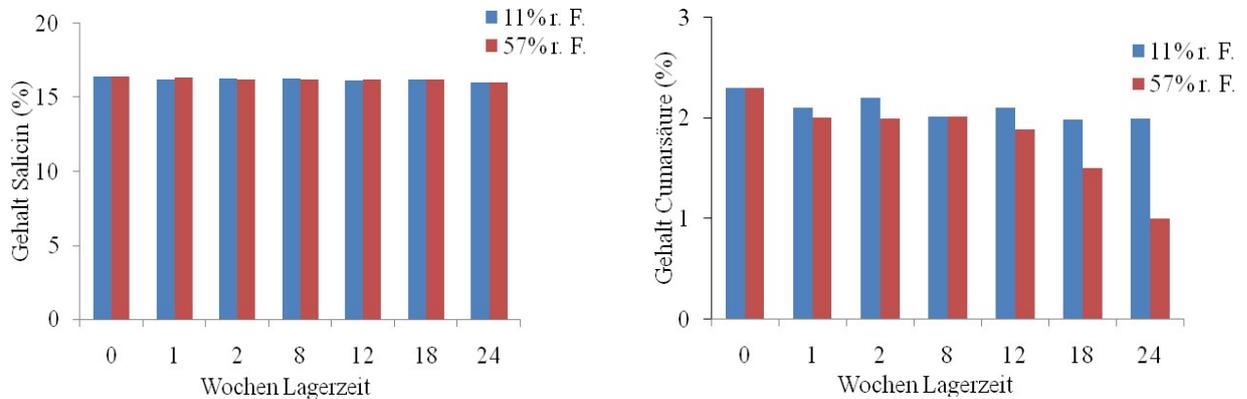


Abb. 36: Stabilität des Extraktes in Abhängigkeit von verschiedenen Luftfeuchten

Der Gehalt an Salicin (links) und Cumarsäure (rechts) wurde jeweils an einer Probe untersucht.

Wie in Abb. 36 ersichtlich, wurde ab der 18. Woche eine Gehaltsabnahme der Cumarsäure registriert.

Allerdings konnte im Allgemeinen festgestellt werden, dass der Feuchtegehalt über längere Zeit nur einen eingeschränkten Einfluss auf die Stabilität des Extraktes hat. Ebenso ist der Einfluss von Luftsauerstoff auf die oxidative Zersetzung der Inhaltsstoffe der Extrakte anzumerken.

Um eine ideale Verarbeitbarkeit und eine niedrige Umgebungsluftfeuchte zu gewährleisten, sollte das Extrakt in Lyophilisatform unter Vakuum im Exsikkator bei niedrigen Temperaturen aufbewahrt werden.

#### 4.4 Auswahl der Extrakte

Es wurden drei Pappelsorten (*Muhle-Larsen*, *Androscoggin* und *Max 5*) in Bezug auf deren Gehalt an Markersubstanzen untersucht. Gleichzeitig wurde die bioaktive Wirkung der Extrakte (antiinflammatorische Aktivität und antioxidative Wirksamkeit) geprüft.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der bioaktiven Wirksamkeit registriert. Die analytischen Ergebnisse zeigen, dass die Pappelsorte *Androscoggin* den höchsten Gehalt an Markersubstanzen (Salicin und p-Cumarsäure) aufweist,

während in der Sorte *Max 5* der niedrigste Gehalt zu finden ist. Mit 1-%-igem Extrakt der Sorte *Androscoggin* wurden die weiteren galenischen Untersuchungen durchgeführt.

## 4.5 Einarbeitung des Extraktes in halbfeste Formulierungen

### 4.5.1 Gelsysteme

Aufgrund der Löslichkeit des Extrakts wurden halbfeste Zubereitungen mit hohem Propylenglycol- bzw. Pentylenglycol-Gehalt gesucht, in die der Extrakt eingearbeitet werden kann. In der Standardrezeptur (siehe Tab. 12) wurde das Propylenglycol durch Pentylenglycol ersetzt. Pentylenglycol besitzt positivere Eigenschaften als Propylenglycol, wie z. B. antimikrobielle Aktivität, bessere Hautverträglichkeit usw.

Da zur Untersuchung der Liberation ein Gel aufgrund der geringeren Störung durch die Hilfsstoffmatrix am vorteilhaftesten ist, wurde darauf das Hauptaugenmerk gelegt. Als Gelbildner in dem *Neue Rezeptur-Formularium (NRF)* wurden Hypromellose 2000, Carbomer/Trometamol sowie Hydroxypropylcellulose 400 verwendet. Für die Herstellung einer halbfesten Formulierung mit Pappel-Extrakt erweisen sich Carbomer bzw. Trometamol als am geeignetsten.

Carbomere sind Polyacrylsäuren mit hohem Molekulargewicht. Erst bei Neutralisation der wässrigen Suspension kommt es zur Gelbildung. Durch die Einwirkung der Base (z. B. Trometamol) wird die Polyacrylsäure deprotoniert, die entlang der Polymerkette entstehenden Ladungen stoßen sich ab und nehmen den größtmöglichen Abstand zueinander ein. Dies führt zu einer starken Entknäuelung der Ketten, die mit einer hohen Wasseraufnahme einhergeht (72).

Tab. 12: Darstellung der Bestandteile der Rezeptur

Bestandteile	Einwaage [g]
Extrakt	0,1
Pentylenglycol/Propylenglycol	2,0
Carbomer	0,1
Trometamol	0,07
Ger. Wasser	ad 10,0

Die Herstellung eines 1- bzw. 2-%-igen Gels konnte ohne Probleme durch Lösen des Lyophilisates im Pentylenglycol erfolgen. Es entstanden sofort homogene hellbraune Gele. Da die Löslichkeit des Extraktes bei ca. 5 % (m/m) in Propylenglycol liegt, ist diese Art der Herstellung bei einem Propylenglycolgehalt von 20 % in der Rezeptur auf 1 % Extraktgehalt beschränkt.

Bei Erhöhung des Extraktanteiles auf 5 % bei gleicher Zusammensetzung der Grundlage wurden unabhängig von der Herstellungstechnologie zwar stets klare, hellbraune homogene Zubereitungen erhalten, diese wiesen allerdings keinen Gelcharakter auf. Nur äußerst wenige Partikel lagen ungelöst vor. Ein hoher Anteil an Extrakt führt demzufolge zur Verflüssigung der Zubereitung.

#### 4.5.2 Mikroemulsionssysteme

Ein überaus interessantes Einsatzgebiet für Mikroemulsionen sind Anwendungen an der Haut. Mikroemulsionen sind moderne kolloidale Arzneistoffträger, deren penetrationsförderndes Potenzial weithin bekannt und akzeptiert ist. Sie zeichnen sich durch ein hohes Solubilisierungsvermögen auch für schwer lösliche Arzneistoffe aus, sind auf einfache Weise herzustellen und thermodynamisch stabil (73-75). Ihre Bildung wurde erstmals im Jahr 1943 von Hoar und Schulman beschrieben (76). Die verwendeten Mikroemulsionen wurden zuvor am Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der MLU entwickelt und weisen eine gute Hautverträglichkeit auf (77, 78). Sie unterscheiden sich sowohl im verwendeten Tensidanteil als auch in der lipophilen Komponente. Es wurde mit folgenden Mikroemulsionen gearbeitet:

Tab. 13: Emulgatorsystem: Tween 80/Span 20 (2:3)

Zusammensetzung W/O ME 1		Zusammensetzung W/O ME 2	
(A)		(B)	
Emulgator	20 %	Emulgator	20 %
Wasser	5 %	Wasser	5 %
IPM = Isopropylmyristat	75 %	IPP = Isopropylpalmitat	75 %

Tab. 14: Emulgatorsystem: Tagat O2/Synperonic PE/L 101 (2:3)

Zusammensetzung O/W ME 1		Zusammensetzung O/W ME 2	
(C)		(D)	
Emulgator	20 %	Emulgator	20 %
IPP = Isopropylpalmitat	5 %	Miglyol 812	5 %
PG/Wasser (2:1)	75 %	PG/Wasser (2:1)	75 %

Die Untersuchung ergab, dass sich das Extrakt in die W/O-Emulsionen vorteilhafter einarbeiten lässt. Bei der O/W-Emulsionen war ein Emulgatorzusatz von 30 % notwendig.

Die Mikroemulsionen waren nach visueller Beurteilung bis zu vier Wochen stabil. Nach dieser Zeit wurde bei den Mikroemulsionstypen (B), (C) und (D) ein überaus geringer, feiner Niederschlag beobachtet. Aus diesem Grund wurden die weiteren Untersuchungen mit dem Mikroemulsionstyp (A) durchgeführt.

### **4.5.3 Salbengrundlagen**

Für die Herstellung der verschiedenen Formulierungen mit unterschiedlichem Extraktgehalt wurden standardisierte Grundlagen verwendet, wie z. B. Wollwachsalkoholsalbe, wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe, hydrophile Salbe DAB, nichtionische hydrophile Creme DAB, anionische hydrophile Creme SR/DAB, Vaseline, Basiscreme, modifizierte Basiscreme, hydrophobe Basiscreme. Alle hergestellten Formulierungen wurden in regelmäßigen Abständen visuell geprüft und nach Stabilität des Extraktes nach ihrer Grundlage, dem optischem Aussehen und eventuellen Veränderungen beurteilt.

Die Basiscreme DAC dient als ideale Grundlage für die Einarbeitung des Extrakts. Hierbei handelt es sich um eine amphiphile Creme, die sowohl O/W- als auch W/O-Emulgatoren enthält und sich dadurch für die Einarbeitung zahlreicher Arzneistoffe eignet. Sie enthält einen Wasseranteil von 40 % und ist mit Propylenglykol konserviert, das gleichzeitig als Penetrations-Enhancer fungiert. Die Freisetzungsuntersuchungen wurden anhand von 1%-iger Basiscreme durchgeführt.

## **4.6 Stabilität des Extraktes in Standardvehikeln**

In dieser Arbeit wurden die Parameter beginnend bei der Pflanzenspezies, den Anbaubedingungen, den Erntezeitpunkten der Balsampappel bis hin zur Einarbeitung in halb feste Formulierung untersucht und biopharmazeutisch charakterisiert. Die Stabilität der Zubereitungen wurde makroskopisch geprüft und bewertet (79).

Die vorgenommenen Untersuchungen zeigten, dass das Gel nach der ersten Woche bei 40 °C und nach der zweiten Woche bei 30 °C in zwei Phasen (obere Phase: dunkelbraun, untere Phase: klar durchsichtig) getrennt war. Bei der Basiscreme haben sich bei 40 °C bereits nach der ersten und vierten Woche bei 30 °C leichte Luftblasen gebildet. Eine leichte Verdunklung der Basiscreme war erkennbar. Nach weiteren zwei Wochen lag bei 40 und bei 30 °C schmier- sowie schaumartige Masse vor. Ab der neunten Woche bei 40 °C und der elften Woche bei 30 °C hat sich ein feiner Niederschlag bei der Mikroemulsion gebildet. Die Formulierungen, Basiscreme, Gel bei Raumtemperatur (RT), Kühlschrank (KT) und Mikroemulsion bei RT, weisen nach

makroskopischer Beurteilung über den Zeitraum von zwölf Wochen eine vorteilhafte Stabilität auf. Bei der Überprüfung anhand der HPLC lag die Wiederfindungsrate (WFR) bei nahezu 100 %.

