

**"Mikroverkapselung von bioaktiven Inhaltsstoffen aus der
Heidelbeere (*Vaccinium myrtillus* L.)"**

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

vorgelegt

von Herrn Dipl.-Pharm. Johannes Martin Oidtmann

geb. am: 30. August 1982 in: Berlin-Wilmersdorf

Gutachter:

1. Herr Prof. Dr. rer. nat. habil. Karsten Mäder
2. Herr Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h. c. Reinhard Neubert
3. Frau Prof. Dr. rer. nat. habil. Elke Richling

Datum der Verteidigung: 19. Februar 2013

Die Wissenschaft, richtig verstanden, heilt den Menschen von seinem Stolz;
denn sie zeigt ihm seine Grenzen.

Albert Schweitzer
(14.01.1875 - 04.09.1965)

I. Inhaltsverzeichnis

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. Inhaltsverzeichnis..... | II |
| II. Abkürzungsverzeichnis | V |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Vorstellung des Gesamtclusters | 3 |
| 1.2 Ziele der Arbeit..... | 4 |
| 2. Grundlagen | 6 |
| 2.1 Anthocyane | 6 |
| 2.2 Heidelbeeren und Anthocyane in Fertigarzneimitteln, Nahrungsergänzungsmitteln und Medizinprodukten | 9 |
| 2.3 Mikroverkapselung..... | 10 |
| 2.3.1 Mikroverkapselung von Anthocyanen..... | 12 |
| 3. Material und Methoden | 13 |
| 3.1 Materialien | 13 |
| 3.1.1 Gewinnung und Zusammensetzung des Heidelbeerextraktes | 13 |
| 3.1.2 Hartfett (Adeps solidus, Ph. Eur.) | 13 |
| 3.1.3 Molkenproteinisolat (MPI)..... | 14 |
| 3.1.4 Gereinigtes Wasser (Aqua purificata, Ph. Eur.)..... | 14 |
| 3.1.5 Weitere verwendete Materialien | 14 |
| 3.2 Kapselsysteme von Projektpartnern des Clusters | 16 |
| 3.2.1 Übersicht der Kapselsysteme | 16 |
| 3.2.2 Hohlkapseln aus amidiertem Pektin (AP) | 18 |
| 3.2.3 Molkenproteinisolat-Matrixpartikel (MP) | 19 |
| 3.2.4 Schellack überzogene Matrixkapseln aus amidiertem Pektin (SL)..... | 21 |
| 3.2.5 $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsionen (DE) | 22 |
| 3.2.5.1 Herstellung des Protein-Polysaccharid-Konjugatemulgators | 22 |
| 3.2.5.2 Herstellung der $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsion (DE)..... | 23 |
| 3.3 Methoden | 25 |
| 3.3.1 Charakterisierung des Heidelbeerextraktes..... | 25 |
| 3.3.1.1 Antioxidatives Potential der Heidelbeerextrakt-Anthocyane | 25 |
| 3.3.2 Lipid-Mikrokapseln (LMK)..... | 26 |
| 3.3.2.1 UV/Vis-spektroskopische Anthocyanbestimmung nach Giusti et al. | 26 |
| 3.3.2.1.1 Bestimmung der Inkorporationsrate | 27 |
| 3.3.2.2 Duale asymmetrische Zentrifuge - SpeedMixer™ | 29 |
| 3.3.2.3 Lichtmikroskopie..... | 29 |
| 3.3.2.4 Statische Lichtstreuung | 30 |
| 3.3.2.4.1 $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsionen | 30 |
| 3.3.2.5 Rasterelektronenmikroskopie (ESEM) | 30 |
| 3.3.2.6 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)..... | 30 |
| 3.3.2.7 Differenzialthermoanalyse (DSC)..... | 31 |

| | | |
|-----------|-------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.2.8 | Freisetzung..... | 31 |
| 3.3.3 | Charakterisierung der Kapselsysteme aus dem Cluster..... | 31 |
| 3.3.3.1 | Zusammensetzung der verwendeten Medien | 31 |
| 3.3.3.2 | Freisetzungsversuche | 32 |
| 3.3.3.2.1 | Versuchsdesign..... | 32 |
| 3.3.3.2.2 | HPLC-UV/Vis-Identifizierung und -Quantifizierung..... | 33 |
| 3.3.3.2.3 | Lipidanalytik: Pankreatintest..... | 35 |
| 3.3.3.2.4 | Hochauflösende Dünnschichtchromatographie (HPTLC) | 35 |
| 3.3.4 | Rheologische Untersuchungen an Molkenproteinisolat-Gelen..... | 36 |
| 3.3.4.1 | Gefäß-Wasserbad-Methode | 37 |
| 3.3.4.2 | Oszillierende Rheologie..... | 37 |
| 3.3.4.3 | Benchtop-NMR | 38 |
| 3.3.4.4 | Prüfung der Gelltextur | 39 |
| 3.3.5 | Datenauswertung..... | 40 |
| 4. | Ergebnisse und Diskussion..... | 41 |
| 4.1 | Charakterisierung Heidelbeerextrakt | 41 |
| 4.1.1 | Auftrennung der Anthocyane mittels HPLC-UV/Vis-Spektroskopie..... | 41 |
| 4.1.2 | Lösen des HBE in Puffersystemen | 41 |
| 4.1.2.1 | Antioxidatives Potential der Heidelbeerextrakt-Anthocyane | 42 |
| 4.2 | Lipidmikrokapseln (LMK) | 46 |
| 4.2.1 | Entwicklung der Lipidmikrokapseln..... | 46 |
| 4.2.1.1 | Hartfetttyp | 46 |
| 4.2.1.2 | Ermittlung der Emulgatoren und deren Konzentrationen | 47 |
| 4.2.1.3 | Variation des Volumens der inneren Phase | 48 |
| 4.2.1.4 | Zusammenfassung der Entwicklung der LMK | 49 |
| 4.2.2 | Becherglasmethode..... | 50 |
| 4.2.3 | SpeedMixer™ | 51 |
| 4.2.4 | Charakterisierung der Lipidmikrokapseln | 52 |
| 4.2.4.1 | Lichtmikroskopie..... | 52 |
| 4.2.4.2 | Statische Lichtstreuung (LD) | 54 |
| 4.2.4.3 | Vergleich: Becherglasmethode und SpeedMixer™ | 55 |
| 4.2.4.4 | Rasterelektronenmikroskopie (ESEM) | 56 |
| 4.2.4.5 | Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)..... | 57 |
| 4.2.4.6 | Differenzialthermoanalyse (DSC) | 59 |
| 4.2.4.7 | Freisetzung..... | 60 |
| 4.3 | Charakterisierung der Kapselsysteme aus dem Cluster..... | 63 |
| 4.3.1 | Freisetzungsversuche..... | 63 |
| 4.3.2 | Lipidanalytik | 70 |
| 4.3.2.1 | Partikelgrößenbestimmung..... | 70 |
| 4.3.2.2 | Pankreatintest..... | 71 |

I. Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|--------------------------------------------------------------------|-------|
| 4.3.2.3 | SGF | 71 |
| 4.3.2.4 | FaSSIF / FeSSIF | 73 |
| 4.4 | Vergleich Lipidmikrokapseln und Kapselsysteme aus dem Cluster..... | 80 |
| 4.5 | Rheologische Untersuchungen von Molkenprotein Gelen..... | 82 |
| 4.5.1 | Gelierungsmechanismus von Molkenproteinisolat | 82 |
| 4.5.2 | Gefäß-Wasserbad-Methode | 84 |
| 4.5.3 | Oszillierende Rheologie..... | 85 |
| 4.5.4 | Benchtop-NMR (BT-NMR)..... | 89 |
| 4.5.5 | Prüfung der Geltextur | 93 |
| 4.5.6 | Vergleich der angewendeten Methoden | 95 |
| 5. | Zusammenfassung und Ausblick | 98 |
| 6. | Literatur | IX |
| 7. | Publikationsliste | XVIII |
| 7.1 | Artikel..... | XVIII |
| 7.2 | Vorträge | XVIII |
| 7.3 | Poster..... | XIX |
| 7.4 | Berichte..... | XX |
| 8. | Danksagung | XXI |
| 9. | Lebenslauf..... | XXII |
| 10. | Selbstständigkeitserklärung | XXIII |

II. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| α -la | α -Lactalbumin |
| ABTS | 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat) |
| ADI | <i>engl.</i> : acceptable daily intake (erlaubte Tagesdosis) |
| AIF | Allianz Industrie Forschung |
| AMD | Altersbedingte Makuladegeneration |
| AP | Hohlkapseln aus amidiertem Pektin |
| Cy-3-ara | Cyanidin-3-O-arabinofuranosid |
| Cy-3-gal | Cyanidin-3-O-galactopyranosid |
| Cy-3-glc | Cyanidin-3-O-glucopyranosid |
| Cy-3-soph | Cyanidin-3-O-sophorosid |
| CLSM | <i>engl.</i> : confocal laser scanning microscope (konfokales Laser-Scanning-Mikroskop) |
| DA | Dalton |
| DAC | <i>engl.</i> : dual asymmetric centrifuge (Duale asymmetrische Zentrifuge) |
| DE | W ₁ /O/W ₂ -Doppelemulsion |
| Del-3-ara | Delphinidin-3-O-arabinofuranosid |
| Del-3-gal | Delphinidin-3-O-galactopyranosid |
| Del-3-glc | Delphinidin-3-O-glucopyranosid |
| Del-3-rut | Delphinidin-3-O-rutinosid |
| DFG | Deutsche Forschungsgemeinschaft |
| DG | Diglycerid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| DPPH | 2,2-Diphenyl-1-pikrylhydrazyl |
| ϵ | Extinktionskoeffizient [L/mol*cm] |
| ESEM | <i>engl.</i> : environmental scanning electron microscope (Rasterelektronenmikroskop) |
| ESR | Elektronenspinresonanz-Spektroskopie |
| FAO | <i>engl.</i> : Food and Agriculture Organization of the United Nations (Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen) |
| FaSSIF | <i>engl.</i> : fasted state simulated intestinal fluid (simulierter Darmsaft vor der Nahrungsaufnahme) |
| FeSSIF | <i>engl.</i> : fed state simulated intestinal fluid (simulierter Darmsaft nach der Nahrungsaufnahme) |
| FF | freie Fettsäure |
| g | Gramm |
| G' | Speichermodul |
| G'' | Verlustmodul |
| GIT | Gastrointestinaltrakt |
| GSE | (W ₁ /O/W ₂ -Doppelemulsion mit) Gallensalze als Emulgator |

II. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HBE | Heidelbeerextrakt |
| HPLC | <i>engl.</i> : high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) |
| HPMC | Hydroxypropylmethylcellulose |
| HPTLC | <i>engl.</i> : high performance thin layer chromatography (Hochauflösende Dünnschichtchromatographie) |
| ICD-10 | <i>engl.</i> : International statistical classification of diseases and related health problems (Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme) |
| IEP | Isoelektrischer Punkt |
| IS | Interner Standard |
| JECFA | <i>engl.</i> : Joint FAO / WHO Expert Committee on Food Additives (Gemeinsamer FAO / WHO-Sachverständigenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe) |
| KE | (W ₁ /O/W ₂ -Doppelemulsion mit) Protein-Polysaccharid-Konjugatemulgator |
| L | Liter |
| LMK | Lipidmikrokapseln |
| LOD | <i>engl.</i> : limit of detection (Limit der Detektion) |
| LOQ | <i>engl.</i> : limit of quantification (Limit der Quantifizierung) |
| m/m | Masse pro Masse |
| m/V | Masse pro Volumen |
| Mal-3-ara | Malvidin-3-O-arabinofuranosid |
| Mal-3-glc | Malvidin-3-O-glucopyranosid |
| mg | Milligramm |
| MG | Monoglycerid |
| M _w | <i>engl.</i> : molecular weight (Molekulargewicht) [g/mol] |
| mL | Milliliter |
| MP | Molkenproteinisolat-Matrixpartikel |
| MPI | Molkenproteinisolat |
| MRI | <i>engl.</i> : Magnetic Resonance Imaging |
| MRT | (Magnetresonanztomographie) |
| Peo-3-ara | Peonidin-3-O-arabinofuranosid |
| Peo-3-gal | Peonidin-3-O-galactopyranosid |
| Peo-3-glc | Peonidin-3-O-glucopyranosid |
| Pet-3-ara | Petunidin-3-O-arabinofuranosid |
| Pet-3-gal | Petunidin-3-O-galactopyranosid |
| Pet-3-glc | Petunidin-3-O-glucopyranosid |
| Ph. Eur. | <i>lat.</i> : Pharmacopoea Europaea (Europäisches Arzneibuch) |

II. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| qs | <i>lat.</i> : quantum satis (so viel wie nötig) |
| REM | Rasterelektronenmikroskop |
| ROS | <i>engl.</i> : reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies) |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| S/N | Signal-Rausch-Verhältnis |
| SGF | <i>engl.</i> : simulated gastric fluid (simulierter Magensaft) |
| SL | Schellack überzogene Matrixkapseln aus amidiertem Pektin |
| SOD | Superoxid Dismutase |
| β-Ig | β-Lactoglobulin |
| TEAC | <i>engl.</i> : Trolox equivalent antioxidative capacity (Trolox-äquivalente Kapazität) |
| TG | Triglycerid |
| TP | Teilprojekt |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| USP | <i>engl.</i> : United States Pharmacopeia (Arzneibuch der Vereinigten Staaten von Amerika) |
| V | Volumen |
| VF | Verdünnungsfaktor |
| WHO | <i>engl.</i> : World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation) |
| ZZuIV | Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken |

1. Einleitung

Krebserkrankungen haben nach ICD-10 eine zunehmende Inzidenz in Deutschland: Im Jahr 2006 gab es in Deutschland laut Robert Koch-Institut 426.800 Neuerkrankungen (Frauen: 229.200, Männer: 197.600) und 210.930 Sterbefälle (Frauen: 112.438, Männer: 98.492) auf Grund maligner Tumore ¹. Beeinflusst durch den demographischen Wandel der deutschen Bevölkerung nimmt die Prävalenz der Krebserkrankungen weiter zu ². Für die pharmazeutische Industrie ist dieser Markt von großem Interesse. Im Bereich der Onkologie waren 2010 ca. 400 neue Wirkstoffe von etwa 180 pharmazeutischen Herstellern in der Entwicklung. Es ist davon auszugehen, dass etwa 80 bis 90 % dieser Kandidaten auf Grund von negativen Studiendaten nicht bis zur Markteinführung gelangen ². In den letzten drei Jahren wurden in Deutschland insgesamt zwölf neue Wirkstoffe zur Behandlung verschiedener Tumore zugelassen (2009: fünf, 2010: drei, 2011: vier) ³⁻⁵. Trotz dieser positiv erscheinenden Zahlen haben Tumorerkrankungen, wie beispielsweise der Lunge oder der Speiseröhre (< 20 % fünf-Jahres-Überlebensrate) bzw. der Bauchspeicheldrüse (< 10 % fünf-Jahres-Überlebensrate), weiterhin schlechte Prognosen ¹. Nach Brustkrebs bei den Frauen und Prostatakrebs bei den Männern ist Darmkrebs die zweithäufigste Krebserkrankung ¹. Zum Begriff Darmkrebs werden Karzinome des Dickdarms, des Mastdarms und (seltener) des Afters zusammengefasst. Faktoren, welche die Entstehung von Karzinomen des Dickdarms fördern, sind unter anderem Übergewicht, Mangel an Bewegung und falsche Ernährung mit zu viel (gepökeltem) Fleisch und Wurstwaren gepaart mit einer unzureichenden Obst- und Gemüsezufuhr ⁶.

Die Entstehung eines Karzinoms kann vereinfacht in drei Abschnitte unterteilt werden ⁷:

1. Initiierung (hervorgerufen von reversiblen, nicht letalen Schäden an der DNS der Zellen durch Tumor-Initiatoren)
2. Förderung (unter weiterer Einwirkung des Tumor-Initiators, reversible Stimulierung des Wachstums der beschädigten Zellen)
3. Entwicklung (irreversible zelluläre und molekulare Veränderungen der Zellen, d. h. Übergang der Zelle von dem benignen in den malignen Status).

In allen drei Phasen können reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als Tumor-Promotoren am Fortschreiten der Tumorentwicklung beteiligt sein ⁸. ROS entstehen durch endogene (Mitochondrien, Cytochrom-P450-Metabolisierungen, Macrophagen) und exogene Faktoren (chlorierte Verbindungen, durch Metallionen induzierte Fenton-Reaktion, Bestrahlungen) ⁹. Bereits in der Phase der Initiierung induzieren die ROS durch den Austausch von Guanin (Purin-Base) und Thymin (Pyrimidin-Base) Schäden an der DNS ¹⁰. Die dadurch entstehende Zellmutation kann zu einer Tumorbildung führen. Natürlich vorkommende enzymatische Abwehrmechanismen der ROS, wie beispielsweise die Superoxid-Dismutase,

1. Einleitung

die Catalase und die Gluthathion-Peroxidase, werden durch Tumor-Promotoren inhibiert⁷. Nicht enzymatische Abwehrprozesse der ROS, die z. B. durch Substanzen mit Radikalfängereigenschaften ausgelöst werden, wie beispielsweise Ascorbinsäure, α -Tocopherol oder β -Carotin, werden durch Tumor-Promotoren dagegen nicht inhibiert¹¹. Diese exogenen Substanzen sind trotz der Blockade der primären Abwehrmechanismen in der Lage ROS abzubauen. In zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass die polyphenolischen Anthocyane als exogene Substanz eine antioxidative Kapazität aufweisen und ROS antioxidativ eliminieren können¹²⁻¹⁵. Heidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.) stellen eine wichtige Quelle für diese sekundären Pflanzeninhaltsstoffe dar¹⁶⁻¹⁸ (s. Kapitel 2.1). Sie besitzen auf Grund des hohen Anteils an Anthocyanen eine im Vergleich zu anderen Obst und Gemüsearten sehr hohe antioxidative Kapazität. Es ist bekannt, dass ein Gesamtextrakt im Tierversuch eine krebspräventive Wirkung zeigt¹⁹.

Zahlreiche epidemiologische Studien mit sowohl retrospektiver als auch prospektiver Anlage konnten Obst und Gemüse als die Lebensmittelgruppe identifizieren, deren Verzehr besonders stark invers mit dem Erkrankungsrisiko korreliert^{20,21}. In ihren Arbeiten zeigen Key und Mitarbeiter, dass die Ernährung in der Prävention von Krebserkrankungen eine bedeutende Rolle spielt^{6,22}. Für Deutschland liegt die Verzehrsempfehlung der Deutschen Gesellschaft für Ernährung bei 650 g Obst und Gemüse pro Tag. In der Praxis werden jedoch höchstens 2/3 davon erreicht. Vor diesem Hintergrund stellt die Formulierung neuer (konventioneller wie funktioneller) Lebensmittel auf der Basis von Gemüse und Obst eine aktuelle Entwicklung dar, die zu einer Verbesserung der Ernährungssituation beitragen kann. Heidelbeeren sowie andere Früchte (Cranberrys) und natürliche Substanzen (Curcumin, Lutein) werden auf Grund ihrer positiven Effekte auf den menschlichen Stoffwechsel häufig als Nahrungsergänzungsmittel angeboten. Neben den Nahrungsergänzungsmitteln gibt es funktionelle Lebensmittel und „Neutraceuticals“. Beide stellen die Verschmelzung des pharmazeutischen und des Lebensmittelsektors dar. Derartige funktionelle Lebensmittel und „Neutraceuticals“ sind im Gegensatz zu den Nahrungsergänzungsmitteln nicht eindeutig definiert. Der Begriff „Neutraceutical“ ist vor allem durch das Marketing geprägt²³. Nahrungsergänzungsmittel stellen eine von der Nahrung eigenständige Darreichungsform dar und werden unabhängig von der Nahrung als Tablette, Kapsel oder in flüssiger Form eingenommen²⁴. Funktionelle Lebensmittel und „Neutraceuticals“ stellen dagegen konventionelle Lebensmittel dar, die mit aktiven Substanzen angereichert worden sind und daher einen medizinischen oder gesundheitlichen Nutzen haben. Die Palette und Anwendungsbereiche an kommerziell erhältlichen anthocyanhaltigen Nahrungsergänzungsmitteln ist vielfältig (s. Kapitel 2.2). Ergänzend dazu sind in der Literatur „Neutraceuticals“, die reich an Anthocyanen sind, genannt²⁵.

Um die protektive Wirkung der Anthocyane bei lokalen Erkrankungen des Kolons zu nutzen, müssen diese möglichst intakt den Wirkort erreichen. Die Mikroverkapselung (s. Kapitel 2.3) stellt eine Möglichkeit dar, Anthocyane auf dem Weg zum Kolon vor dem frühzeitigen Abbau im menschlichen Organismus zu schützen (s. Kapitel 2.1). Ein weiterer Vorteil von mikropartikulären Systemen ist die gleichmäßigere Passagezeit durch den Magen-Darm-Trakt, da deren Passage in geringerem Maße abhängig vom Füllungszustand des Magens ist.

1.1 Vorstellung des Gesamtclusters

Die vorliegende Dissertation war in das DFG / AIF Clusterprojekt "Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen" als TP 6 (DFG MA 1648/6-1) eingebettet. Gemeinsames Ziel des Clusterprojektes war es, durch den wissenschaftlichen Austausch zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen unterschiedliche mikropartikuläre Verkapselungssysteme zu entwickeln und zu charakterisieren, in denen Anthocyane aus der Heidelbeere (*Vaccinium myrtillus* L.) inkorporiert sind. Das Forschungscluster setzte sich aus mehreren Teilprojekten zusammen. Teilprojekt 1 (TP 1) beschäftigte sich mit der Isolierung der Anthocyane sowie bestimmter Anthocyanfraktionen aus dem Heidelbeerextrakt (HBE). Ziel der TP 2-5 war die Entwicklung mikropartikulärer Systeme, in denen Anthocyane des HBE inkorporiert sind. In den TP 6 und 7 wurden die in den TP 2-5 entwickelten Kapselsysteme sowie die verwendeten Hilfsstoffe und der reine HBE bzw. die isolierten Anthocyane charakterisiert.

Abbildung 1.1-1 zeigt die Einbettung und Vernetzung der vorliegenden Dissertation (TP 6) in das Clusterprojekt. Das Projektziel, den wissenschaftlichen Austausch durch Kooperationen mit den anderen im Cluster vertretenen TP durchzuführen und dadurch die Entwicklung und Optimierung der mikropartikulären Systeme zu fördern, wurde erreicht²⁶. Zusätzlich wurden an das Cluster angelehnte Forschungsthemen bearbeitet. Eine Auswahl dieser Ergebnisse wird in den folgenden Kapiteln dieser Dissertation präsentiert.

1. Einleitung

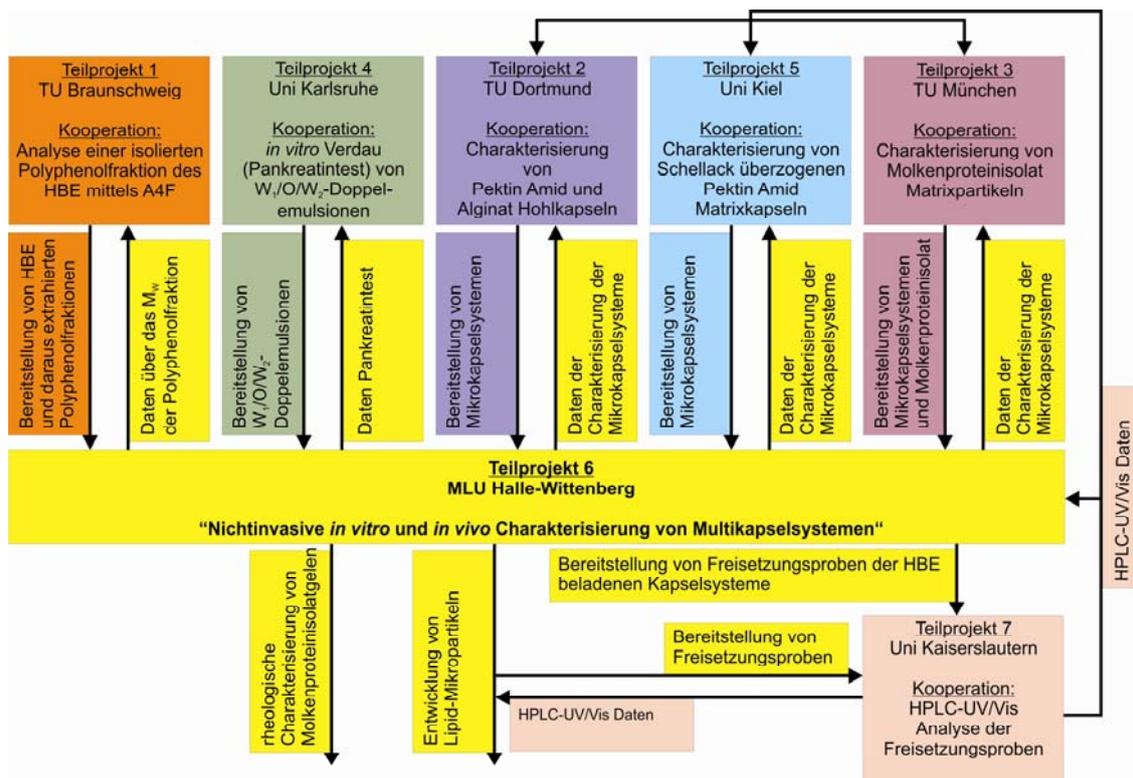


Abbildung 1.1-1 Einbettung und Kooperationen (gelb) der vorliegenden Dissertation (TP 6) in das DFG / AIF Clusterprojekt "Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen".