#### 4.6.1 Gehaltbestimmung der Markersubstanzen aus dem Extrakt und den gewählten Formulierungen

##### 4.6.1.1 Gehaltbestimmung der Markersubstanzen aus dem Extrakt

Zur Gehaltsbestimmung der Markersubstanzen aus dem Extrakt wurden drei Proben mit definierter Menge an trockenem Extrakt eingewogen, in 1,1 ml EtOH (70 %) aufgenommen und gevortext. Anschließend wurden die Proben für 30 Min. im Ultraschallbad bei RT extrahiert. Danach wurde jede Probe mit 0,9 ml 1-molarer NaOH hydrolysiert. Nach der Filtration wurden die Proben anhand der HPLC-Methode analysiert. Die erhaltenen Daten sind in Tab. 15 zusammengefasst.

Tab. 15: Darstellung der Gehalte der Markersubstanzen, Salicin und Cumarsäure aus dem Extrakt, n = 3

Salicin mg/ml ± SD	Cumarsäure mg/ml ± SD
16,36 ± 0,66	2,15 ± 0,73

##### 4.6.1.2 Gehaltbestimmung der Markersubstanzen aus den Formulierungen

Für die Wiederfindung des Gehaltes der Markersubstanzen aus dem 1-%-igen Gel, der 1-%-igen Basiscreme und der 1-%-igen Mikroemulsion wurden jeweils drei Proben mit definierter Menge eingewogen. Jeder Probe wurde 1,1 ml 70-%-iger EtOH zugegeben und gevortext. Die Proben wurden bei RT für 30 Min. im Ultraschallbad extrahiert. Daraufhin erfolgte die Hydrolyse jeder Probe mit 0,9 ml 1-molarer NaOH. Anschließend wurden die Proben filtriert und anhand der HPLC-Methode gemessen. Tab. 16 zeigt, dass die WFR jeweils bei nahezu 100 % liegen.

Tab. 16: Darstellung der Gehalte der Markersubstanzen, Salicin und Cumarsäure in % aus den Formulierungen, n = 3

Vehikel	Salicin ± SD	Cumarsäure ± SD
Gel	99,84 ± 0,67	99,27 ± 0,86
Basiscreme	99,63 ± 0,40	101,69 ± 0,44
Mikroemulsion	101,56 ± 0,39	98,33 ± 0,37

SD: Standardabweichung

## 4.7 Biopharmazeutische Charakterisierung

Die Biopharmazie beschäftigt sich mit Fragen hinsichtlich der chemischen und physikalischen Eigenschaften von Wirk- und Hilfsstoffen, der Verarbeitungstechnologie, der Arznei- bzw.

Darreichungsform, der Wirkstofffreigabe sowie der Resorption, Verteilung, des Metabolismus und der Exkretion des Arzneistoffes (80). Untersuchungen zur biopharmazeutischen Charakterisierung von dermalen Darreichungsformen kommen besondere Bedeutung zu.

Zur Bestimmung der Freisetzung werden Zellen mit unterschiedlichen Präparationen benötigt (81):

1. Ein oder mehrere Zellen als Blindprobe: D. h., es wird lediglich die Grundlage ohne Wirkstoff auf die erste Membran aufgetragen, um sicherzustellen, dass Bestandteile der Grundlage keine störenden Effekte in der sich anschließenden Analytik zeigen.
2. Ein oder mehrere Zellen als Wiederfindungsprobe: D. h., die erste Membran wird nach entsprechender Penetrationszeit nicht abgewischt und die sich daraus ergebende Summe der einzelnen Membranwirkstoffgehalte entspricht 100 %. Diese Wiederfindung gibt prinzipiell an, wie vorteilhaft die gesamte Methode (bestehend u. a. aus Analytik des Wirkstoffes, Extraktion der Membranen, Membranherstellung und Präparationsgeschick) ist.
3. Ein oder mehrere Zellen als Probenmodelle: D.h., die erste Membran wird nach vorgesehener Penetrationszeit abgewischt und wie alle anderen Modelle einer Wirkstoffextraktion unterzogen, an die sich die Analyse des Wirkstoffgehaltes anschließt.
4. Die Anzahl der entsprechenden Zellen ist separat für jede Formulierung in Tab. 17 zusammengefasst. Die in den Freisetzungsforschungen angewandte Mehrfachbestimmung diente zur Erhöhung der statistischen Sicherheit der erhaltenen Ergebnisse, die in dem Abschnitt der Ergebnisse hinsichtlich auftretender Fehler bzw. Präparationschwierigkeiten näher diskutiert werden.

Tab. 17: Anzahl an Blind-, Wiederfindungs- und Probenmodellen für die einzelnen Formulierungen

Zellenbeschreibung	Grundlage + 1-%-iger Extrakt Anzahl der Zellen
Blindprobe	1
WFR	3
Probe	6

Hinsichtlich der Interpretation der Freisetzungsergebnisse ist zu beachten, dass die erste Membran der Proben abgewischt wird. Es kann dadurch nicht angenommen werden, dass nur der penetrierte

Wirkstoff in der Membran detektiert wird, da die Membranoberfläche eine Rauigkeit aufweist. Zusätzlich wird die Penetration aus einer Membran in die darauffolgende durch die Überwindung zweier Grenzflächen bestimmt. Befinden sich zwischen zwei Membranen kleine Luft einschlüsse, kann an diesen Stellen keine Penetration des Wirkstoffes erfolgen. Eine weitere Fehlerquelle kann die RT sein (hauptsächlich im Winter), z. B. bei der Verwendung von Dodecanol als Akzeptor, der bei 20 °C und kälter aus der Membran ausfällt.

## 4.8 Ergebnisse und Diskussion der Freisetzungsuntersuchungen

### 4.8.1 Berechnung der benötigten Membrananzahl

Im Rahmen einer Voruntersuchung wurde die Freisetzung der Markersubstanzen aus den Formulierungen an beiden Akzeptorkomponenten (Dodecanol und Glycerol) untersucht. Eine wesentliche Voraussetzung für das Erreichen optimaler Liberationsergebnisse ist das Vorliegen von Sink-Bedingungen, d. h., dass max. 10 % der Akzeptorkapazität ausgenutzt werden. Um dies zu gewährleisten, kann die Art und Anzahl der verwendeten Membranen in Abhängigkeit von der Löslichkeit des jeweiligen Arzneistoffs variiert werden.

Aufgrund der schlichten Verteilung und Klumpenbildung des trockenen Extraktes im Glycerol konnte die Löslichkeit des Extraktes nicht direkt in Glycerol bestimmt werden. Aus diesem Grund wurde die Anzahl der erforderlichen Membranen indirekt an Glycerol- bzw. an Dodecanol-Membranen bestimmt. In diesem Rahmen wurden für die Penetration aus der Formulierung drei Versuche für beide Membranen angestellt, um die Liberation aus beiden Membranen vergleichen zu können. Die folgende Tab. 18 stellt die verwendeten Membranen pro Versuch dar.

Tab. 18: Darstellung der verwendeten Membranen pro Zelle

Membrankomponente	Versuch	Versuch	Versuch
	Anzahl der verwendeten Membranen pro Zelle*		
Glycerol-Membranen	10	4	3
Dodecanol-Membranen	10	4	3

\*Es wurden immer vier Zellen je Versuch verwendet. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 90 Min. bei 32 °C inkubiert

Das Ziel dieser Versuche war es, zum einen die Anzahl an benötigten Membranen zu erfassen und zum anderen die freigesetzte Menge an Markersubstanzen zu vergleichen. Bei der Auftragung von 10 mg 1%-igem Gel waren für die Penetration von Salicin nach 90 Min. drei Dodecanol-Membrane und vier Glycerol-Membranen sowie für Cumarsäure jeweils fünf Membranen erforderlich.

Beim Vergleich der gesamtfreigesetzten Menge an Markersubstanzen aller drei Versuche zeigten sich keine wesentliche Unterschiede. Die Gesamtliberation an Dodecanol-Membranen war höher als jene der Glycerol-Membranen. Dies bestätigt die Ergebnisse von Bendas (82) insofern, als dass eine Steigerung der Aufnahmekapazität für Arzneistoffe durch eine erhöhte Membrananzahl lediglich bis zu einer Akzeptorerweiterung auf drei Membrane möglich ist. Bei einer höheren Anzahl waren keine Unterschiede hinsichtlich der Gesamtliberation feststellbar. Knorst kam hinsichtlich der Untersuchungen zur Harnstoffliberation zu dem gleichen Ergebnis (83).

Dodecanol-Membranen zeigten hinsichtlich der Herstellung, der Stabilität, der Lagerung und der Analytik vorteilhaftere Ergebnisse als Glycerol-Membranen. Als Inkubationszeiten wurden 15, 30, 90, 150 und 300 Min. eingehalten und die Proben werden anschließend mittels HPLC gemessen.

#### 4.8.2 Freisetzung der Markersubstanzen aus dem 1-%-igen Gel

Die freigesetzte Gesamtmenge an Salicin ( $\Sigma$  MWM1 + MWM2 + MWM3) steigt in der Zeit zwischen 15 und 150 Min. von 78,5 % auf 97,7 %. Die Salicinverteilung erhöht sich mit der Dauer innerhalb der Membranen.

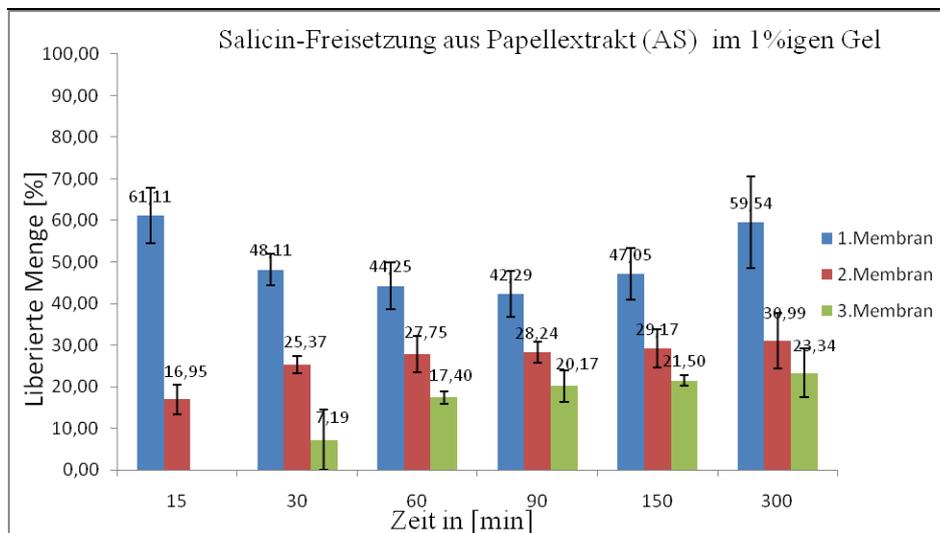


Abb. 37: Salicinfreisetzung aus dem 1-%-igen Gel in den Membranen, n = 6

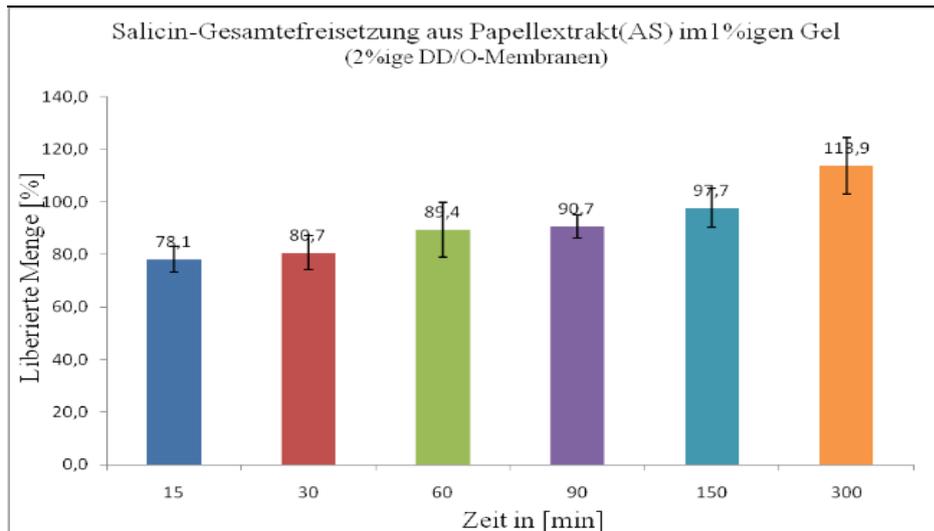


Abb. 38: Gesamte Salicinfreisetzung aus dem 1%-igen Gel in den Membranen, n = 6

Tab. 19: Auflistung der zu Abb. 37 korrespondierenden Werte (mw = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = 6)