1.2 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, mikropartikuläre Systeme zu entwickeln und diese zu charakterisieren. Die entwickelten Mikrokapseln sollten die Hauptinhaltsstoffe der Heidelbeere (*Vaccinium myrtillus* L.), die Anthocyane, nach oraler Applikation stabilisieren und vor äußeren Einflüssen geschützt zum Wirkort im Darm transportieren. Für dieses Ziel sollte ein mikropartikuläres System, basierend auf Hartfett, anhand einer $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsionsmethode entwickelt werden. Diese Methode sollte anschließend auf ein in der Pharmazeutischen Technologie bisher selten eingesetztes Mischsystem, der dualen asymmetrischen Zentrifuge (SpeedMixer™), übertragen werden. Auf den Einsatz von Hilfsstoffen, die vorwiegend in der pharmazeutischen Industrie verwendet werden, wie beispielsweise Polymethacrylate (Eudragit®), sollte verzichtet werden. Die bei der Entwicklung der Lipid-Mikrokapseln (LMK) verwendeten Hilfsstoffe sollten alle E-Nummernkennzeichnungen aufweisen und im Nahrungsmittelbereich zugelassen sein. Im Anschluss sollten diese entwickelten Lipid-Mikrokapseln vergleichend charakterisiert werden. Abschließend sollten die Freisetzungseigenschaften dieser LMK bestimmt werden.

Durch die Einbindung in den Forschungsverbund des DFG / AIF Projektes waren einige Ziele dieser Dissertation eng mit den Zielstellungen dieses Projektes verknüpft. Die Charakterisierung der im Rahmen des Projekts von den Projektpartnern entwickelten

mikropartikulären Systeme war von großer Bedeutung. Dafür sollten die Kapselsysteme dem physiologischen Verlauf der Nahrung folgend in einem das Magenmilieu simulierenden Medium (simulierter Magensaft) analysiert werden. Daran anschließend sollten die Kapselsysteme in den Dünndarm simulierenden Medien (FaSSIF und FeSSIF) inkubiert werden. Die für diese Fragestellung verwendeten Medien sollten als Grundlage für die Entwicklung einer Methode für die Charakterisierung der Anthocyanfreisetzung der im Cluster verwendeten Kapselsysteme dienen. Dabei sollten bestehende Methoden, wie der Pankreatintest, auf die im TP 4 entwickelten $W_1/O/W_2$ -Doppелеmulsionen übertragen werden. Ziel war es, den Einfluss des in der Doppелеmulsion verwendeten Öls sowie der verwendeten Emulgatoren auf den Lipidverdau zu analysieren. Abschließend sollten die Freisetzungseigenschaften der LMK und der im Cluster entwickelten mikropartikulären Systeme verglichen werden. Für die Optimierung des Herstellungsprozesses des im TP 3 entwickelten MP-Systems (s. Kapitel 3.1.3) sollten die dort verwendeten MPI-Sole mit verschiedenen Methoden (Gefäß-Wasserbad-Methode, Oszillierende Rheologie, Benchtop-NMR und Texture Analyzer) vergleichend rheologisch charakterisiert werden. Für diese rheologische Charakterisierung der Molkenproteinisolat-Gele wurden die pH-Werte der Gele auf die Werte, wie sie beim Verkapselungsprozess vorherrschen, eingestellt. MPI-Gele mit derartig niedrigen pH-Werten wurden bisher noch nicht rheologisch charakterisiert.

Zusammengefasst waren die Ziele der vorliegenden Dissertation:

- die Entwicklung eines Mikrokapselsystems auf der Basis von Hartfett und die Übertragung dieser Methode auf den SpeedMixerTM
- die vergleichende Charakterisierung der entwickelten Lipid-Mikrokapseln
- die Übertragung des Pankreatintests als *in vitro* Modell für den Lipidverdau zur Charakterisierung der im Cluster entwickelten $W_1/O/W_2$ -Doppелеmulsionen
- die Entwicklung einer Methode für die *in vitro* Freisetzung der verkapselten Anthocyane aus den im Cluster entwickelten mikropartikulären Systemen
- die rheologische Charakterisierung des in der Pharmazeutischen Technologie bisher kaum eingesetzten Hilfsstoffes Molkenproteinisolat unter Anwendung von vier Methoden (Gefäß-Wasserbad-Methode, Oszillierende Rheologie, Benchtop-NMR und Texture Analyzer).

2. Grundlagen

2.1 Anthocyane

Anthocyane (altgriechisch: *ánthos* = Blüte und *kyáneos* = dunkelblau) sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und gehören zu der Gruppe der Flavonoide (Grundstruktur s. Abbildung 2.1-1)^{27,28}. Die Biosynthese erfolgt über den Shikimatweg²⁹. Anthocyane werden in die mit Zuckerresten konjugierten glykosidischen Anthocyane und ihre Aglyka, die Anthocyanidine, differenziert³⁰. Anthocyanidine treten in der Natur jedoch kaum auf. Im Gegensatz zu den Anthocyanen sind die Anthocyanidine wasserunlöslich³¹. Im Vergleich mit anderen Flavonoiden bestehen die Anthocyane aus einem Flavyliumkation, welche sich in der Anzahl und Position der Hydroxyl- und Methoxygruppen am B-Ring unterscheiden^{18,32,33}. Die glykosidische Bindung (α - oder β -O-glykosidisch) der Aglyka mit Zuckerresten wie beispielsweise Glukose, Galaktose, Arabinose und seltener Rhamnose oder Xylose befindet sich immer an Position 3. Weitere Zuckerreste können an Position 5 und 7 bzw. an 3' und 5' (sehr selten) binden²⁸.

| Aglykon | R ₁ | R ₂ | M _w |
|--------------|------------------|------------------|----------------|
| Pelargonidin | H | H | 271 |
| Cyanidin | OH | H | 287 |
| Delphinidin | OH | OH | 303 |
| Petunidin | OH | OCH ₃ | 317 |
| Peonidin | OCH ₃ | H | 301 |
| Malvidin | OCH ₃ | OCH ₃ | 331 |

R₃ = Glukose, Galaktose oder Arabinose

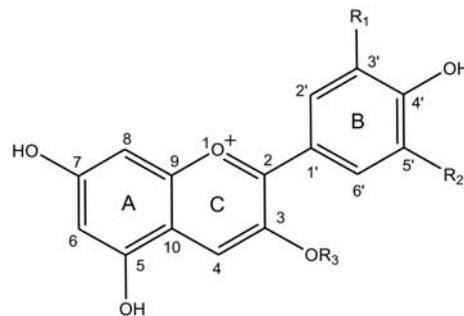


Abbildung 2.1-1 Grundstruktur einiger ausgewählter Anthocyane (modifiziert nach³⁴)

Anthocyane sind im gesamten Pflanzenreich vertreten. Lokalisiert sind sie vor allem in den Vakuolen von Blüten- und Fruchtzellen³⁵⁻³⁷. Bedingt durch ihre Struktur sind die Anthocyane für die Färbung verantwortlich^{32,38}. Dabei sind Farbe und Stabilität der Anthocyane abhängig vom umgebenden pH-Milieu. Bei sauren pH-Werten (~ pH 2) existieren die Anthocyane als stabile, rot gefärbte Flavyliumkationen. Bei einem Anstieg des pH-Wertes zu pH 6-8 bildet sich durch die Abgabe von Protonen die blau gefärbte, instabile chinoide Base (s. Abbildung 2.1-2)^{34,39}. Diese durch eine Änderung des pH-Wertes induzierte Instabilität führt zu einer Abnahme der Bioverfügbarkeit^{33,40}.

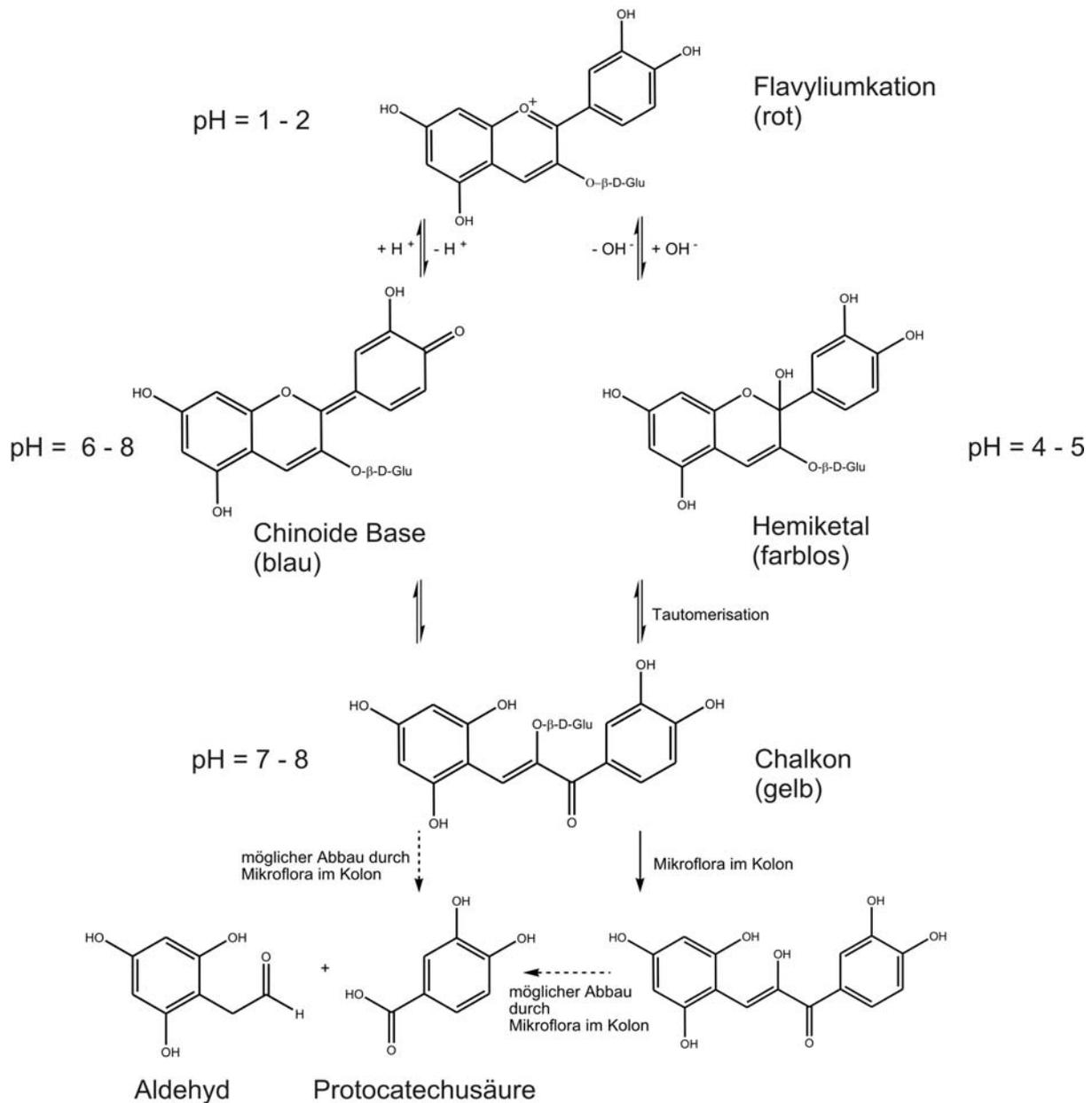


Abbildung 2.1-2 pH-Wert abhängige Änderungen der Struktur der Anthocyane am Beispiel von Cyanidin-3-O-glucosid (nach ^{33,34})

In den vergangenen Jahrzehnten ist das Interesse an Anthocyanen durch die zunehmenden Anzeichen von positiven biologischen Effekten nach oraler Aufnahme gestiegen ⁴¹. Bei der Entstehung vieler Krankheiten, wie Morbus Crohn, Katarakt, Arthritis sowie bei koronaren Herzerkrankungen wird die Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) diskutiert. Auch bei der Entstehung von Karzinomen wirken ROS auf die Zell-DNS ein ³³. Zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Studien zeigen, dass anthocyanreiche Beeren als starke Antioxidantien agieren ^{14,42-44}, das Wachstum von Tumorzellen vor allem im Colon hemmen ⁴⁵⁻⁴⁷, Apoptose verursachen ^{48,49} und antikarzinogene Eigenschaften aufweisen ^{19,50}. Für ihre antioxidative Aktivität ist die polyphenolische Struktur verantwortlich ¹⁵. Dabei werden Elektronen oder Wasserstoffatome von den Hydroxylgruppen auf die freien Radikale übertragen, wodurch

2. Grundlagen

eine Radikalkettenreaktion unterbunden wird ⁵¹ (s. Kapitel 4.1.2.1). Auf diesem Wissen basierend werden Anthocyane häufig in der humanen Ernährung konsumiert. In Bayern werden pro Tag pro Person ca. 2,7 mg Anthocyane verzehrt ⁵². In den USA liegt der tägliche Verzehr an Anthocyanen pro Person bei 12,5 mg pro Tag ³⁰ und in Finnland bei 82 mg pro Tag ⁵³. Auf Grund verschiedener Methoden der Detektion und Auswertung von Anthocyanen und deren Metaboliten sind diese Daten jedoch nicht eindeutig vergleichbar. Daten zu Dosierungsempfehlungen von Anthocyanen existieren nicht. Der gemeinsame Sachverständigenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe von FAO und der WHO legte 1982 einen ADI Wert für Anthocyane von 2,5 mg/kg Körpergewicht fest ⁵⁴. Anthocyane sind als Zusatzstoffe in Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (meistens als Färbemittel) mit der E-Nummer E 163 zugelassen. Auf Grund der 15 verschiedenen Anthocyane, die in der Heidelbeere (*Vaccinium myrtillus* L.) vorkommen, stellt diese eine der reichhaltigsten Anthocyanquellen dar ¹⁶⁻¹⁸. In Tabelle 2.1-1 sind die Anthocyanengehalte verschiedener Früchte und Gemüse im Vergleich mit Rotwein aufgelistet.