Zeit in Min.	Gehalt an Salicin in %, n=6		
	mw. M1 ± SD	mw. M2 ± SD	mw. M3 ± SD
15	61,1 ± 6,59	17,0 ± 3,58	00,0 ± 00,0
30	48,7 ± 3,82	25,4 ± 2,12	7,2 ± 7,24
60	44,3 ± 5,63	27,8 ± 4,39	17,4 ± 1,49
90	42,3 ± 5,51	28,2 ± 2,53	20,2 ± 3,74
150	47,0 ± 6,20	29,2 ± 4,61	21,5 ± 1,34
300	59,5 ± 11,02	31,0 ± 6,69	23,3 ± 5,77

Die freigesetzte Gesamtmenge an Cumarsäure ( $\Sigma$  MWM1 + MWM2 + MWM3) ergibt im gesamten Zeitverlauf von 15 bis 150 Min. keine signifikante Änderung. Die Cumarsäureverteilung zeigt bereits nach 30 Min. eine annähernde Gleichverteilung innerhalb der Membranen und verändert sich mit zunehmender Zeit nicht wesentlich.

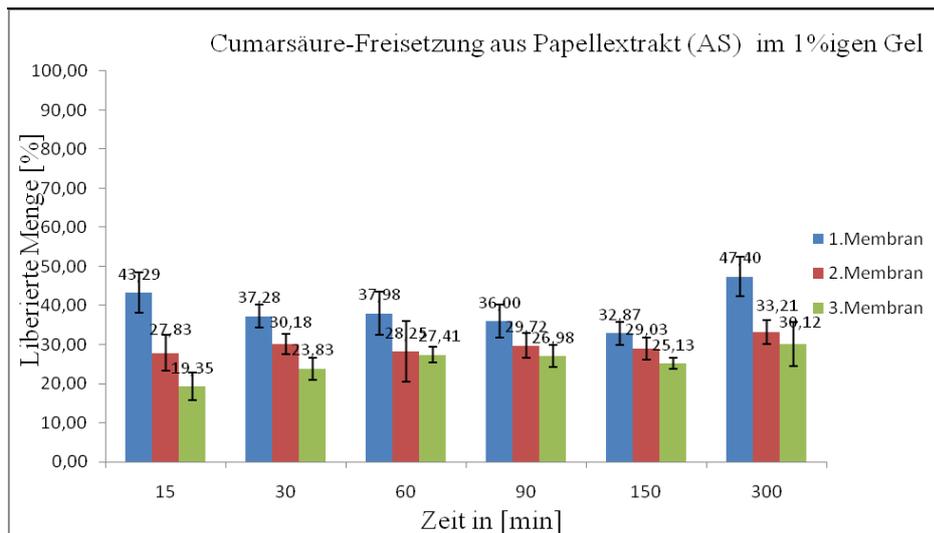


Abb. 39: Cumarsäureverteilung aus dem 1-%-igen Gel in den Membranen, n = 6

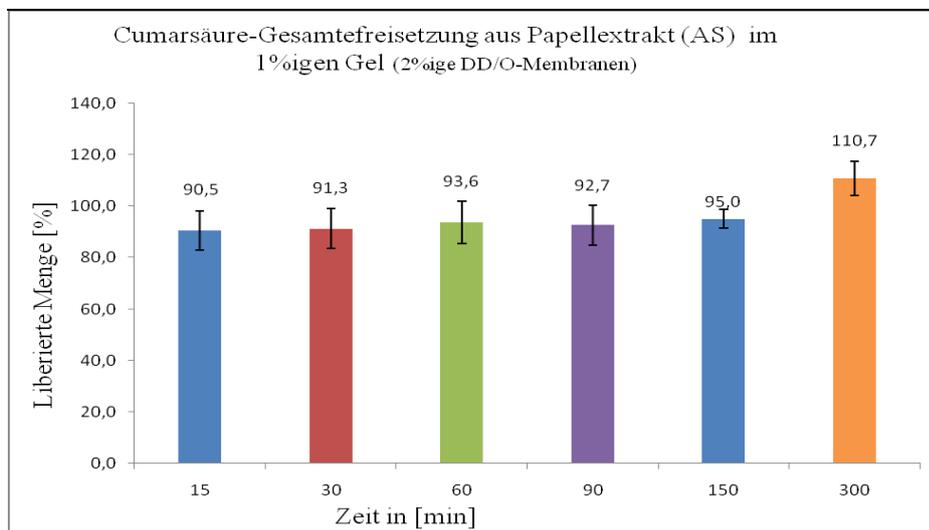


Abb. 40: Gesamtfreisetzung Cumarsäure aus dem 1-%-igen Gel in den Membranen, n = 6

Tab. 20: Auflistung der zu Abb. 39 korrespondierenden Werte (mw = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = 6)

Zeit in Min.	Gehalt an Cumarsäure in %		
	mw M1 ± SD	mw M2 ± SD	mw M3 ± SD
15	43,3 ± 5,08	27,8 ± 4,55	19,3 ± 3,57
30	37,3 ± 2,93	30,2 ± 2,61	23,8 ± 2,81
60	38,0 ± 5,63	28,3 ± 7,70	27,4 ± 1,98
90	36,0 ± 4,34	29,7 ± 3,22	27,0 ± 2,84
150	36,7 ± 0,80	33,2 ± 1,88	25,1 ± 1,41
300	47,4 ± 5,12	33,2 ± 3,09	30,1 ± 5,71

### 4.8.3 Freisetzung der Markersubstanzen aus der 1%-igen Basiscreme

Die freigesetzte Gesamtmenge an Salicin ( $\Sigma$  MWM1+MWM2+MWM3) steigt lediglich von 19,5 % nach 15 Min. auf 70,2 % nach 150 Min., anschließend wurde keine Veränderung beobachtet. Die Salicinverteilung innerhalb der Membranen ist nach 90 Min. erkennbar.

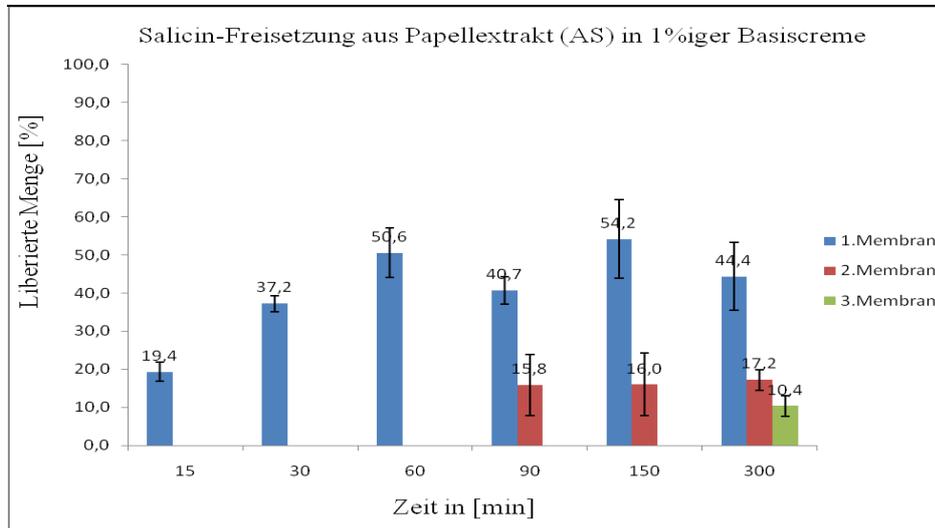


Abb. 41: Salicinverteilung aus der 1%-igen Basiscreme in den Membranen, n = 6

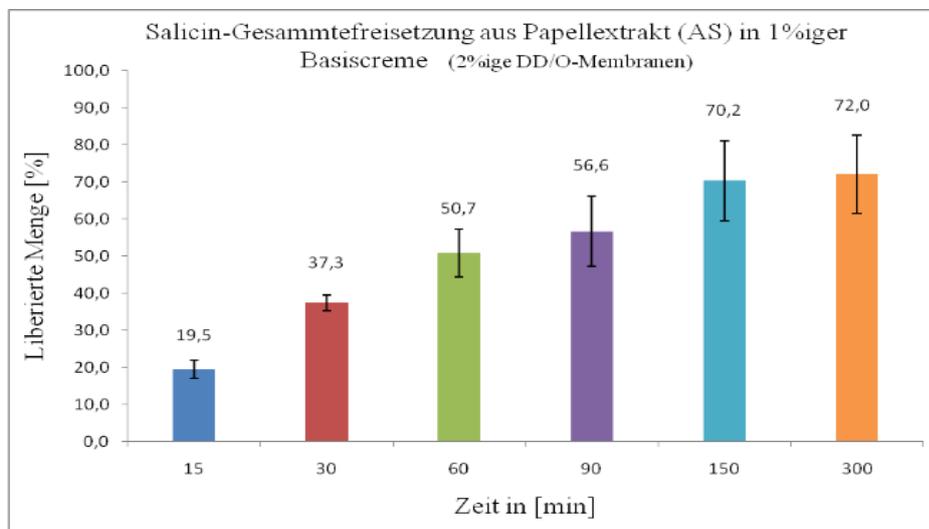


Abb. 42: Gesamtfreisetzung Salicin aus der 1%-igen Basiscreme, n = 6

Tab. 21: Auflistung der zu Abb. 41 korrespondierenden Werte, mw = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = 6

Zeit in Min.	Gehalt an Salicin in %		
	mw M1 ± SD	mw M2 ± SD	mw M3 ± SD
15	19,4 ± 2,44	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
30	37,2 ± 2,05	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
60	50,6 ± 6,43	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
90	40,7 ± 3,57	15,8 ± 7,99	0,0 ± 0,0
150	54,2 ± 10,36	16,0 ± 8,21	0,0 ± 0,0
300	44,4 ± 8,87	17,2 ± 2,66	10,4 ± 2,69

Die freigesetzte Gesamtmenge der Cumarsäure ( $\Sigma$  MWM1 + MWM2 + MWM3) erhöht sich von 39,2 % nach 15 Min. auf 87,0 % nach 150 Min. Die Verteilung innerhalb der Membranen beginnt nach 30 Min. Ab der 150. Min. wurde keine Veränderung mehr beobachtet.

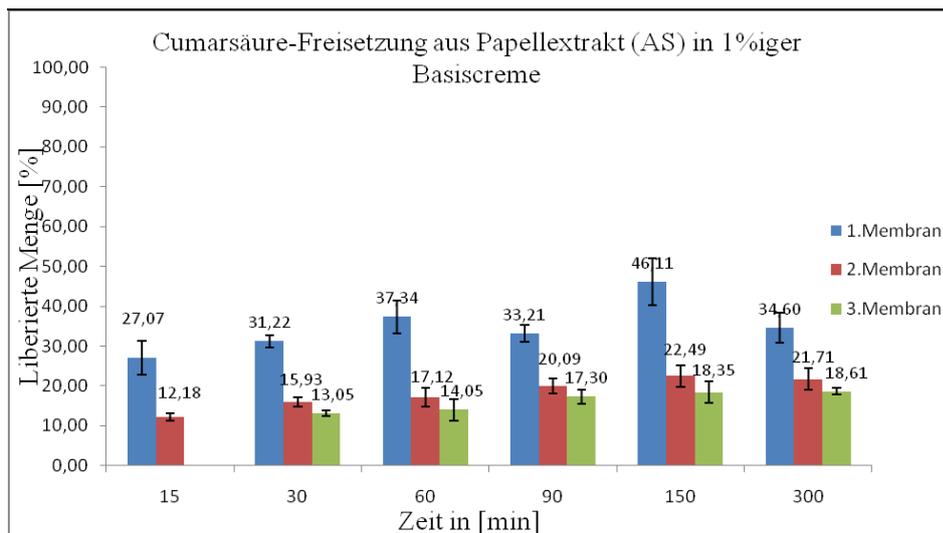


Abb. 43: Cumarsäureverteilung aus der 1%-igen Basiscreme in den Membranen, n = 6

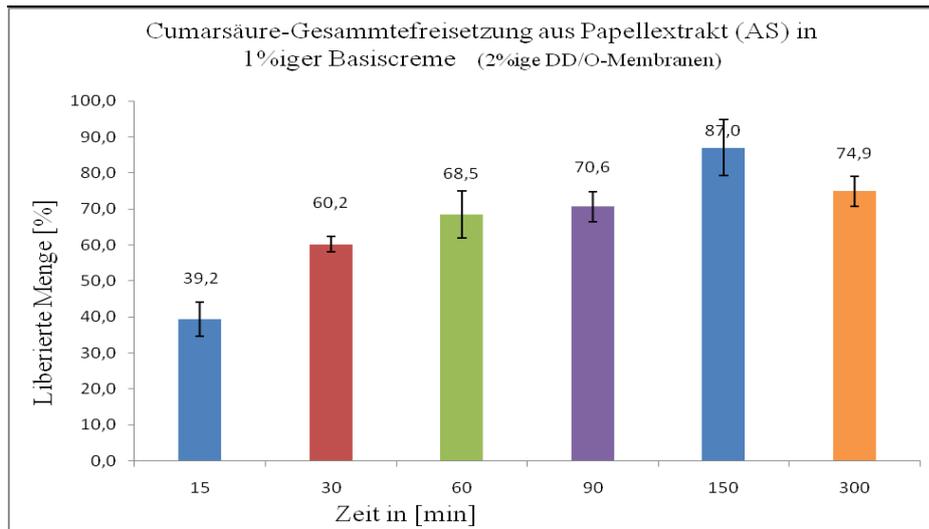


Abb. 44: Gesamtfreisetzung der Cumarsäure aus der 1-%-igen Basiscreme, n = 6

Tab. 22: Auflistung der zu Abb. 43 korrespondierenden Werte (mw = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = 6

Zeit in Min.	Gehalt an Cumarsäure in %, n = 6		
	mw M1 ± SD	mw M2 ± SD	mw M3 ± SD
15	27,1 ± 4,20	12,2 ± 0,91	0,0 ± 0,00
30	31,2 ± 1,59	15,9 ± 1,25	13,1 ± 0,68
60	37,3 ± 4,08	17,1 ± 2,38	14,1 ± 2,68
90	33,2 ± 2,05	20,1 ± 1,89	17,3 ± 1,85
150	46,1 ± 5,93	22,5 ± 2,67	18,3 ± 2,69
300	34,6 ± 3,79	21,7 ± 2,73	18,6 ± 0,81

#### 4.8.4 Freisetzung der Markersubstanzen aus der 1-%-igen Mikroemulsion

Die freigesetzte Gesamtmenge an Salicin ( $\Sigma$  MWM1 + MWM2 + MWM3) steigt von 62,44 % nach 15 Min. auf 101,4 % nach 150 Min., anschließend wurde keine Veränderung festgestellt. Die Salicinverteilung innerhalb der Membranen ist nach 60 Min. erkennbar.

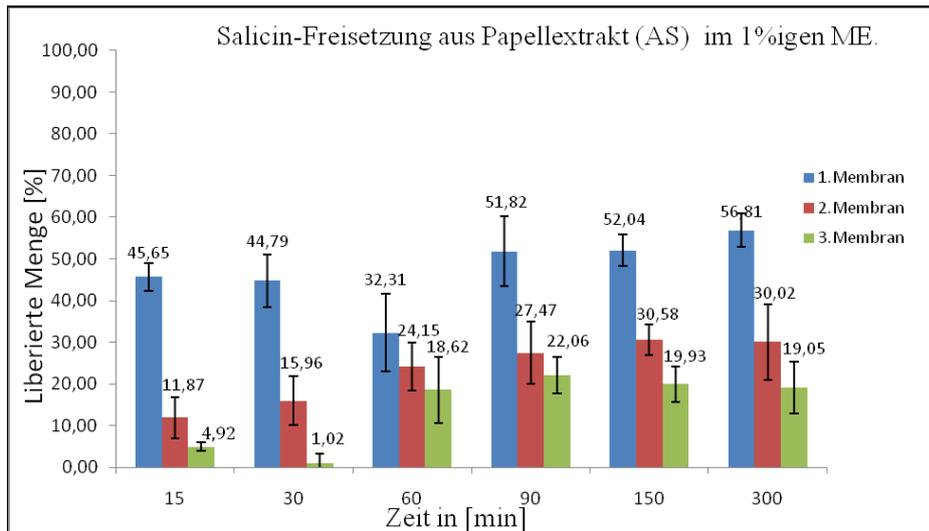


Abb. 45: Salicinfreisetzung aus der 1-%-igen Mikroemulsion in den Membranen, n = 6

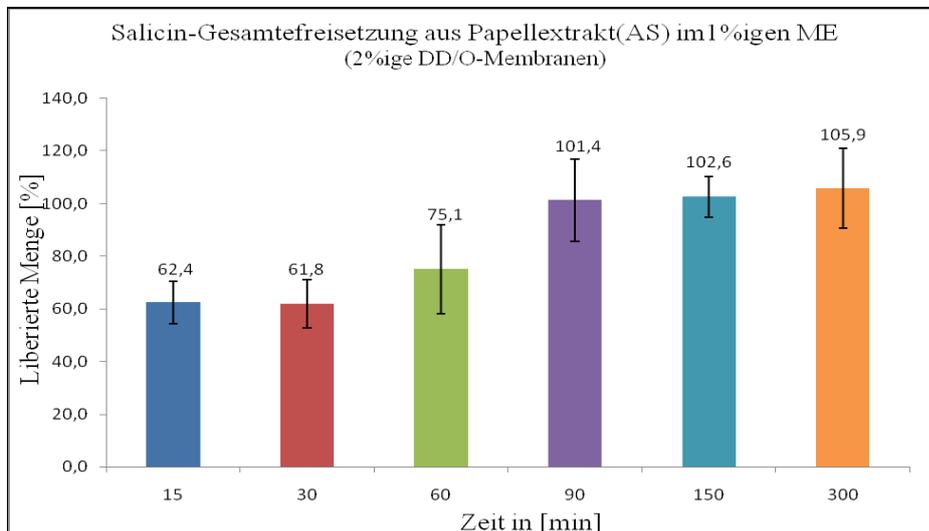


Abb. 46: Gesamtverteilung Salicin aus 1-%-iger Mikroemulsion in den Membranen, n = 6

Tab. 23: Auflistung der zu Abb. 45 korrespondierenden Werte, mw = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = 6

Zeit in Min.	Gehalt an Salicin in %		
	mw M1 ± SD	mw M2 ± SD	mw M3 ± SD
15	45,65 ± 3,29	11,86 ± 4,86	4,92 ± 1,06
30	44,79 ± 6,32	1,96 ± 5,83	1,02 ± 2,29
60	32,32 ± 9,36	24,1 ± 5,83	18,62 ± 7,94
90	51,82 ± 8,42	27,47 ± 7,42	22,06 ± 4,34
150	52,04 ± 3,75	30,58 ± 3,73	19,93 ± 4,22
300	56,81 ± 4,03	30,02 ± 8,98	19,05 ± 6,25

Die freigesetzte Gesamtmenge an Cumarsäure ( $\Sigma$  MWM1 + MWM2 + MWM3) erhöht sich von 69,3 % nach 15 Min. auf 113,4 % nach 90 Min. Die Cumarsäureverteilung zeigt bereits nach 90 Min. eine annähernde Gleichverteilung innerhalb der Membranen und verändert sich mit zunehmender Zeit nicht signifikant.

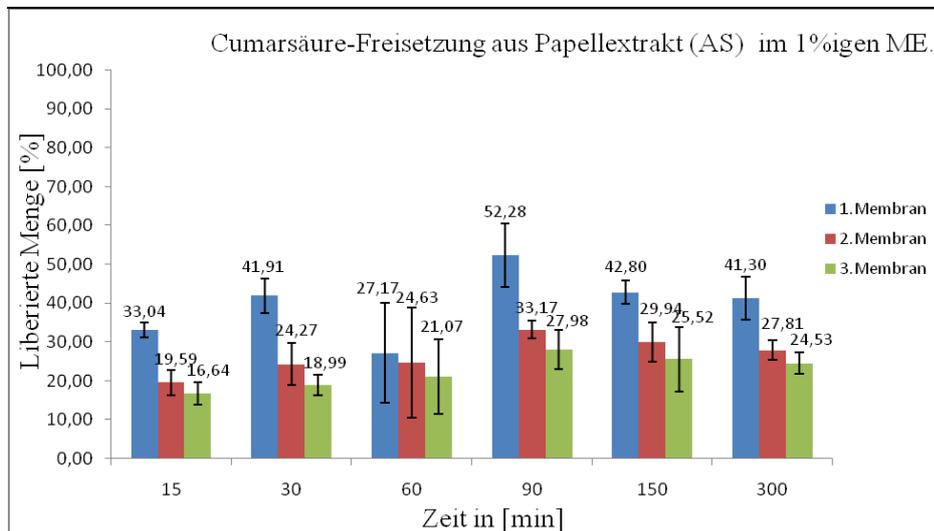


Abb. 47: Cumarsäurefreisetzung aus der 1%-igen Mikroemulsion in den Membranen, n = 6

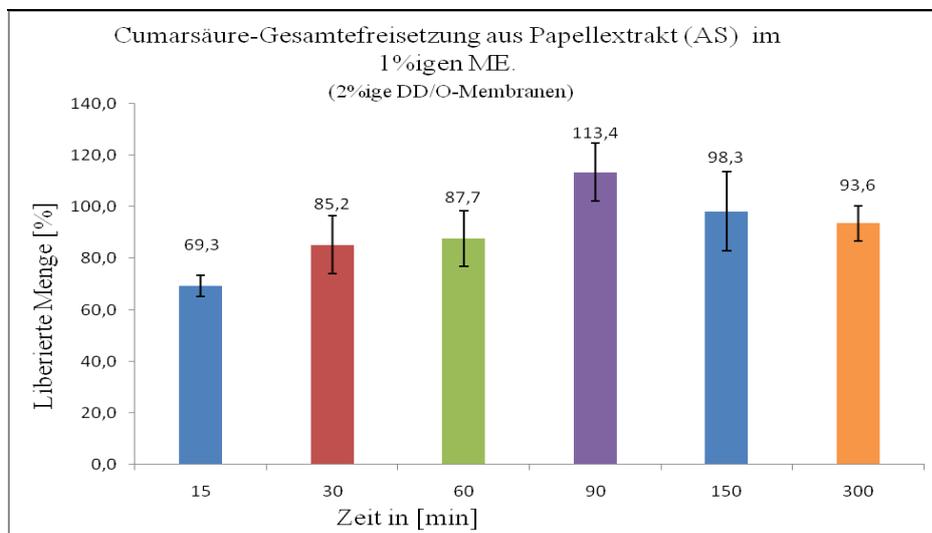


Abb. 48: Gesamtfreisetzung der Cumarsäure aus der 1%-igen Mikroemulsion in den Membranen, n = 6