Tabelle 2.1-1 Anthocyanengehalte verschiedener Früchte und Gemüse im Vergleich mit Rotwein (nach ⁵⁵)

| Lebensmittel | Anthocyanengehalt [mg / 100 g Frischgewicht] | Hauptverbindung |
|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------|
| Holunderbeere (<i>Sambucus nigra</i>) | 1374 | Cy-3-glc |
| Himbeere (<i>Rubus occidentalis</i>) | 687 | Cy-3-soph |
| Wildheidelbeere (<i>Vaccinium myrtillus</i>) | 487 | Del-3-glc |
| Johannisbeere (<i>Ribes nigrum</i>) | 476 | Del-3-rut |
| Rotkohl (<i>Brassica oleracea convar. capitata var. rubra</i>) | 322 | Del-3-glc |
| Kulturheidelbeere (<i>Vaccinium corymbosum</i>) | 180 | Del-3-glc |
| Cranberry (<i>Vaccinium macrocarpon</i>) | 140 | Peo-3-gal |
| Rotwein | 67 | Mal-3-glc |

Für pharmakologische Effekte sind nicht alleine anthocyanhaltige Nahrungs- bzw. Nahrungsergänzungsmittel von Interesse. Am jeweiligen Wirkort muss eine ausreichende Anthocyankonzentration sichergestellt sein. Eine geringe Menge der zugeführten Anthocyane wird bereits im Magen aufgenommen. Der überwiegende Anteil der Anthocyane wird jedoch erst im Dünndarm resorbiert ⁵⁵ und gelangt über den systemischen Kreislauf in

2. Grundlagen

die Organe. Bei der Absorption spielt der Glykosilierungsstatus eine entscheidende Rolle. Die hydrophoben Aglyka werden durch passive Diffusion in das Darmepithel aufgenommen, die hydrophilen Glykoside über aktive Natrium-Glukose-co-Transporter⁵⁶. Der größte Anteil der zugeführten Anthocyane wird jedoch nicht resorbiert. Bei der Passage des Gastrointestinaltraktes werden die nicht resorbierten Anthocyane bedingt durch den steigenden pH-Wert in den einzelnen Darmabschnitten abgebaut (s. Abbildung 2.1-2)³⁹. Eine weitere Möglichkeit des Abbaus besteht durch die Mikroflora des Darms, vor allem im Kolon. Ein Teil der Abbauprodukte (Anthocyanidine, Protocatechusäure) wird dort resorbiert und gelangt in den systematischen Kreislauf⁵⁷. Die resorbierten Anthocyane werden in der Leber metabolisiert (glucuronidiert, methyliert oder sulfatiert)⁵⁵ und gelangen über den enterohepatischen Kreislauf in den Darm zurück. Der größte Anteil der Anthocyane sowie deren Metabolisierungs- und Abbauprodukte werden über den Fäces ausgeschieden. Die Nieren spielen bei der Elimination nur eine untergeordnete Rolle⁵⁶. Dies belegen Daten einer Studie von González-Barrio *et al.*⁵⁸. Zehn freiwillige Probanden mit einem Ileostoma konsumierten 300 g Himbeeren. Die Resultate zeigten keine detektierbaren Anthocyankonzentrationen im Plasma, weniger als 0,1 % im Urin jedoch 40 % in den ilealen Ausscheidungen.

2.2 Heidelbeeren und Anthocyane in Fertigarzneimitteln, Nahrungsergänzungsmitteln und Medizinprodukten

In der Pharmazie werden Heidelbeeren traditionell bei Diarrhö angewendet. Die getrockneten Früchte werden als Tee zubereitet appliziert. Die Wirkung beruht bei dieser Anwendung hauptsächlich auf den adstringierenden Eigenschaften der in den Heidelbeeren enthaltenen Gerbstoffe und nicht auf den Anthocyanen.

Anthocyane sind als (wirksame) Bestandteile in Medizinprodukten und Nahrungsergänzungsmitteln in Deutschland zugelassen und kommerziell erhältlich. Auf Grund mangelnder Studiendaten bei Medizinprodukten und Nahrungsergänzungsmitteln fehlen jedoch unabhängige, externe, bewertende Daten. Der Gehalt an Anthocyanen schwankt erheblich zwischen den einzelnen Präparaten. Infolge der fehlenden Dosierungsempfehlung für Anthocyane (s. Kapitel 2.1) ist eine abschließende Bewertung der Präparate nicht möglich.

Die auf dem Markt erhältlichen Präparate werden vor allem bei Erkrankungen am Auge eingesetzt. Die Augentropfen Herba-Vision® Blaubeere (OmniVision® GmbH, Puchheim) enthalten 0,05 % Blaubeertinktur und sind zur Anwendung am trockenen Auge für Träger von Kontaktlinsen entwickelt. Der Nutzen der in der Blaubeertinktur enthaltenen Anthocyane für diese Indikation ist fraglich.

2. Grundlagen

Die Nahrungsergänzungsmittel Ocuville[®] Complete 12 mg Lutein und Ocuville[®] Glaukom (beide Dr. Gerhard Mann chem.-pharm. Fabrik GmbH, Berlin) enthalten neben Vitaminen und Spurenelementen 100 mg (Ocuville[®] Complete) bzw. 50 mg (Ocuville[®] Glaukom) Heidelbeerextrakt pro Kapsel bzw. Tablette. Dies entspricht einem Gehalt von mindestens 25,0 mg (Ocuville[®] Complete) bzw. 12,5 mg (Ocuville[®] Glaukom) an Anthocyanen. Die Dosierung sieht eine Einnahme von zwei Kapseln bzw. einer Tablette pro Tag vor. Als Indikation wird für Ocuville[®] Complete die Diabetische Retinopathie, Retinopathia pigmentosa (Netzhautdegeneration) sowie die Altersbedingte Makuladegeneration (AMD) und für Ocuville[®] Glaukom das Glaukom (Grüner Star) angegeben. Studien belegen den gewinnbringenden Einsatz von Anthocyanen bei derartigen Erkrankungen^{59,60}. Neben diesen beiden genannten Präparaten ist eine Vielzahl weiterer anthocyanhaltiger Nahrungsergänzungsmittel erhältlich. Der Anthocyanengehalt in diesen Präparaten ist teilweise sehr niedrig (weniger als 10 mg Heidelbeerextrakt, Anthocyanengehalt unbekannt). Ein auf die Anthocyane bezogener Nutzen dieser Präparate ist daher unwahrscheinlich.

Zurzeit gibt es in Deutschland kein kommerziell erhältliches Fertigarzneimittel, welches ausschließlich Anthocyane enthält. Difrarel[®] 100 (sigma-tau Arzneimittel, Düsseldorf) war ein Präparat zur Vorbeugung gegen Nachtblindheit, wurde jedoch auf Grund des Erlöschens der Registrierung Ende 2011 vom Markt genommen. Die Fachinformation empfahl eine Einnahme von drei bis vier Dragees pro Tag, was einem Anthocyankonsum von 300 mg bis 400 mg entspricht⁶¹. Diese Anthocyanodosierung ist im Vergleich mit den bereits genannten Präparaten die höchste.

In der Schweiz ist Myrtaven[®] (IBSA Institut Biochimique SA, Lugano, Schweiz) als kommerziell erhältliches Fertigarzneimittel für die Behandlung von Mikroangiopathien und Netzhauterkrankungen bei Diabetes und der Nachtblindheit auf Grund der Wirkung auf die Vaskularisation der Netzhaut sowie Krankheiten der Blutgefäße (Venenentzündung, Krampfadern) zugelassen. Pro Kapsel sind 58 mg Anthocyane enthalten. Die Dosierung beträgt zwei Kapseln pro Tag. Dies entspricht einer täglichen Zufuhr von 116 mg Anthocyanen⁶². Myrtaven[®] ist daher auch ein höher dosiertes Anthocyanpräparat.

2.3 Mikroverkapselung

Die Mikroverkapselung von Substanzen wird in vielen Industriezweigen, wie der pharmazeutischen, der Lebensmittel-, der Kosmetik- und in der chemischen Industrie eingesetzt. Durch die Mikroverkapselung können feste, flüssige oder gasförmige Stoffe in eine Polymermatrix eingebettet oder mit einer (Polymer-) Hülle überzogen werden. Ziel der Mikroverkapselung ist es, Stoffe gezielt gegenüber äußeren Einflüssen, wie z. B. Licht, Luftfeuchte und Sauerstoff, aber auch vor Einflüssen im Organismus, wie beispielsweise pH-Wert Änderungen, Enzymaktivitäten oder Interaktionen mit Nahrungsmittelbestandteilen zu

2. Grundlagen

schützen. Des Weiteren können unangenehme Gerüche und Geschmäcker maskiert werden. Weitere Vorteile für den Patienten ergeben sich aus einer verbesserten Steuerung der Wirkstofffreisetzung, die mit einer Reduzierung von unerwünschten Arzneimittelwirkungen einhergeht.

Der Größenbereich von Mikrokapseln erstreckt sich von 1 μm bis zu 1000 μm . Der häufigste genannte Größenbereich liegt zwischen 1 μm und 100 μm ⁶³. Es wird zwischen Mikrokapseln und Matrixpartikeln unterschieden (s. Abbildung 2.3-1). Mikrokapseln sind aus einem wirkstoffhaltigen Kern und einer den Kern als festes Wandmaterial umgebenden, schützenden Hülle aufgebaut. Matrixpartikel werden in den häufigsten Fällen nicht von einer festen Hülle umgeben. Sie bestehen aus einem Polymergrundgerüst, in dem der Wirkstoff homogen eingebettet ist.



Abbildung 2.3-1 Schematische Darstellung von a) einer Kern-Hülle-Mikrokapsel und b) einem Matrix-Mikropartikel (modifiziert nach ⁶⁴)

Für die Generierung von Mikrokapseln gibt es eine Vielzahl von Methoden, die auf drei grundlegenden, in der Literatur gut beschriebenen, Verfahren beruhen ⁶⁴⁻⁶⁶:

- die Koazervation
- das Emulsionsverfahren mit Lösungsmittelverdampfung bzw. -extraktion
- die Sprühtrocknung.

Alle Methoden unterscheiden sich neben den Prozessführungen in den Arznei- und Hilfsstoffen, die für den jeweiligen Verkapselungsprozess eingesetzt werden können ⁶⁶.

Die Freisetzung der verkapselten Wirkstoffe aus nicht bioabbaubaren Mikropartikeln erfolgt durch Fick'sche Diffusion. Bei Kern-Hülle-Kapseln erfolgt die Diffusion aus dem Reservoir des Kerns durch die Hüllmembran der Mikropartikel. Auf Grund der homogenen Verteilung des Wirkstoffes in der Partikelmatrix erfolgt die Diffusion bei Matrixpartikeln direkt durch die Matrix hindurch ⁶⁴. Bei bioabbaubaren Mikropartikeln erfolgt die Freisetzung durch Degradation und Erosion der Matrix.