Tab. 24: Auflistung der zu Abb. 47 korrespondierenden Werte, mw = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = 6

Zeit in Min.	Gehalt an Cumarsäure in %		
	mw M1 ± SD	mw M2 ± SD	mw M3 ± SD
15	33,04 ± 1,87	19,59 ± 3,24	16,64 ± 2,89
30	41,91 ± 4,49	24,27 ± 5,34	18,99 ± 2,61
60	27,17 ± 12,80	24,63 ± 14,16	21,07 ± 9,59
90	52,28 ± 8,15	33,17 ± 2,24	27,98 ± 5,01
150	42,80 ± 2,99	29,94 ± 4,97	25,52 ± 8,29
300	41,30 ± 5,48	27,81 ± 2,54	24,53 ± 2,76

Die Gehaltsbestimmungen aus den Formulierungen ergaben eine WFR von 99,84 % für Salicin und 99,27 % für p-Cumarsäure im 1-%-igen Gel. Aus der 1-%-igen Basiscreme wurde eine WFR von 99,63 % für Salicin und 101,69 % für p-Cumarsäure ermittelt. Die 1-%-ige Mikroemulsion ergab eine WFR von 101,56 % für Salicin und 99,78 % für p-Cumarsäure.

Die annähernde Gleichverteilung des Salicins im 1-%-igen Gel und in der 1-%-igen Mikroemulsion erfolgt in den einzelnen Dodecanol-Membranen nach 60 Min. und der p-Cumarsäure im 1-%-igen Gel bereits nach 30 Min., in der 1-%-igen Mikroemulsion jedoch erst nach 90 Min. Für die 1-%-ige Basiscreme war Salicin erst nach 300 Min. in der dritten Membran auffindbar, während hinsichtlich der p-Cumarsäure schon nach 30 Min. eine Verteilung innerhalb der drei Membranen registriert wurde. Mit zunehmender Versuchszeit tritt keine wesentliche Veränderung des Verteilungsverhaltens für p-Cumarsäure in beiden Formulierungen ein.

#### 4.9 Bestimmung der Area Under the Curve (AUC)

Die freigesetzten Mengen an Markersubstanzen aus den Formulierungen wurden nach 15, 30, 60, 90, 150 und 300 Min. extrahiert und anhand der HPLC- Methode quantifiziert. Als Parameter wurde die Fläche unter der Kurve (AUC), die ein Maß für den penetrierten Anteil eines gegebenen Stoffes und die mittlere Auflösungszeit (*mean dissolution time*, MDT) verwendet.

Durch die Ermittlung der AUC konnten die Freisetzungsergebnisse miteinander verglichen werden. Die Fläche ABC (*area between the curves*) gibt die in der Formulierung zurückbleibende Menge des Salicins bzw. der p-Cumarsäure an. Eine geringe ABC bedeutet eine günstigere Liberation der Markersubstanzen aus der Formulierung.

Zur Bestimmung der mittleren Liberationszeit wird die MDT berechnet, entsprechend dem Quotienten aus ABC und  $M_0$ , wobei  $M_0$  der Gehalt in % bezogen auf die WFR nach 300 Min. ist (84).

$$MDT = \frac{ABC}{M_0} [\text{min}]$$

MDT: Mittlere Auflösungszeit (*mean dissolution time*)

ABC: Fläche zwischen den Kurven (*area between the curves*)

$M_0$ : Gehalt [%] bezogen auf WFR nach 300 Min.

Sowohl die AUC- bzw. ABC- als auch die MDT-Werte sind in Tab. 25 zusammengefasst.

Tab. 25: AUC-, ABC- und MDT-Werte der untersuchten Formulierungen, n = 3

Formulierung	Wirkstoff	AUC ± SD	ABC ± SD	MDT = ABC/ $M_0$
1 % Gel	Salicin	28552,03 ± 1527,66	5608,48 ± 2230,09	48,03 ± 15,40
	Cumarsäure	28673,54 ± 13,74	4837,96 ± 1399,65	42,89 ± 10,26
1 % Basiscreme	Salicin	17974,09 ± 1589,38	5748,91 ± 1505,28	71,77 ± 11,14
	Cumarsäure	21924,77 ± 847,59	4264,24 ± 1645,27	47,85 ± 13,24
1 % Mikroemulsion	Salicin	27850,48 ± 2376,00	6602,03 ± 2362,65	56,62 ± 14,46
	Cumarsäure	27232,13 ± 1750,88	5023,88 ± 1002,20	46,66 ± 8,15

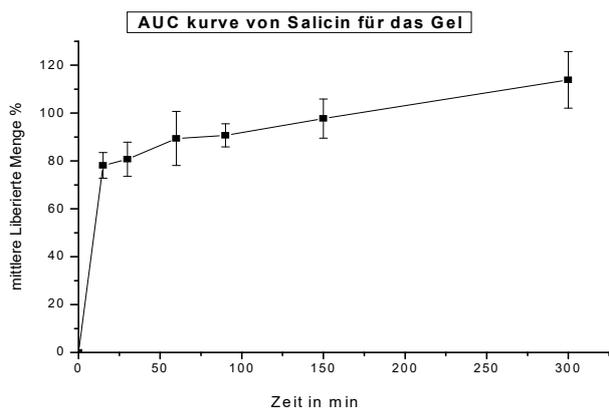


Abb. 49: AUC-Kurve für Salicin im 1-%-igen Gel

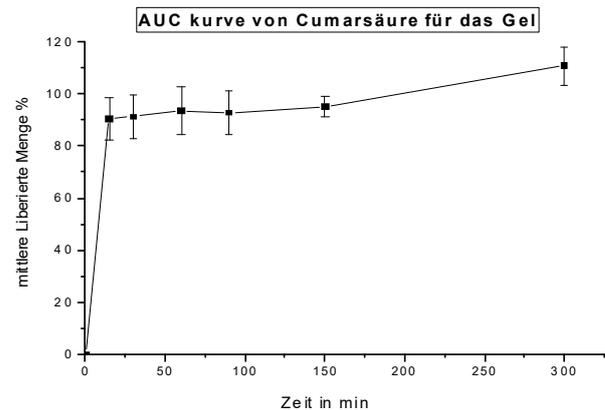


Abb. 50: AUC-Kurve für p-Cumarsäure im 1-%-igen Gel

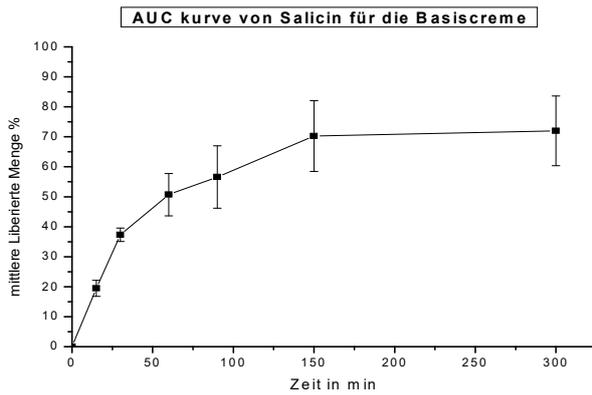


Abb. 51: AUC-Kurve für Salicin in 1%-iger Basiscreme

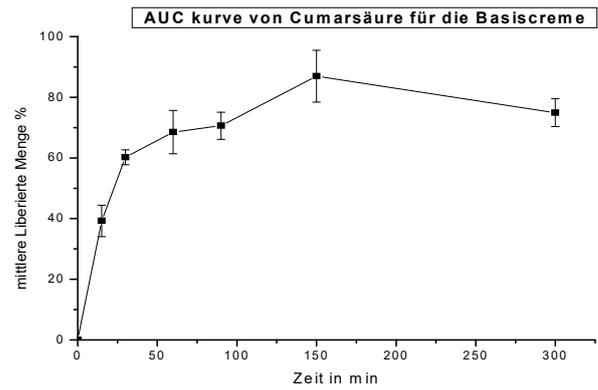


Abb. 52: AUC-Kurve für p-Cumarsäure in 1%-iger Basiscreme

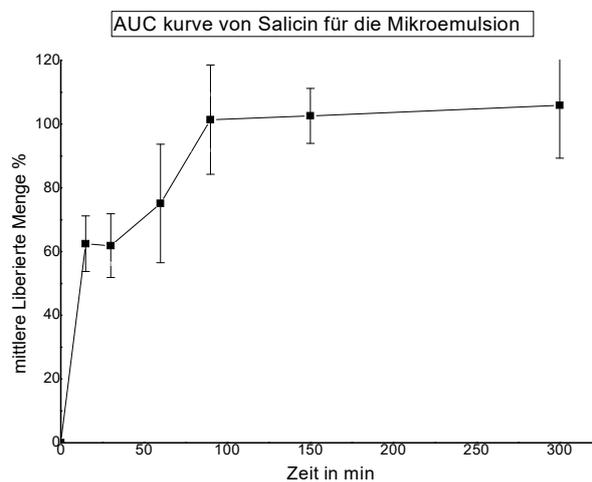


Abb. 53: AUC-Kurve für Salicin in 1%-iger Mikroemulsion

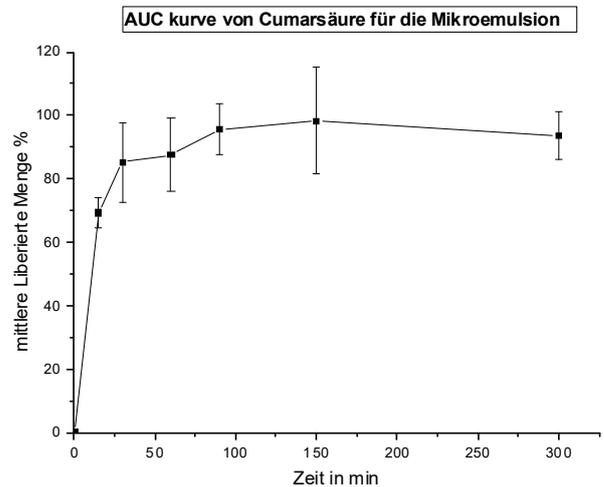


Abb. 54: AUC-Kurve für p-Cumarsäure in 1%-iger Mikroemulsion

Die Abb. 49 bis 54 geben die relevantesten Parameter für die Bestimmung der gesamtliberierten Menge an Markersubstanzen aus den untersuchten Formulierungen wieder. Werden die AUC-Flächenwerte von Salicin und p-Cumarsäure im Gel, in der Basiscreme und in der Mikroemulsion verglichen, ist festzustellen, dass der gesamtfreigesetzte Anteil an beiden Substanzen aus dem Gel höher als jener der Basiscreme oder der Mikroemulsion ist.