2.3.1 Mikroverkapselung von Anthocyanen

Die Mikroverkapselung von Anthocyanen in der Pharmazeutischen- und der Lebensmitteltechnologie ist bisher nicht im Fokus der Forschung gewesen. Fang und Bhandari fassten die Verkapselung von Polyphenolen in ihrer Arbeit zusammen⁶⁷. Beide verwendeten Sprüh- und Gefriertrocknungsprozesse für die Verkapselung von Anthocyanen unter Einsatz von Maltodextrin als Hilfsstoff. Cavalcanti *et al.*⁶⁸ führten neben Sprühtrocknungsprozessen weitere Methoden wie die Sprühkühlung, Wirbelschichtverfahren, den Einschluss in Liposomen sowie einfache und komplexe Koazervationen für die Verkapselung von Anthocyanen an. Bei diesen Studien wurden Maltodextrin, β -Cyclodextrin, Pullulan, Glucangel, Curdlan, Natriumalginat und Pektine verwendet. In einer Arbeit von Oehme⁶⁹ wurden Pektin und Schellack für die Verkapselung von Anthocyanen eingesetzt.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Gewinnung und Zusammensetzung des Heidelbeerextraktes

Der verwendete Heidelbeertrockenextrakt (HBE) wurde von Symrise GmbH & Co. KG, Holzminden, zur Verfügung gestellt. Gewonnen wurde der HBE durch die Extraktion von Trester der Europäischen Wildheidelbeere (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) mit angesäuertem Methanol (Citronensäure pH 1-3) und anschließender Filtration und Lyophilisation. Der Gesamtanthocyangehalt, bestimmt als Cy-3-glc, beträgt 25 % (m/m). Der HBE wurde trocken bei -24 °C gelagert. Neben den Anthocyanen enthält der verwendete HBE weitere Polyphenole, Tannine, Saccharide und Ballaststoffe. Der Restmethanolgehalt beträgt laut Analysenzertifikat der Firma Symrise 43 ppm. Dieser Wert liegt weit unter dem Grenzwert von 3000 ppm, den das Europäische Arzneibuch vorschreibt. Daher kann der Restmethanolgehalt des HBE als unbedenklich angesehen werden.

3.1.2 Hartfett (Adeps solidus, Ph. Eur.)

Die in dieser Arbeit verwendeten Hartfetttypen Witepsol® W 35 und Witepsol® E 76 wurden von der Firma Sasol Germany GmbH, Hamburg, zur Verfügung gestellt. Für die Herstellung von Hartfett werden natürliche Palmkern- und Kokosnussfette gespalten. Die dabei abgespaltenen freien Fettsäuren werden durch Destillation getrennt. Für die Weiterverarbeitung werden C₁₂ – C₁₈ Körper verwendet. Diese werden hydriert, um etwaige Doppelbindungen aus den Molekülen zu entfernen. Dadurch wird die Neigung zum Ranzigwerden minimiert. Anschließend werden die freien Fettsäuren in produktspezifischen Verhältnissen mit gereinigtem Glycerol zu Mono-, Di- und Triglyceriden verestert. Die Lipidzusammensetzung des Endproduktes ist in Tabelle 3.1-1 zusammengefasst. Im Falle des Witepsols® W 35 (Hydroxydzahl: 40 - 50) hat das entstandene Lipidgemisch einen Schmelzpunkt zwischen 33,5 °C – 35,5 °C. Durch ein verändertes Verhältnis der einzelnen Lipidfraktionen ist der Schmelzpunkt des Witepsols® E 76 (Hydroxydzahl: 30 - 40) auf 37,0 °C – 39,0 °C heraufgesetzt.

Tabelle 3.1-1 Lipidzusammensetzung der beiden verwendeten Hartfetttypen Witepsols W 35 und Witepsols E 76

| | |
|---------------|-----------|
| Triglyceride | 65 – 80 % |
| Diglyceride | 10 – 35 % |
| Monoglyceride | 1 – 5 % |

Hartfett wird in der Pharmazie üblicherweise zur Herstellung von Suppositorien eingesetzt.

3. Material und Methoden

Auf Grund der unterschiedlichen Schmelzeigenschaften, der guten Kompatibilität mit Schleimhäuten und vielen Inhaltsstoffen sowie der pH-Wert-unabhängigen Magen-Darm-Passage wurde Hartfett zur Mikroverkapselung verwendet.

3.1.3 Molkenproteinisolat (MPI)

Das in dieser Arbeit verwendete Molkenproteinisolat-Pulver (WPI BiPro®) wurde von der Firma Davisco Foods International Inc. (Le Sueur, Minnesota, USA) bezogen und hatte einen Proteingehalt von 94 % (m/m). Hergestellt wurde es durch Sprühtrocknung von frischer Molke. Die beiden wasserlöslichen Hauptproteinfraktionen des MPI sind β -Lactoglobulin (β -lg) (M_w : 18,3 kDa; IEP: pH 5,1) sowie α -Lactalbumin (α -la) (M_w : 14,2 kDa; IEP: pH 4,2 - 4,5). Beide Fraktionen liegen, wie in natürlicher Milch, im Verhältnis 30 : 70 vor. Weitere Bestandteile sind Laktose und Mineralien. Gelagert wurde das MPI laut Vorschrift des Herstellers unter 25 °C und Lichtausschluss.

3.1.4 Gereinigtes Wasser (Aqua purificata, Ph. Eur.)

Das in dieser Arbeit verwendete gereinigte Wasser wurde entsprechend der Monographie „Gereinigtes Wasser“ (Ph. Eur. 6.8⁷⁰) zentral im Institut für Pharmazie durch Ionentausch und Umkehrosiose aus Trinkwasser hergestellt. Daran anschließend wurde das gereinigte Wasser mit UV-Licht bestrahlt, um etwaige durch die Umkehrosioseanlage eingetragene Keime abzutöten. Für die Durchführung der Analysen wurde jeweils frisch hergestelltes gereinigtes Wasser verwendet.

3.1.5 Weitere verwendete Materialien

| | |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| 1,2-Dioleoyl-rac-glycerol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| 1-Oleoyl-rac-glycerol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Cy-3-ara | Polyphenols, Sandes, Norwegen |
| Cy-3-gal | Polyphenols, Sandes, Norwegen |
| Cy-3-glc | Extrasynthese, Lyon, Frankreich |
| Del-3-ara | Institut für Lebensmittelchemie, Universität Würzburg ⁷¹ |
| Del-3-gal | Institut für Lebensmittelchemie, Universität Würzburg ⁷¹ |
| Del-3-glc | Polyphenols, Sandes, Norwegen |
| Delphinidin-2,5-O-diglucoopyranosid | Extrasynthese, Lyon, Frankreich |
| Dextran 500 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Dinatriumcarbonat | Grüssing GmbH Analytika, Filsum |

3. Material und Methoden

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Gallenextrakt (vom Schwein) (als Quelle für Glycin und Taurin Konjugate der Hyodeoxycholic Säure und andere Gallensalze) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Glyceroltrioleat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| HPTLC Kieselgel 60 F ₂₅₄ GLP Glasplatten | Merck KGaA, Darmstadt |
| Kaliumchlorid | Grüssing GmbH Analytika, Filsum |
| Mal-3-ara | Institut für Lebensmittelchemie, Universität Würzburg ⁷¹ |
| Mal-3-gal | Institut für Lebensmittelchemie, Universität Würzburg ⁷¹ |
| Mal-3-glc | Polyphenols, Sandes, Norwegen |
| Maltodextrin | Cargill Deutschland GmbH, Krefeld |
| Natriumacetat | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydrogencarbonat | Grüssing GmbH Analytika, Filsum |
| Natriumhydroxyd | Grüssing GmbH Analytika, Filsum |
| Ölsäure | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Pankreatin (vom Schwein) (enthält Lipasen, Amylasen und Proteasen) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Pektin Amid AU-L 027/09 | Herbstreith & Fox KG, Neuenbürg |
| Pektin Amid CB025-E | Herbstreith & Fox KG, Neuenbürg |
| Pektin Amid CU 025 | Herbstreith & Fox KG, Neuenbürg |
| Peo-3-ara | Polyphenols, Sandes, Norwegen |
| Peo-3-gal | Polyphenols, Sandes, Norwegen |
| Peo-3-glc | Polyphenols, Sandes, Norwegen |
| Pet-3-ara | Institut für Lebensmittelchemie, Universität Würzburg ⁷¹ |
| Pet-3-gal | Institut für Lebensmittelchemie, Universität Würzburg ⁷¹ |
| Pet-3-glc | Polyphenols, Sandes, Norwegen |
| Pharmacoat® 606 (als Quelle für HPMC) | Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan |
| Phospholipon® 90 G (als Quelle für Lecithin) | Phospholipid GmbH, Köln |
| Polyglycerin-polyricinoleat (PGPR 4150) | Paalsgard, Juelsminde, Dänemark |
| Rapsöl | St. Wendeler Ölsaaten GmbH & Co. KG, St. Wendel |
| Salzsäure | Grüssing GmbH Analytika, Filsum |
| Span® 80 (Sorbitanmonooleat) | Croda GmbH, Nettetal Kaldenkirchen |
| SSB Aquagold® (als Quelle für Schellack) | Stroeever GmbH & Co. KG, Bremen |

3. Material und Methoden

| | |
|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Saccharoseester S-370 | Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation, Tokyo, Japan |
| TEMPOL (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Trizma [®] (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |

Alle nicht aufgelisteten Materialien waren von analytischer Qualität.

3.2 Kapselsysteme von Projektpartnern des Clusters

3.2.1 Übersicht der Kapselsysteme

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mikrokapselsysteme werden in den folgenden Kapiteln beschrieben. Eine graphische Übersicht über den schematischen Aufbau und das lichtmikroskopische Aussehen der Kapselsysteme zeigt Abbildung 3.2-1. Die verwendeten Hilfsstoffe sowie charakteristische Daten zu den einzelnen Kapselsystemen sind in Tabelle 3.2-1 zusammen gefasst.

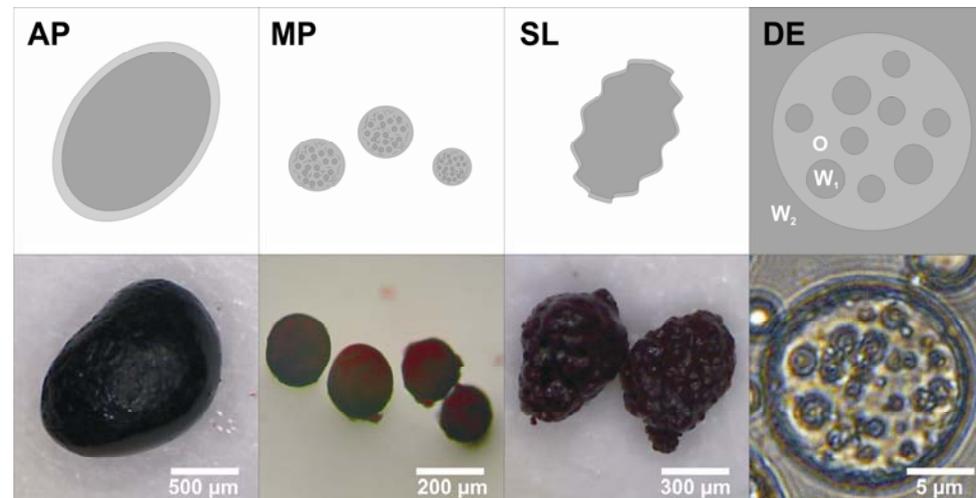


Abbildung 3.2-1 Schematische und lichtmikroskopische Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kapselsysteme aus dem Cluster: AP = Hohlkapseln aus amidiertem Pektin, MP = Molkenproteinisolat-Matrixpartikel, SL = mit Schellack überzogene Matrixkapsel aus amidiertem Pektin, DE = $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsion

Tabelle 3.2-1 Übersicht über die verwendeten Hilfsstoffe sowie der charakteristischen Parameter der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mikrokapselformulierungen von Projektpartnern aus dem Gesamtcluster.

| Syst. | Typ | Hilfsstoffe | HBE [% m/m] | mittlerer Durchmesser [μm] | pH |
|-------|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| AP | Kern-Hülle | amidiertes Pektin ^a , CaCl_2 , Glycerol | 10,00 | 1800 ± 200 | 3 (Stammlsg. mit HBE) 1 (Quervernetzungs-lsg. mit CaCl_2) |
| MP | Matrix | Molkenproteinisolat | 10,00 | 180 | 1,5 (vor der Verkapselung) |
| SL | Matrix | amidiertes Pektin ^b , Zitronensäure, Maltodextrin, Schellack | 20,00 | 250 - 500 | 2 (vor der Sprühtrocknung) |
| DE | $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsion | Pflanzenöl, amidiertes Pektin ^c , PGPR 90+, Konjugatemulgator | 0,12 | 30 | 3,5 (Stammlösung mit HBE) |

^a Veresterungsgrad: 31,9 %, Amidierungsgrad: 21,1 %

^b Veresterungsgrad: 29 %, Amidierungsgrad: 21 %

^c Veresterungsgrad: 23-27 %, Amidierungsgrad: 23-25 %

3. Material und Methoden

3.2.2 Hohlkapseln aus amidiertem Pektin (AP)

Niedrig verestertes Pektin kann unter dem Einfluss von mehrwertigen Kationen Gele mit einem eierkartonartigen Aufbau bilden. Die durch die Einführung von Amidgruppen zusätzliche Modifizierung des Pektins führt zu einer Minderung der hydrophilen Eigenschaften des Moleküls. Dies erleichtert die Ausbildung von Gelen. Demzufolge können durch die Anwendung eines amidierten, niedrig veresterten Pektins steifere und beständigere Gele hergestellt werden^{72,73}. Die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten Hohlkapseln aus amidiertem Pektin (AP) wurden durch Zugabe einer calciumhaltigen Quervernetzungslösung zu einer Lösung von amidiertem Pektin (Pektin Amid AU-L 027/09) hergestellt^{74,75} (s. Abbildung 3.2-2).

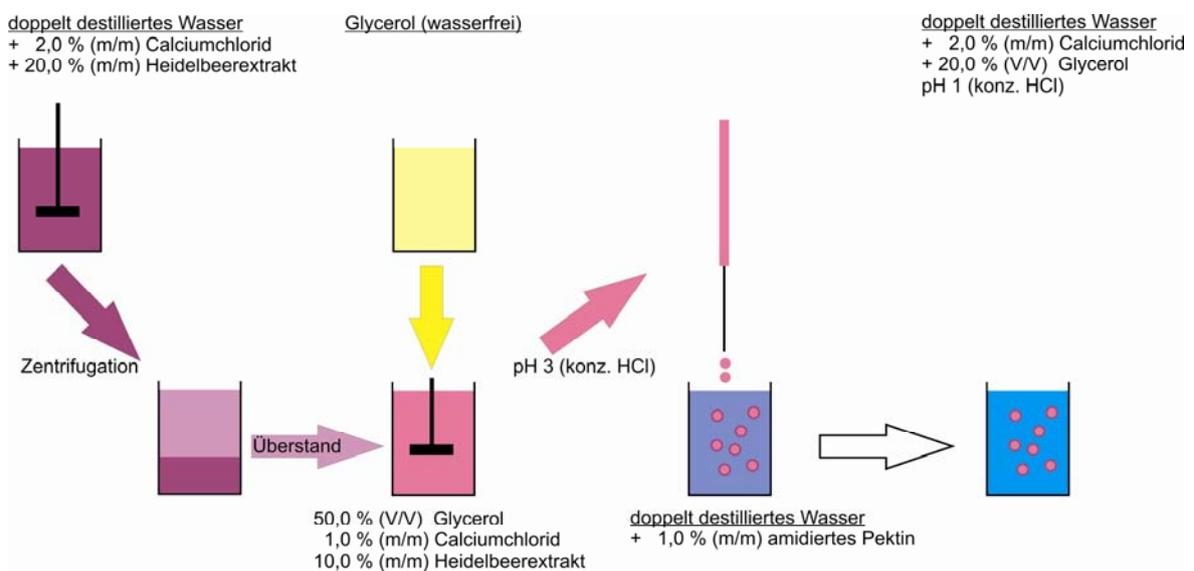


Abbildung 3.2-2 Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses der Calciumpektinat Hohlkapseln (AP)

Tabelle 3.2-2 Übersicht über die E-Nummern der für das System AP verwendeten Stoffe

| Stoff | E-Nummer |
|-------------------|----------|
| Calciumchlorid | 509 |
| Glycerol | 422 |
| HCl | 507 |
| Heidelbeerextrakt | 163 |
| amidiertes Pektin | 440 b |

Zu einer wässrigen Calciumchlorid Lösung (2 % m/m) wurden 20 % (m/m) HBE gegeben. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand im Verhältnis 1:1 mit wasserfreiem Glycerol verdünnt. Die resultierende Vernetzungslösung bestand aus 50 % (V/V) Glycerol, 1 % (m/m) Calciumchlorid und 10 % (m/m) HBE. Unter Anwendung von konzentrierter Salzsäure wurde

3. Material und Methoden

der pH-Wert dieser Lösung auf pH 3 eingestellt. Für die Generierung der wasserunlöslichen Hohlkapseln wurde die Quervernetzungslösung durch eine hochpräzise Dosierspritze tropfenweise in die wässrige 1%ige Lösung des amidierten Pektins (Veresterungsgrad: 31,9 %, Amidierungsgrad: 21,1 %) getropft. Direkt beim Kontakt der beiden Lösungen bildete sich eine Kapselhülle um jeden Tropfen ⁷⁶. Anschließend wurden die Kapseln in eine 2%ige (m/m) Calciumchlorid Lösung pH 1, die 20 % (V/V) Glycerol enthielt, überführt. Die Kapseln wurden bei Raumtemperatur für ca. 3,5 Minuten in dieser Lösung inkubiert um den Polymerisationsprozess zu vervollständigen, die Kapselhülle zu stabilisieren und geeignete Bedingungen für die verkapselten Anthocyane zu schaffen. Abschließend wurden die Kapseln dekantiert und zur Lagerung in Sonnenblumenöl überführt.

Die Verkapselungseffizienz dieser Herstellungsmethode, definiert als Anteil an Anthocyanen in den hergestellten Kapseln dividiert durch den Anteil an Anthocyanen in der Quervernetzungslösung, liegt bei 99 %. Dies liegt an der raschen Diffusion der Calciumkationen, welche zu einer schnellen intramolekularen Quervernetzung der negativ geladenen Carboxylgruppen des Pektinmoleküls führt. Daraus resultierend bildet sich ein Kapselhüllen bildendes Netzwerk entlang des Diffusionsweges der Calciumkationen ^{76,77}.

Die Kapselgrößen ($1,8 \pm 0,2$ mm), Kern- und Hüllvolumina ($2,31$ mm³ bzw. $0,74$ mm³) sowie die Hüllstärke (80 µm) und das Kern-Hülle-Verhältnis (3:1) der Calciumpektinat Kapseln wurden mittels Magnetischer Resonanz Tomographie (MRT) (Chemagnetics Infinity Plus 600 Spektrometer; Bruker, Karlsruhe) analysiert ⁷⁸.

Das AP System wurde von den Partnern des Teilprojektes 2 (TU Dortmund) bereitgestellt.

3.2.3 Molkenproteinisolat-Matrixpartikel (MP)

Für die Herstellung der wasserunlöslichen MP-Partikel wurde unter zwölf stündigem kontinuierlichem Rühren bei 4 °C eine 30%ige (m/m) Molkenproteinisolat-Stammlösung in destilliertem Wasser hergestellt. In dieser Lösung wurden 7,5 % (m/m) HBE gelöst. Zur Stabilisierung der Anthocyane wurde diese Lösung mittels 0,1 - 3 N Salzsäure verdünnt, sodass ein Proteingehalt von 20 % (m/m) und ein HBE-Gehalt von 5 % (m/m) bei einem pH-Wert von 1,5 vorlag. Abschließend wurde diese MPI-HBE-Stammlösung bei 5000*g für 2 Minuten zentrifugiert um unlösliche Bestandteile abzutrennen.

3. Material und Methoden

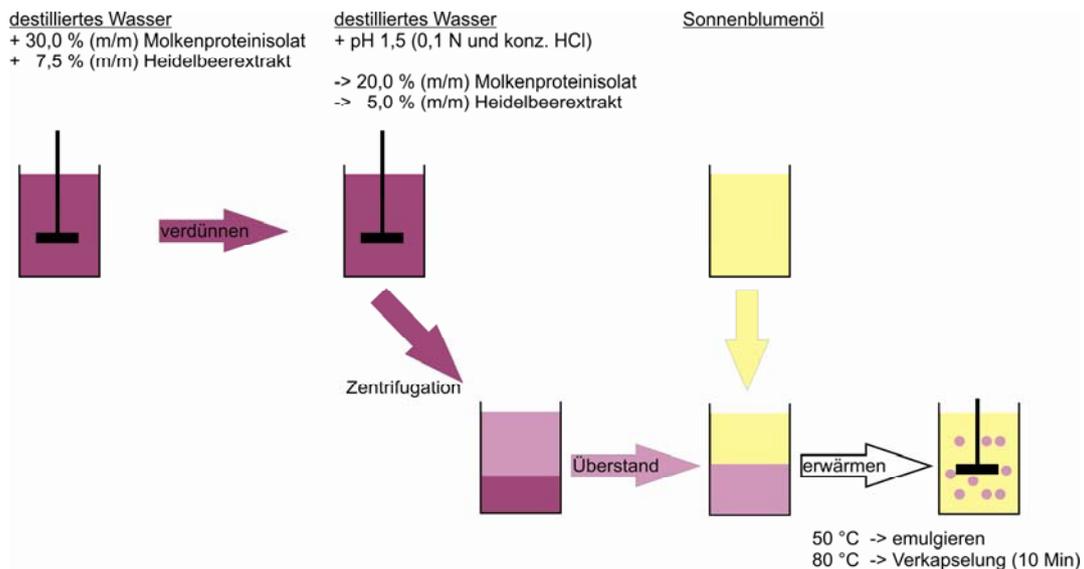


Abbildung 3.2-3 Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses der Molkenproteinisolat-Matrixpartikel (MP)

Tabelle 3.2-3 Übersicht über die E-Nummern der für das System MP verwendeten Stoffe

| Stoff | E-Nummer |
|---------------------|----------|
| HCl | 507 |
| Heidelbeerextrakt | 163 |
| Molkenproteinisolat | * |
| Sonnenblumenöl | * |

*gilt als Lebensmittel und nicht als Zusatzstoff und hat daher keine E-Nummer

Die Mikroverkapselung des HBE wurde mittels Emulsionsverfahren auf Basis einer thermischen Gelierung durchgeführt. Hierzu wurde der nach der Zentrifugation der MPI-HBE-Stammlösung erhaltene Überstand (Matrixlösung) bei 50 °C in Sonnenblumenöl emulgiert. Der Emulgierprozess erfolgte bei 1000 U/min unter Einsatz eines Scheibenrührers (RW 20 DZM; IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen). Die entstandene W₁/O-Emulsion wurde binnen 6 Minuten auf 80 °C erwärmt. Diese Temperatur wurde 10 Minuten gehalten, um die Gelierung der Molkenproteine zu erreichen. Anschließend wurde die auf diese Weise erzeugte Matrixpartikelsuspension in Öl auf 20 °C abgekühlt. Um die Matrixpartikel vom Sonnenblumenöl zu trennen, wurde die Suspension für 2 Minuten bei 1000*g zentrifugiert und der Ölüberstand anschließend verworfen.

Während des Herstellungsprozesses wurde ein Anthocyanverlust von 7,4 % ± 2,6 % gemessen. Die Partikelgrößen der Matrixpartikel wurden mittels Laserdiffraktometrie (Coulter LS 230; Beckman-Coulter, Krefeld) bestimmt. Der mittlere Partikeldurchmesser betrug 180 µm.

3. Material und Methoden

Das MP-System wurde von den Partnern des Teilprojektes 3 (TU München-Weihenstephan) bereitgestellt.

3.2.4 Schellack überzogene Matrixkapseln aus amidierem Pektin (SL)

Für die Herstellung der mit Schellack überzogenen, wasserunlöslichen Matrixkapseln aus amidierem Pektin wurde eine 30%ige (m/m) Stammlösung bestehend aus 65 % (m/m) Maltodextrin (Wandmaterial), 13 % (m/m) Zitronensäure (Einstellung des pH-Wertes) und 2 % (m/m) amidierem Pektin (Pektin Amid CU 025 - Veresterungsgrad: 29 %, Amidierungsgrad: 21 %) (stabilisierendes Additiv für die Anthocyane) in Trinkwasser hergestellt. Anschließend wurde 20 % (m/m) HBE zugegeben und der pH-Wert auf pH 2 eingestellt.