Die MDT (siehe Tab. 25) für Salicin und p-Cumarsäure liefern die Aussage, dass die Diffusion aus dem Gel schneller erfolgt als jene aus der Basiscreme und der Mikroemulsion bei gleichen Bedingungen. Dies ist ebenso an dem Verlauf der AUC-Kurven (siehe Abb. 49 bis 54) deutlich zu erkennen.

Die AUC-, ABC- und MDT-Berechnungen bestätigen die signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Freisetzungsgeschwindigkeit und des Liberationsverhaltens der beiden Substanzen bei der Anwendung verschiedener Vehikel für die Freisetzungsuntersuchungen. Anhand der erwähnten Parameter lässt sich erkennen, dass sich die Freisetzung der beiden Stoffe aus dem 1-%-igen Gel vorteilhafter als jene aus der 1-%-igen Basiscreme und der 1-%-igen Mikroemulsion gestaltet.

#### 4.10 HET-CAM-Modell

Die Abkürzung HET-CAM steht für *Hen's egg test on chorioallantoic membrane*. Mit Hilfe des HET-CAMs können unter In-vivo-Bedingungen Abschätzungen über die Gewebetoxizität von Substanzen für Haut bzw. Schleimhaut getroffen werden (85).

Es handelt sich hierbei um eine schnell durchführbare und empfindliche In-vivo-Methode, die zudem mit geringen Kosten verbunden ist. Die HET-CAM-Methode gilt als schmerzfrei. Da die Membran ca. acht bis zehn Tage nach der Befruchtung verwendet wird, besitzt sie zwar ein funktionstüchtiges Gefäßsystem, jedoch noch keine Nervenzellen, weshalb an schmerzfreier Materie gearbeitet wird (86).

Die HET-CAM-Methode ist ein international etabliertes und akzeptiertes Verfahren und stellt durch korrelierende Ergebnisse eine Alternative zum Tierversuch (DRAIZE-Test) dar. Irritative Erscheinungen zeigen sich in Form einer Veränderung des Gefäßsystems sowie der Durchblutung der stark vaskulierten CAM nach Wohlrab in einer Erhöhung der Gefäßperfusion (87).

#### HET-CAM-Test – Durchführung und Ergebnisse

In der folgenden Tab. 26 sind die untersuchten 1-%-igen Formulierungen dargestellt.

Tab. 26: Untersuchte Proben mittels HET-CAM-Test

Vehikel	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Basiscreme	Ohne Extrakt	Pappel <i>Muhle-Larsen</i>	Pappel <i>Androscoggin</i>	Pappel <i>Max 5</i>
Gel	Ohne Extrakt	Pappel <i>Muhle-Larsen</i>	Pappel <i>Androscoggin</i>	Pappel <i>Max 5</i>
Mikroemulsion	Ohne Extrakt	Pappel <i>Muhle-Larsen</i>	Pappel <i>Androscoggin</i>	Pappel <i>Max 5</i>

Es wurden natürlich befruchtete Eier von Hühnern der Rasse *New Hampshire* verwendet, die nach dem Transport mehr als acht Tage bei 37 °C und 55 % Luftfeuchtigkeit in Paletten in einem Brutschrank bebrütet wurden. Nach Ablauf der Brutzeit wurden die Eier geöffnet, wobei ein kreisrundes Loch mit einem Durchmesser von ca. 1,5 cm im Bereich der Luftkammer

aufgebrochen und die Eischale entfernt wurde. Durch vorsichtige Präparation konnte die innere Eimembran entfernt und die CAM freigelegt werden.

Jede Probe wurde an sechs Eiern untersucht. Die Proben wurden mit Hilfe eines kleinen dünnen Glasdeckels auf die CAM-Membran angebracht und innerhalb von 5 Min. wurden visuell mögliche Gefäßsystemänderungen (HR = Hämorrhagie, MD =Membranverfärbung) beobachtet. Es wurde bei den untersuchten Formulierungen keine Membranverfärbung identifiziert.

Eine leichte Gefäßsystemänderung bzw. Blutung wurde bei den folgenden Formulierungen beobachtet:

- Beim Gel Pappel *Max 5* in drei Eiern.
- Beim Gel Pappel *Androscoggin* in drei Eiern.
- Beim Gel Pappel *Muhle-Larsen* in zwei Eiern.
- Bei der Basiscreme Pappel *Max 5* in einem Ei.
- Bei der Mikroemulsion Pappel *Max 5* in drei Eiern.

Statistisch gesehen zeigten die Pappel-Extrakte im Allgemeinen nach der visuellen Beurteilung mittels HET-CAM-Modell eine gute Verträglichkeit.

## 5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es u. a., Gewinnung und Anwendung bioaktiver Substanzen aus der Balsampappel. Die Balsampappel weist eine Vielzahl an Inhaltsstoffen mit pharmazeutischen oder kosmetisch relevanten Eigenschaften auf (wie z. B. antimikrobiell, antiinflammatorisch). Zudem wurde die Applizierbarkeit der verschiedenen Pappelspezies und Pflanzenteile für die Bestimmung optimaler Pflanzbedingungen untersucht. Darüber hinaus zielte die Thesis darauf ab, die analytische Methode hinsichtlich der galenischen Untersuchungen zu optimieren und Extrakte in standardisierte Formulierungen einzuarbeiten.

Dabei wurden folgende Pappelklone analysiert:

- Hybride europäische Schwarzpappel x asiatische Balsampappel (Sorte *Max 5*),
- Balsam-Hybride *P. maximowiczii* x *P. trichocarpa* (Sorte *Androscoggin*) und
- Balsam-Hybride *P. trichocarpa* x *P. trichocarpa* (Sorte *Muhle-Larsen*).

Die Untersuchungskriterien für die Pflanzbedingungen waren:

- die Erntezeiten (März und April),
- die Standweiten (D1= 0,5 m und D2 = 1 m) sowie
- der Düngerzusatz (ohne und mit).

Es wurden die Knospen, die Blätter und die Rinde der Pappelsorten *Muhle-Larsen*, *Androscoggin* und *Max 5* auf den Gehalt der Inhaltsstoffe überprüft. Es zeigte sich, dass die wesentlichen Inhaltsstoffe Salicin und p-Cumarsäure sind. Diese wurden als Markersubstanzen für die galenischen Untersuchungen festgelegt. Die Ferulasäure kommt nur in äußerst geringen Mengen vor und wurde aus diesem Grund als Markersubstanz ausgeschlossen.

Die Messergebnisse der Pappelsorten können wie folgt zusammengefasst werden:

- Die Knospen der Pappel *Androscoggin* zeigen im März einen wesentlich höheren p-Cumarsäuregehalt als jene der Pappel *Muhle-Larsen*.
- In den Blättern der Pappel *Androscoggin* kann im April ein deutlich höherer Gehalt an Salicin und p-Cumarsäure nachgewiesen werden als in den Knospen der Pappel *Muhle-Larsen*.
- Im April wurde eine leichte Zunahme des Salicingehalts in den Knospen der Pappel *Muhle-Larsen* im Vergleich zum Monat März registriert.

- Im März zeigen die Knospen der Pappel *Androskoggin* im Gegensatz zu den Blättern der gleichen Sorte im April einen wesentlich höheren Gehalt an p-Cumarsäure. Der Salicingehalt ist in der Knospe allgemein geringer als in den Blättern.
- Die Knospen der Sorte *Max 5* weisen Ende März den höchsten Gehalt an Salicin auf.
- Der höchste Salicingehalt ist generell in der Rinde der P.-Arten auffindbar.

Im Allgemeinen lässt sich schlussfolgern, dass weder die Standweiten noch der Düngerzusatz einen signifikanten Einfluss auf den Gehalt der Inhaltsstoffe der Pappelpflanzen ausüben.

Die Pappel *Androskoggin* weist den höchsten Gehalt der Inhaltsstoffe auf. In den Knospen der Pflanze wurden im März ca. 30 % p-Cumarsäure und im April in den Blättern ca. 11 % Salicin nachgewiesen. In der Rinde der Pappel *Androskoggin* wurde der höchste Salicingehalt mit ca. 35 % festgestellt.

Im Rahmen der Bioaktivitätsuntersuchungen des Balsampappel-Extraktes weisen die Knospen der verschiedenen Pappelklone eine antimikrobielle Wirkung auf. In den Extrakten aus den Blättern und der Rinde konnten hingegen keine antimikrobiellen Wirkungen festgestellt werden. Als optimaler Erntezeitpunkt wurde der Monat März festgelegt, da bei diesen Knospenextrakten unter Verwendung von 70%-igem EtOH als Extraktionsmittel die höchste antimikrobielle Wirkung belegt werden konnte.

Eine antiinflammatorische Wirkung der Rinde wurde bei den getesteten Pappelklonen identifiziert. Der DPPH-Test zeigt allerdings, dass alle drei Pflanzenbestandteile eine antioxidative Wirkungen haben.

Anhang der CE konnten u. a. die HPLC-Ergebnisse bestätigt und gleichzeitig neue Substanzen erfasst und angewendet werden. Es wurden Zimtsäure, Benzoesäure und Kaffeesäure mit Hilfe derer Referenzsubstanzen nachgewiesen.

Die Pappelklone zeigen keine Unterschiede hinsichtlich der nachgewiesenen bioaktiven Wirksamkeit. Bei der Pappelsorte *Androskoggin* wurde der höchste Gehalt an Markersubstanzen (Salicin und p-Cumarsäure) ermittelt, weshalb mit 1%-igem Extrakt der Sorte *Androskoggin* identische galenische Untersuchungen durchgeführt wurden.

Der Extrakt ist in Lyophilisatform hygroskopisch, daher sollte der Extrakt unter Vakuum im Exsikkator bei niedrigen Temperaturen aufbewahrt werden, um eine optimale Verarbeitbarkeit und eine niedrige Umgebungsluftfeuchte zu gewährleisten. Die Stabilität des Extraktes in den Formulierungen wurde bei verschiedenen Temperaturen innerhalb einer Zeitspanne von zwölf

Wochen untersucht und organoleptisch bzw. makroskopisch bewertet. Es wurde eine adäquate Stabilität der Formulierungen der Basiscreme, des Gels bei RT (KT) und Mikroemulsion bei RT festgestellt.

Im Rahmen galenischer Vorversuche erwies sich die HPLC-Messmethode für die Wiederfindung der Inhaltsstoffe aus den eingearbeiteten Formulierungen als wirkungsvoll. Die Freisetzungsversuche wurden anhand des 1-%-igen Gels, der 1-%-igen Basiscreme und der 1-%-igen Mikroemulsion durchgeführt. Die WFR lagen für Salicin und für Cumarsäure aus den Formulierungen bei nahezu 100 %. Das 1-%-ige Gel zeigt anhand der errechneten Parameter (AUC- bzw. ABC- sowie die MDT-Werte) die optimalere Gesamtfreisetzung der Marker-substanzen. Mit Hilfe des HET-CAM-Tests werden Formulierungen nach visueller Beurteilung hinsichtlich des Auftretens von Hämorrhagie, Gefäßlysis und Koagulation untersucht. Die zu testende Formulierungen ergaben im HET-CAM-Modell eine gute Verträglichkeit.

## 6 Anhang

### 6.1 Bezugsgerade zur quantitativen Bestimmung der Markersubstanzen

Zur quantitativen Bestimmung der Markersubstanzen wurde ausgehend von einer Stammlösung jeweils eine Bezugsgerade in folgenden Konzentrationsbereichen erstellt: ,03–50 µg/ml für p-Cumarsäure und 1,00–100 µg/ml für Salicin.