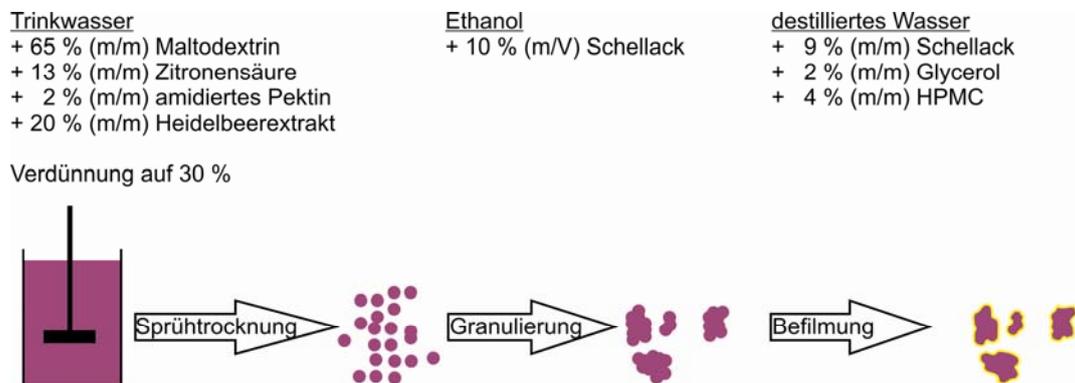


Abbildung 3.2-4 Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses der mit Schellack überzogenen Matrixkapseln aus amidierem Pektin (SL)

Tabelle 3.2-4 Übersicht über die E-Nummern der für das System MP verwendeten Stoffe

| Stoff | E-Nummer |
|-------------------|----------|
| Glycerol | 422 |
| Heidelbeerextrakt | 163 |
| HPMC | 464 |
| Maltodextrin | * |
| amidierem Pektin | 440 b |
| Schellack | 904 |
| Zitronensäure | 330 |

*gilt als Lebensmittel und nicht als Zusatzstoff und hat daher keine E-Nummer

Die so hergestellte Stammlösung wurde in einem Mobile MinorTM Sprühtrockner (Niro A/S, Søborg, Dänemark) (1–7 kg/h Wasserverdunstungsvermögen) über eine rotierende Zerstäuberscheibe versprüht (Prozessparameter s. Tabelle 3.2-5).

3. Material und Methoden

Tabelle 3.2-5 Prozessparameter für den Sprühtrocknungsprozess zur Herstellung der mit Schellack überzogenen Matrixkapseln aus amidiertem Pektin

| | |
|-------------------------------------------------|--------------|
| Lufteinlasstemperatur | 160 °C |
| Luftauslasstemperatur | 70 °C |
| Umdrehungsgeschwindigkeit der Zerstäuberscheibe | 23.000 U/min |

Nach diesem Sprühtrocknungsprozess wurde das entstandene Mikrokapselpulver in einer Granulierschüssel granuliert. Als Bindemittel wurde eine 10%ige (m/V) ethanolische Schellacklösung eingesetzt. Die so entstandenen Granulatpartikel hatten eine mittlere Partikelgröße zwischen 250 µm - 500 µm (bestimmt mittels Siebanalyse). Der abschließende Filmüberzug wurde in einer Mini Glatt Wirbelschichtanlage mit Wursterinsatz (Glatt GmbH, Binzen) auf die Granulatpartikel aufgesprüht. Die Filmlösung bestand aus 9 % (m/m) Schellack (Filmbildner), 2 % (m/m) Glycerol (Weichmacher), 4 % (m/m) HPMC (Porenbildner). Als Lösungsmittel wurde destilliertes Wasser verwendet. Für 100 g Granulat wurden 25 g Polymer verwendet. Die Parameter des Befilmungsprozesses sind in Tabelle 3.2-6 dargestellt.

Tabelle 3.2-6 Prozessparameter für den Befilmungsprozess in der Wirbelschicht

| | |
|-----------------------------|----------|
| Lufteinlasstemperatur | 80 °C |
| Produkttemperatur | 50 °C |
| Luftdruck der Wirbelschicht | 0,35 bar |
| Sprührate | 1 g/min |
| Sprühdruck | 1,45 bar |
| Düsendurchmesser | 0,5 mm |

Die fertig überzogenen Granulatpartikel wurden abschließend für 30 Minuten bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet und mittels Siebanalyse charakterisiert. Partikel, die in der Siebklasse von 250 µm - 500 µm waren, wurden für die Untersuchungen dieser Arbeit verwendet. Die Verkapselungsrate des Systems SL wurde nicht bestimmt.

Das SL System wurde von den Partnern des Teilprojektes 5 (Universität Kiel) bereitgestellt.

3.2.5 $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsionen (DE)

3.2.5.1 Herstellung des Protein-Polysaccharid-Konjugatemulgators

Der für die Emulgierung verwendete hydrophile Protein-Polysaccharid-Konjugatemulgator ist durch einen der Maillard-Reaktion ähnelnden Reaktionsverlauf aus Molkenprotein und Dextran 500 nach Flügel und Knoth *et al.* synthetisiert worden^{79,80}. Unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes des Dextrans (M_w Dextran 500: 500.000 g/mol) und des β -Lactoglobulins (Hauptproteinanteil im MPI) (M_w β -Lactoglobulin: 18.277 g/mol⁸¹) wird

3. Material und Methoden

offensichtlich, dass das Molekulargewicht des Protein-Polysaccharid-Konjugates größer ist als das der Gallensalze (M_w Hyodeoxycholsäure: 393 g/mol), welche ebenfalls als Emulgator verwendet wurden.

3.2.5.2 Herstellung der $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsion (DE)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsionen untersucht, die sich nur im verwendeten hydrophilen Emulgator in der W_2 -Phase unterscheiden. Eine Emulsion wurde mit einem Protein-Polysaccharid-Konjugatemulgator stabilisiert, die zweite mit Gallensalzen als Emulgator. Der Herstellungsprozess der beiden Doppelemulsionen war identisch.

Die Doppelemulsionen wurden in einem zweistufigen mechanischen Emulgierprozess hergestellt (siehe Abbildung 3.2-5). In der inneren hydrophilen Phase wurden 0,5 % (m/m) des anthocyanhaltigen Heidelbeerextraktes gelöst. Aus Stabilitätsgründen wurde diese Lösung mit Zitronensäure auf pH 3,5 eingestellt. Zu diesem Ansatz wurden 1,5 % (m/m) amidiertes Pektin (Veresterungsgrad: 23 % - 27 %, Amidierungsgrad: 23 % - 25 %) gegeben. Durch die Gelierung des Pektins ist eine erhöhte Stabilität der W_1 -Tropfen während der zweiten Stufe des Emulgierprozesses gewährleistet^{82,83}.

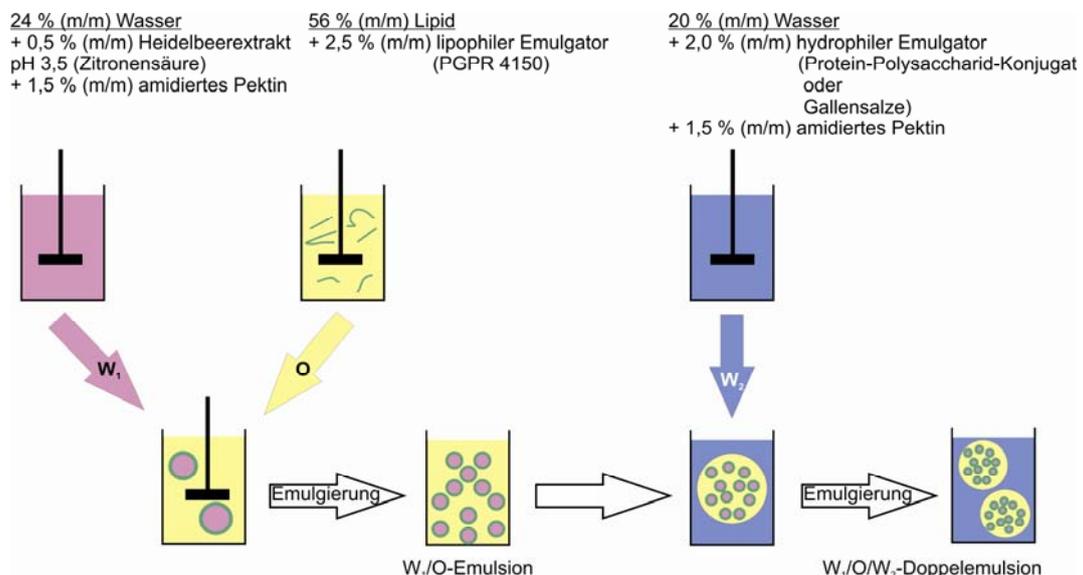


Abbildung 3.2-5 Schematische Darstellung des zweistufigen Herstellungsprozesses der $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsionen. Die Anteile der jeweiligen Phase beziehen sich auf die Gesamtemulsion. Die dazugehörigen Angaben der Zusatzstoffe beziehen sich auf die jeweilige Phase.

Tabelle 3.2-7 Übersicht über die E-Nummern der für das System DE verwendeten Stoffe

| Stoff | E-Nummer |
|-------------------|----------|
| Heidelbeerextrakt | 163 |
| amidiertes Pektin | 440 b |
| PGPR 4150 | 476 |
| Rapsöl | * |
| Zitronensäure | 330 |

*gilt als Lebensmittel und nicht als Zusatzstoff und hat daher keine E-Nummer

Des Weiteren zeigten verschiedene Arbeitsgruppen, dass ein Zusatz von Pektin zu anthocyanhaltigen Lösungen die Stabilität der Anthocyane erhöht⁸⁴⁻⁸⁶. Die Triglyceridphase bestand aus Rapsöl mit dem Zusatz von 2,5 % (m/m) des lipophilen Emulgators PGPR 4150.

Im ersten Emulgierschritt wurde die präparierte hydrophile Phase (W_1) in der emulgatorhaltigen Triglyceridphase dispergiert. Der Dispersphasenanteil (φ_1) dieser W_1/O -Emulsion betrug 30 % (m/m). Die Herstellung der W_1/O -Emulsion wurde unter Zuhilfenahme einer Zahnkranzdispergiermaschine (Magic Lab[®], Module DR, IKA[®] Werke GmbH & CO. KG) mit 10.000 U/min bzw. einer Umfangsgeschwindigkeit bis zu 15,4 m/s bei drei Durchläufen durchgeführt. Diese Prozessparameter wurden gewählt, da so eine optimale Stabilität und Tropfengrößenverteilung der inneren hydrophilen Phase gewährleistet war⁸⁷.

Für die Herstellung der äußeren hydrophilen Phase (W_2) wurden 1,5 % (m/m) amidiertes Pektin (Eigenschaften s. oben) in Wasser gelöst. Durch die Zugabe des Hydrokolloids Pektin wurde die Viskosität der äußeren Phase erhöht⁸⁸. Zu dieser Lösung wurden 2 % (m/m) eines hydrophilen Emulgators gegeben. Einer der beiden hydrophilen Emulgatoren war ein Protein-Polysaccharid-Konjugatemulgator (KE-Emulsion). Die zweite Doppelemulsion wurde mit Gallensalzen als hydrophiler Emulgator stabilisiert (GSE-Emulsion). Die $W_1/O/W_2$ -Emulsionen wurden durch die Zugabe der W_1/O -Emulsionen in die jeweilige externe hydrophile Phase hergestellt. Die Emulgierung wurde in einer Kolloidmühle (Magic LAB[®], Modul MK/MKO, IKA[®] Werke GmbH & CO. KG) bei konstanten Umdrehungszahlen von 3.000 U/min und einer Spaltbreite von 0,26 mm durchgeführt. Die Umdrehungsgeschwindigkeit korrespondierte dabei mit einer maximalen Umfangsgeschwindigkeit von 3,5 m/s. Diese Emulgierbedingungen wurden in einer Studie zur Mikrostruktur der inneren W_1 -Tropfen ermittelt⁸⁸.

Die $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsion wurde von den Partnern des Teilprojektes 4 (Universität Karlsruhe) bereitgestellt.

3.3 Methoden

3.3.1 Charakterisierung des Heidelbeerextraktes

Für die Charakterisierung des HBE wurden jeweils 15%ige (m/m) HBE-Lösungen in drei Medien mit unterschiedlichen pH-Werten (1. HCl pH 1,5, 2. Trizma®-Puffer pH 7 und 3. Carbonatpuffer pH 10) hergestellt. Diese Ansätze wurden bei RT sieben Tage in einem Laborschüttler (Tyss II, MLW, Leipzig) bei 150 U/min inkubiert. Daran anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugieren (Labofuge 300, DJB Labcare Ltd, Großbritannien) bei 2000*g für 5 Minuten abgetrennt. Alle Proben wurden bei 2 °C bis 8 °C unter Lichtausschluss gelagert. Der Gesamtanthocyangehalt (als Cy-3-glc) der jeweiligen Lösungen wurde mittels HPLC-UV/Vis quantifiziert (n = 2). Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte.

3.3.1.1 Antioxidatives Potential der Heidelbeerextrakt-Anthocyane

Die Bestimmung des antioxidativen Potentials der Heidelbeerextrakt-Anthocyane wurde in Anlehnung an den in der Literatur beschriebenen Ascorbinsäureassay durchgeführt⁸⁹. Zu jeweils 1,5 mL der 15%igen HBE-Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten (s. Kapitel 3.3.1) wurden 5 mM der Spinsonde TEMPOL (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl; M_w: 172,24 g/mol) gegeben. Diese Lösungen wurden in Eppendorf Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) hergestellt und bei RT vermessen. Direkt nach dem Herstellen der Proben wurden die ESR Spektren mit einem 1,4 GHz ESR L-Band Spektrometer (Magnettech, Berlin) aufgezeichnet. Die Messparameter sind in Tabelle 3.3-1 dargestellt.