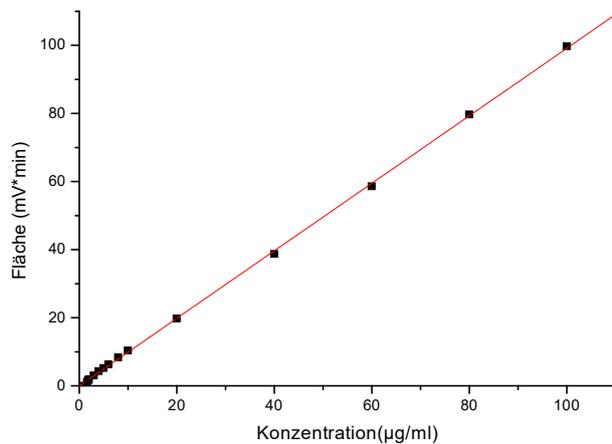


Abb. 55: Salicin in 70 % EtOH + NaOH, N = 4  
Korrelationsfunktion:  $Y = A + B * X$ ,  
 $R^2 = 0,99989$

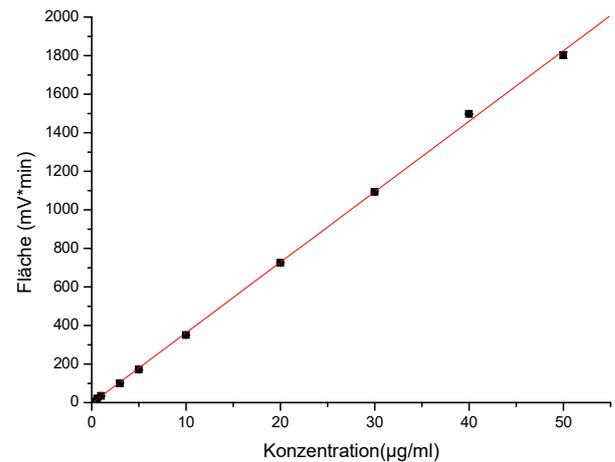


Abb. 56: p-Cumarsäure in 70 % EtOH + NaOH, N = 4  
Korrelationsfunktion:  $Y = A + B * X$ ,  
 $R^2 = 0,99977$

### 6.2 Chromatogramme der drei Standardsubstanzen Isomere (2-, 3- und 4-Hydroxyacetophenon) mit den dazugehörigen UV-Spektren

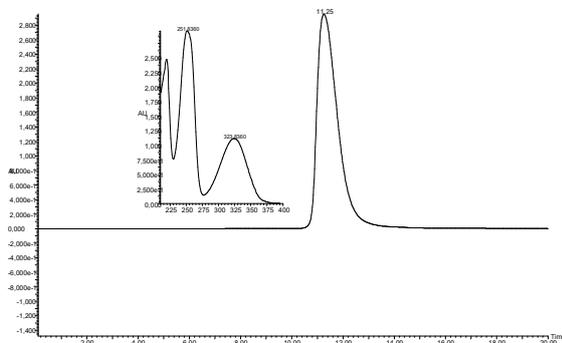


Abb. 57: Chromatogramm von 2- Hydroxyacetophenon bei 251 nm

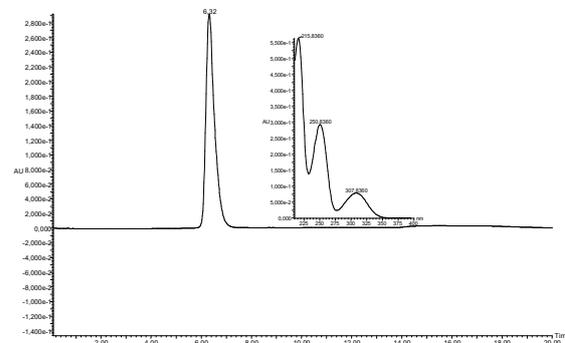


Abb. 58: Chromatogramm von 3-Hydroxyacetophenon bei 250 nm

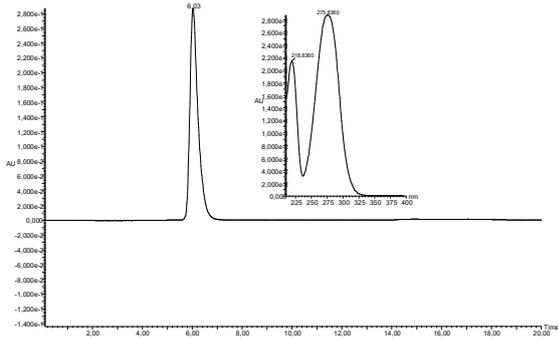


Abb. 59: Chromatogramm von 4-Hydroxyacetophenon bei 275 nm

## Literaturverzeichnis

1. Bode HB, Müller R. Der Einfluss bakterieller Genomik auf die Naturstoff-Forschung. *Angewandte Chemie*. 2005;117(42):6988-7007.
2. Hänsel R, Sticher O. *Pharmakognosie-Phytopharmazie*: Springer-Verlag; 2009.
3. Wink M. Pflanzliche Arzneimittel viel ungenutztes Potenzial. *BIOPRO BadenWürttemberg GmbH*. 2016.
4. Maier R. *LWF-Bayerische Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft*: Freising, LWF; 1998.
5. Bronowski, C.K., „Energieholzproduktion in der Landwirtschaft,“ *Bornimer Agartechnische Berichte*, p. Helft 35, 2004.
6. Trinkaus P. Vielfalt der Nutzungsmöglichkeiten von Balsam-Pappeln. *LANDLICHER RAUM*. 2001:17-.
7. Burger F. Potenziale von Energiewäldern auf landwirtschaftlichen Flächen. *AFZ/Der Wald, Allgemeine Forst Zeitschrift für Waldwirtschaft und Umweltvorsorge*. 2007;62(14):749-50.
8. Pan X, Kadla JF, Ehara K, Gilkes N, Saddler JN. Organosolv ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: relationship between lignin structure, extraction conditions, and antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006;54(16):5806-13.
9. Hanswerner M. UBU, Kubin A., Schemitz S. . *Naturstoffe: Naturkosmetik-Innovationen aus Pflanzen: Lichtschutz und Konservierung aus heimischen Pflanzenkulturen für naturkosmetische Erzeugnisse*. *Berichte aus Energie-und Umweltforschung*. 2002;19.
10. Scholz V. *Produktion von Pappeln und Weiden auf landwirtschaftlichen Flächen, Darmstadt Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft*; 2008.
11. Thieme H. The phenolic glycosides of the Salicaceae. I. General review (discovery, elucidation of structure, synthesis, occurrence). *Pharmazie, Govi-Verlag GmbH*. 1963;18:770-4.
12. Hegnauer R. *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Basel & Stuttgart: Birkhäuser. 1962.
13. Eckenwalder J. *Systematics and evolution of Populus. Biology of Populus and Its Implications for Management and Conservation*. National Research Council (Canada). NRC Research Press; 1996.
14. Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*. 2006;313(5793):1596-604.

15. Loeschcke V, Francksen H. Trichocarpin, ein neues als Resistenzfaktor bedeutsames Phenolglykosid aus Pappelrinde. *Naturwissenschaften*. 1964;51(6):140-.
16. Hegnauer R. *Chemotaxonomie der Pflanzen: B. Chemische Charakterzüge der Leguminosae*: Birkhäuser Basel. 241-256. ; 1994.
17. Dingermann T, Loew D. *Phytopharmakologie: experimentelle und klinische Pharmakologie pflanzlicher Arzneimittel; mit 75 Tabellen*: Wiss. Verlag-Ges.; 2003.
18. Okpanyi S, Schirpke-von Paczensky R, Dickson D. Antiphlogistische, analgetische und antipyretische Wirkung unterschiedlicher Pflanzenextrakte und deren Kombination im Tiermodell. *Arzneimittel-Forschung*. 1989;39(6):698-703.
19. El-Ghazaly M, Khayyal M, Okpanyi S, Arens-Corell M. Study of the anti-inflammatory activity of *Populus tremula*, *Solidago virgaurea* and *Fraxinus excelsior*. *Arzneimittel-Forschung*. 1992;42(3):333-6.
20. Meyer B, Schneider W, Elstner E. Antioxidative properties of alcoholic extracts from *Fraxinus excelsior*, *Populus tremula* and *Solidago virgaurea*. *Arzneimittel-Forschung*. 1995;45(2):174-6.
21. Schempp H, Weiser D, Elstner EF. Biochemical model reactions indicative of inflammatory processes. *Arzneimittelforschung*. 2000;50(04):362-72.
22. Ernst E. The efficacy of phytodolor for the treatment of musculoskeletal pain- a systematic review of randomized clinical trials. *Natural Medicine Online*. 2000;3(2).
23. Huber V. Therapie degenerativer rheumatischer Erkrankungen. *Fortschr Med*. 1991; 109: 248-50.
24. Hausen B, Wollenweber E, Senff H, Post B. Propolis allergy.(II). The sensitizing properties of 1, 1-dimethylallyl caffeic acid ester. *Contact Dermatitis*. 1987;17(3):171-7.
25. Bankova V. Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2005;2(1):29-32.
26. Hausen B, Wollenweber E, Senff H, Post B. Propolis allergy, Origin, properties, usage and literature review. *Contact Dermatitis*. 1987;17(3):163-70.
27. Hausen B, Wollenweber E. Propolis allergy.(III). Sensitization studies with minor constituents. *Contact Dermatitis*. 1988;19(4):296.
28. Hausen B, Evers P, Stüwe HT, König W, Wollenweber E. Propolis allergy (IV) Studies with further sensitizers from propolis and constituents common to propolis, poplar buds and balsam of Peru. *Contact Dermatitis*. 1992;26(1):34-44.
29. Dingermann T, Loew D. *Phytopharmakologie. Experimentell und klinische Pharmakologie pflanzlicher Arzneimittel*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. S; 2003.

30. Foetsch G, Pfeifer S. Vergleichende Serumspiegeluntersuchung von Salicylsäure nach oraler Applikation von Salicin bzw. Natriumsalicylat in Ratten. *Pharmazie*. 1990; 45(7):535-6.
31. Kuhlen FJ. Historisches zum Thema Schmerz und Schmerztherapie: Zwischen „Strafe Gottes“ und „göttlichem Werk“. *Pharmazie in unserer Zeit*. 2002;31(1):13-22.
32. Wollenweber E, Hausen B, Greenaway W. Phenolic constituents and sensitizing properties of propolis, poplar balsam and balsam of Peru. *Bulletin de Liaison-Groupe Polyphenols*. 1990;15:112-20.
33. Lagoni N. Die Schwarzpappel in der Heilkunde. *Berichte der Bayerischen Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft*. 2006;11(52):69-72.
34. Benecke R. Über das Vorkommen von Phenolglucosiden und die jahreszeitlich bedingten Veränderungen der Glucosidkonzentrationen in einigen Populus-Arten. *General review*. 1970;18(11):780-8.
35. Thieme H. Vorkommen und Verbreitung von Phenolglucosiden in der Familie der Salicaceen. *Poznan Inst Przemyslu Zielarskiego Biul*. 1971.
36. Thieme H, Benecke R. Phenolglycosides of Salicaceae. 7. Glycoside content of domestic middle European cultivated Populus species. *Die Pharmazie*. 1970;25(12):780-9.
37. Whatley F, Greenaway W, May J. Populus candicans and the Balm of Gilead. *Zeitschrift für Naturforschung C, Journal of biosciences*. 1989;44(5-6):353-6.
38. Greenaway W, May J, Scaysbrook T, Whatley F. Compositions of bud and leaf exudates of some Populus species. *Zeitschrift für Naturforschung Section-C, Biosciences*. 1992;47(5-6):329.
39. Greenaway W, English S, Whatley F, Rood S. Interrelationships of poplars in a hybrid swarm as studied by gas chromatography-mass spectrometry. *Canadian journal of botany*. 1991;69(1):203-8.
40. Greenaway W, Whatley F. Resolution of complex mixtures of phenolics in poplar bud exudate by analysis of gas chromatography—mass spectrometry data. *Journal of Chromatography A*. 1990;519(1):145-58.
41. Greenaway W, English S, Wollenweber E, Whatley F. Series of novel flavanones identified by gas chromatography-mass spectrometry in bud exudate of Populus fremontii and Populus maximowiczii. *Journal of Chromatography A*. 1989;481:352-7.
42. Greenaway W, May J, Whatley F. Flavonoid aglycones identified by gas chromatography-mass spectrometry in bud exudate of Populus balsamifera. *Journal of chromatography A*. 1989;472(Copyright (C) 2013 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.):393-400.
43. English S, Greenaway W, Whatley F. Analysis of phenolics of Populus trichocarpa bud exudate by GC-MS. *Phytochemistry*. 1991;30(2):531-3.

44. Kurkin VA, Braslavskii VB, Zapesochnaya GG. Study of extracts of propolis and *Populus balsamifera* buds by high-performance liquid chromatography. *Zh Fiz Khim.* 1994;68(10):1816-18.
45. Kurkin VA, Zapesochnaya GG, Braslavskii VB. Flavonoids of the buds of *Populus balsamifera*. *Chemistry of Natural Compounds.* 1990;26(2):224-5.
46. Greenaway W, English S, Whatley FR, Rood SB. Interrelationships of poplars in a hybrid swarm as studied by gas chromatography-mass spectrometry. *Canadian journal of botany.* 1991;69(1):203-8.
47. Isidorov VA, Vinogorova VT. GC-MS analysis of compounds extracted from buds of *Populus balsamifera* and *Populus nigra*. *Zeitschrift fur Naturforschung C.* 2003;58(5/6):355-60.
48. Thieme H. The phenolic glycosides of the Salicaceae. II. Isolation and detection. Pharmazie, Govi-Verlag GmbH. 1964;19(Copyright (C) 2013 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.):471-5.
49. Pearl I. Studies on the barks of the family Salicaceae. III. The alkaline hydrolysis of barks of several species of the genus *Populus*. *Tappi.* 1960;43(9):756-8.
50. Abramovitch R, Coutts R, Knaus E. Some extractives from the bark of *Populus balsamifera*. *Can J Pharm Sci.* 1967;2:71-4.
51. Thieme H. Die Phenolglykosside der Salicaceen. *Planta medica.* 1965;13(04):431-8.
52. Nardini M, Cirillo E, Natella F, Mencarelli D, Comisso A, Scaccini C. Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. *Food Chemistry.* 2002;79(1):119-24.
53. Warnant P, Mertens P, Marche C. Screening of poplar biomass for bio-active compounds: a simple method to assess antioxidant activity. *Bioresource technology.* 2004;93(1):43-8.
54. S. Ludewi SG, D. OrzesseK and C. Griehf. Bioactivesubstancesfromthebalsampoplar. *Renewable Resources and Biotechnology for Material Applications, New York: Nova Scienee; 2011. p. pp.333-46.*
55. Rucker G, Neugebauer M, Willems G. *Instrumentelle pharmazeutische Analytik.: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 2001.*
56. Hünig S, Kreitmeier P, Märkl G, Sauer J. *Arbeitsmethoden in der organischen Chemie mit Einführungspraktikum. Berlin: Lehmanns Verl.; 2008.*
57. *Hochleistungsflüssigkeitschromatographie 2015. Available from: <http://uni-mainz.de/FB/Biologie/Zoologie/abt1/polyzen/physiol/hplc.htm> .*
58. Schwedt G. *Analytische chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis: Wiley-VCH Weinheim; 2008.*

59. Adam KP, Becker H. Analytik biogener Arzneistoffe. Stuttgart: Wiss. Verlag-Ges.; 2000.
60. Engelhardt H, Beck W, Kohr J, Schmitt T. Kapillarelektrophorese methoden und möglichkeiten. Braunschweig, Wiesbaden: Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH; 1994.
61. Hiroyuki N, Terabe S. Micellar electrokinetic chromatography perspectives in drug analysis. *Journal of Chromatography A*. 1996;735(1):3-27.
62. G. Ackermann KB, J. Voigt, I. Wilke, K.-Th. Wilke. Chemische Tabellen und Rechentafeln für die analytische Praxis. *Zeitschrift für Chemie*. 1983;23(2):78-.
63. Association EM. Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology (CGMP/ICH/381/95); ICH topic Q2 (R1). European Medicines Association, London, United Kingdom. 1995.
64. Stahl PH. Feuchtigkeit und Trocknen in der pharmazeutischen Technologie: Springer; 1980.
65. Neubert R, Wohlrab W. In vitro methods for the biopharmaceutical evaluation of topical formulations. *Acta pharmaceutica technologica*. 1990;36(4):197-206.
66. Neubert R, Bendas C, Wohlrab W, Gienau B, Fürst W. A multilayer membrane system for modelling drug penetration into skin. *International journal of pharmaceutics*. 1991;75(1):89-94.
67. Deutsches Institut für Normung MMD. Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika. Deutsches Institut für Normung eV Berlin; 2011.
68. Fukumoto L, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2000;48(8):3597-604.
69. Malingre T. Die Stabilität von Pflanzenextrakten. *Pharm Ind*. 1969;31:15-20.
70. List PH, Schmidt PC. Technologie pflanzlicher Arzneizubereitungen: mit 67 Tabellen: Wiss. Verlag-Ges.; 1984.
71. Chu KK, Chow AH. Impact of carbohydrate constituents on moisture sorption of herbal extracts. *Pharmaceutical Research*. 2000;17(9):1133.
72. Voigt R. Pharmazeutische technologie: Dt. Apotheker-Verlag; 2006.
73. Danielson I, Lindmann B. The definition of microemulsion. *Colloid Surf*, Published by Elsevier BV. 1981;3(391392.3): 391-2.
74. Moulik SP, Paul BK. Structure, dynamics and transport properties of microemulsions. *Advances in Colloid and Interface science*. 1998;78(2):99-195.
75. Kreuter J, Swarbrick J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. by Swarbrick J, Boylan JC, Marcel Dekker, New York. 1994:165-90.

76. Hoar T, Schulman J. Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydro-micelle. *Nature*. 1943;152(3847):102.
77. Pistorius S. Entwicklung und Modifizierung von lidocain-HCl-haltigen Mikroemulsionen zur dermalen Anwendung. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. 1996.
78. Jahn K. Moderne galenische Zubereitungen zur dermalen Anwendung von Ciclosporin A und Mycophenolatmofetil: Dissertation, Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; 2002.
79. Graf E. Pharmazeutische Qualitätskontrolle. Hrsg. v. H. Feltkamp, P. Fuchs und H. Sucker; G. Thieme Verlag Stuttgart 1983, XXII, 931 S., 294 Abb., 205 Tab., geb. DM 380,-. *Pharmazie in unserer Zeit*. 1984;13(3):93-4.
80. Bauer KH, Bauer-Frömming-Führer, Egermann H, Frömming K-H, Führer C, Lippold BC. Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie: mit einer Einführung in die Biopharmazie; 95 Tabellen: Wiss. Verlag-Ges.; 2002.
81. H. T, RH. N. Biopharmazeutische Charakterisierung halbfester Arzneiformen Modellsysteme zur Untersuchung von Freisetzung und Penetration. *pharmazeutische wissenschaft leipzig storck verlag*. 2009;11:264-9.
82. Bendas B. Untersuchungen zum Mechanismus der in vitro-Penetration lipophiler Arzneistoffe aus binären und ternären Vehikelsystemen in künstliche und natürliche Akzeptoren: Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; 1993.
83. Knorst MT. Charakterisierung und Optimierung der Liberation und Penetration des Harnstoffs aus halbfesten Formulierungen: Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; 1997.
84. Podczeck F. Comparison of in vitro dissolution profiles by calculating mean dissolution time (MDT) or mean residence time (MRT). *International journal of pharmaceutics*, Elsevier. 1993;97(1-3):93-100.
85. Steiling W, Bracher M, Courtellemont P, De Silva O. The HET-CAM, a Useful In Vitro Assay for Assessing the Eye Irritation Properties of Cosmetic Formulations and Ingredients. *Toxicology in vitro*. 1999;13(2):375-84.
86. Köszegi D, Nothhelfer B, Leimbeck R. Der HET-CAM-Test (Hühner-Ei-Test-Chorioallantoismembran). *Euro Cosmetics*. 1999;6:29-33.
87. Wohlrab J. Der Einfluß von L-Arginin auf die Regulation der epidermalen Arginase: Shaker, Aachen 2001.

## **Danksagung**

Diese Doktorarbeit entstand am Institut für Technologie / Biopharmazie Fachbereich Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h. c. Reinhard Neubert.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Neubert für die Möglichkeit bedanken, in seiner Arbeitsgruppe diese Doktorarbeit anzufertigen. Nicht zuletzt durch die freundliche und engagierte Betreuung hat mir diese Arbeit viel Freude bereitet.

Außerdem gilt mein Dank Dr. Yahya Mrestani, der mich durch seine engagierte Betreuung und Diskussionsbereitschaft mit vielseitigen Denkanstößen bereicherte und mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt hat.

Dr. Peter Lindemann, Arbeitsgruppe Pharmazeutische Biotechnologie, danke ich, für die zur Verfügung Stellung der GC-/MS-Software enthaltene Spektren Bibliotheken. Ebenso gilt mein dank für Arbeitsgruppe, Fachhochschule Köthen, für die Zusammenarbeit.

Genauso danke ich Herrn Dr. C. Schmelzer, der mir bei Fragen zum Thema Computersoftware viele Dinge verständnisvoll erklärt und anschaulich gezeigt hat.

Frau H. Pötsch und Frau M. Woigk möchte ich besonders für ihre Unterstützung bei Fragen zur Durchführung der HPLC-DAD-MS Messungen und MMS danken.

Ich möchte allen Mitgliedern der AG Neubert danken, da sie für ein angenehmes Arbeitsklima und viele hilfreiche Diskussionen sorgten. Mein Dank gilt auch meinen Freunden, die mir mit Ideen und konstruktiven Ratschlägen zur Seite standen

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mir durch ihre fortwährende Unterstützung das Studium und diese Arbeit ermöglichten und sie mit Anteilnahme verfolgt haben.

# Lebenslauf

## Angaben zur Person

Name: Al-Mwalad  
Vorname: Rashad  
Geburtsdatum: 21/ 05 / 1978  
Geburtsort: Jemen

## Schulbildung

2002 Studienkolleg an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2002-2007 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

12/2007 – 05/2008 Pharmaziepraktikum an der Lutherapotheke in Halle (Saale)

09/2008 –02/2009 Diplomarbeit am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

04/2009 Erteilung der Approbation als Apotheker

28/05/2009 Verteidigung der Diplomarbeit „Untersuchung von Inhaltstoffen in der Wurzel der Salvia off. mittels HPLC-UV, HPLC-MS und CE „

Seit dem 01/06/2010 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Neubert an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe.

Insbesondere versichere ich, dass ich alle wörtlichen und sinngemäßen Übernahmen aus anderen Werken als solche kenntlich gemacht habe.

Die vorgelegte Arbeit ist weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt worden. Ich habe keine früheren erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Halle (Saale), 2021

AL-Mwalad Rashad