Tabelle 3.3-1 Übersicht über die am ESR L-Band eingestellten Messparameter

| Parameter | Wert |
|----------------------|--------------|
| B ₀ -Feld | 49,12 mT |
| Sweep | 5,09 mT |
| Modulation | 0,0625 mT |
| Sweep Zeit | 60 bis 120 s |
| Verstärkung | 500 |
| Akkumulation | 1 |

Die Sweep Zeiten wurden auf Grund der unterschiedlichen Reaktionszeiten zwischen den Anthocyanen und der Spinsondereaktion angepasst. Diese betrug für die Lösungen mit den pH-Werten von pH 1,5 und pH 7 1 Minute und für die Lösung pH 10 2 Minuten. Von den aufgezeichneten Spektren wurde die Amplitude des mittleren Peaks ausgewertet. Die Auswertungen zeigen die arithmetischen Mittelwerte der dreifach durchgeführten Messungen mit der dazugehörigen Standardabweichung.

3. Material und Methoden

3.3.2 Lipid-Mikrokapseln (LMK)

3.3.2.1 UV/Vis-spektroskopische Anthocyanbestimmung nach Giusti *et al.*

Für die Bestimmung der Inkorporation im Rahmen der Entwicklung der Lipid-Mikrokapseln wurde die UV/Vis-Spektroskopische Anthocyanbestimmung nach Giusti *et al.* angewendet⁹⁰. Die verwendete Methode basiert auf der unterschiedlichen Absorption der Anthocyane im UV/Vis-Bereich bei steigenden pH-Werten. Sie dient der Bestimmung monomerer Anthocyane. Die Veränderung der Absorption der Anthocyane bei steigenden pH-Werten beruht auf der Umwandlung des bei pH 1 dominierenden farbigen Flavylium-Ions zum farblosen Hemiketal bei pH 4,5 (s. Kapitel 2.1). Durch Bestimmung der Absorption bei diesen beiden pH-Werten ist die Ermittlung der Gesamtkonzentration der monomeren Anthocyane auch neben Begleitsubstanzen, wie zum Beispiel Flavonoiden, zeitnah möglich. Der jeweilige Gesamtanthocyanengehalt wurde als Cy-3-glc (M_W : 449,2 g/mol; ϵ : 26.900 L/mol*cm; λ_{max} : 510 nm) berechnet.

Für die Messungen wurde 0,025 M Kaliumchlorid / Salzsäure-Puffer (pH 1) und ein 0,4 M Natriumacetat / Salzsäure-Puffer (pH 4,5) verwendet⁹⁰. Die zu bestimmende Probe wurde mit beiden Puffern so verdünnt, dass die Absorption bei pH 1 und am Absorptionsmaximum (λ_{max}) im Bereich zwischen 0,5 und 0,8 lag. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Probenvolumen 20 % des Gesamtvolumens nicht überschritt, da dadurch die Pufferkapazität erschöpft ist. Gleichung 1 zeigt die Berechnung des Verdünnungsfaktors.

$$V_F = \frac{V_{ges}}{V_{Probe}} \quad (1)$$

V_F Verdünnungsfaktor

V_{ges} Gesamtvolumen nach Pufferzugabe [mL]

V_{Probe} Probenvolumen [mL]

Als Referenz für die Messung der Proben dient, wie bei Giusti *et al.* beschrieben, gereinigtes Wasser. Die Probe wird bei beiden pH-Werten am Absorptionsmaximum von Cy-3-glc λ_{max} : 510 nm (A_{510}) sowie bei λ : 700 nm (A_{700}) vermessen. Die Messung bei λ : 700 nm dient der Eliminierung des Einflusses eventuell enthaltener Schwebeteilchen, da das Cy-3-glc bei dieser Wellenlänge bei beiden vorgelegten pH-Werten keine Absorption zeigt. Die Vermessung der Proben fand auf Grund der Instabilität der Anthocyane in wässriger Lösung bei pH 4,5 umgehend nach der Verdünnung statt. Zur Berechnung des Anthocyanengehalts C_A der Probe dienen die Gleichungen 2 und 3. In Gleichung 2 wird aus den gemessenen Absorptionen die korrigierte Absorption (A_{kor}) der Probe bestimmt. Unter Anwendung von Gleichung 3 kann die Gesamtanthocyanenkonzentration der Probe berechnet werden.

3. Material und Methoden

$$A_{\text{korr}} = (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH1}} - (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH4,5}} \quad (2)$$

$$c_A = \frac{A_{\text{korr}} * M_G * V_F * 1000}{\varepsilon} \quad (3)$$

- A_{korr} korrigierte Absorption
 c_A Anthocyankonzentration [mg/l]
 M_G Molekulargewicht [g/mol]
 V_F s. Gleichung 1
 ε Extinktionskoeffizient [L/mol*cm]

Die UV/Vis-spektroskopischen Messungen wurden am Spektralphotometer Spectronic® 601 (Milton Roy, Ivyland, Pennsylvania, USA) durchgeführt. Für die Messungen wurden Rotilabo®-Einmalküvetten aus Polystyrol (Carl Roth, Karlsruhe) mit einem Durchlässigkeitsbereich von 340 nm – 800 nm eingesetzt.

3.3.2.1.1 Bestimmung der Inkorporationsrate

Für die Bestimmung der Inkorporationsrate wurde die zu prüfende Probe aus dem Dispersionsmittel (W_2 -Phase) der LMK nach dem letzten Herstellungsschritt gezogen. Ein invasives Aufschmelzen der generierten LMK wurde dadurch vermieden. Die generierten LMK können alle weiter verwendet werden. Eine mögliche inhomogene Verteilung der Anthocyanlösung pH 2 in der Lipidphase und eine mögliche Volumenvergrößerung der W_2 -Phase bei der Herstellung der Doppelemulsion können als vernachlässigbar angesehen werden. Die Methode lieferte reproduzierbare Ergebnisse.

Zur Berechnung der zur Verkapselung eingesetzten Anthocyanmasse (m_A) wurde das Gesamtvolumen des Ansatzes nach der Zugabe der inneren wässrigen Phase (W_1) zur Lipidphase (O) der entstehenden W_1/O -Emulsion (s. Kapitel 4.2.1) bei 50 °C bestimmt. Dabei wurde von einer gleichmäßigen Verteilung der W_1 -Phase in der O-Phase ausgegangen. Die bestimmten Volumina sowie den daraus resultierenden prozentualen Anteil des in 5 g der Lipid / Emulgatorschmelze enthaltenen Ausgangs-Anthocyananteils ($m_{W_1/O}$) in Abhängigkeit vom Anteil der zugegebenen Anthocyanlösung pH 2 gibt Tabelle 3.3-2 wieder.

Tabelle 3.3-2 Übersicht über den in 5 g Lipid / Emulgatorschmelze enthaltenen Prozentsatz an Anthocyanlösung pH 2 in Abhängigkeit vom Anteil der zugegebenen Anthocyanlösung

| | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------|--------|--------|--------|
| Anteil der W_1 -Phase | 20 % | 40 % | 60 % |
| Volumen der entstehenden W_1/O -Emulsion | 6,5 mL | 7,5 mL | 8,5 mL |
| in 5 mL W_1/O -Emulsion enthaltener Ausgangs-Anthocyananteil ($m_{W_1/O}$) | 77 % | 67 % | 59 % |

3. Material und Methoden

$$m_{W_1/O} = c_{SL} * V_{W_1/O} \quad (4)$$

$m_{W_1/O}$ Masse der in der W_1/O -Emulsion enthaltenen Anthocyane [mg]

c_{SL} Konzentration der Anthocyan-Stammlösung [mg/L]

$V_{W_1/O}$ Volumen der inneren Phase der W_1/O -Emulsion [L]

$$m_{GA} = m_{W_1/O} * x \quad (5)$$

m_{GA} absolute Masse der in der $W_1/O/W_2$ -Emulsion enthaltenen Gesamtanthocyane [mg]

$m_{W_1/O}$ s. Gleichung 4

x Prozentsatz von $m_{W_1/O}$, der zur Herstellung der $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsion dient [%]

Der durch die UV/Vis-spektroskopische Methode (s. Kapitel 3.3.2.1) ermittelte Messwert ist die Gesamtanthocyankonzentration der W_2 -Phase (c_{W_2}). Diese wurde zur Berechnung der Anthocyanmasse (m_{W_2}) in der äußeren wässrigen Phase herangezogen (s. Gleichung 6). Dabei wurde eine mögliche Volumenzunahme der W_2 -Phase durch die Zugabe der W_1/O -Emulsion vernachlässigt.

$$m_{W_2} = c_{W_2} * V_{W_2} \quad (6)$$

m_{W_2} Masse der in der W_2 -Phase enthaltenen Anthocyane [mg]

c_{W_2} Gesamtanthocyankonzentration der W_2 -Phase [mg/L] (Messwert, s. Kapitel 3.3.2.1)

V_{W_2} Volumen der W_2 -Phase [L]

Die Gleichung 7 dient zur Berechnung der im Kapselkern (W_1 -Phase) inkorporierten Anthocyanmasse.

$$m_{W_1} = m_{GA} - m_{W_2} \quad (7)$$

m_{W_1} Masse der im Kapselkern gelösten Anthocyane [mg]

m_{GA} s. Gleichung 5

m_{W_2} s. Gleichung 6

Mit Hilfe der Gleichung 8 lässt sich abschließend die prozentuale Inkorporationsrate berechnen.

$$IR = \frac{m_{W_1}}{m_{GA}} * 100 \quad (8)$$

IR Inkorporationsrate [%]

m_{W_1} s. Gleichung 7

m_{GA} s. Gleichung 5

3. Material und Methoden

3.3.2.2 Duale asymmetrische Zentrifuge - SpeedMixer™

Für die Herstellung der LMK wurde ein in der Pharmazeutischen Technologie bisher wenig eingesetztes Homogenisierungsprinzip angewendet. Das Prinzip des SpeedMixer™ beruht auf einer doppelten Rotation des Mischbechers. Die Hauptrotation erfolgt durch den Rotationsarm des SpeedMixer™ (Rotation 1 – bis zu 3500 U/min) und zwingt die Probe auf Grund von Zentrifugalkräften an die Gefäßwand. Die Probenhalterung, in die der Mischbecher eingesetzt wird, rotiert in entgegengesetzter Richtung um die eigene Achse (Rotation 2 – ca. 900 U/min) (s. Abbildung 3.3-1). Auf Grund von Adhäsionskräften zwischen dem Probenmaterial und dem Mischbecher wird die Probe in die entgegengesetzte Richtung beschleunigt. Durch die entgegengesetzte Rotation wird der SpeedMixer™ auch „Duale asymmetrische Zentrifuge“ (DAC) genannt. Die Winkelbeschleunigung betrug jeweils 122 1/s^2 . Durch diese in den unterschiedlichen Ebenen des Mischbechers wirkenden Zentrifugalkräfte wird ein schnelles Mischen ermöglicht ^{91,92}. Verwendet wurde der SpeedMixer™ DAC 150 SP (Hauschild & Co. KG, Hamm). Bei diesem Gerät ist es möglich, verschiedene Rotationszyklen hintereinander zu fahren, die nahtlos ineinander übergehen. Für die Herstellung der LMK wurde ein Zyklus von 2 min bei 3500 U/min und 2 min bei 500 U/min angewendet.

Ein weiterer Vorteil des SpeedMixer™ ist die entfallende Reinigung des Mixers, da dieser ohne weitere Mischwerkzeuge arbeitet. Die Ansätze wurden in 125 mL Aponorm® (WEPA Apothekenbedarf GmbH & Co. KG, Hilscheid) Kruken aus Polypropylen homogenisiert.

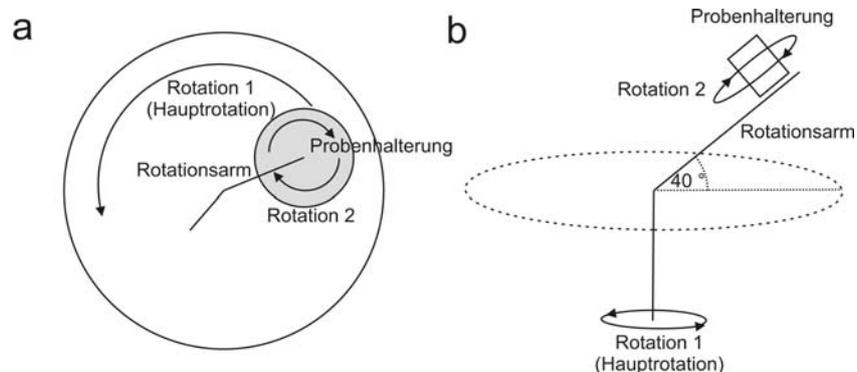


Abbildung 3.3-1 Funktionsprinzip des SpeedMixer™: a) Ansicht von oben und b) Ansicht von der Seite (nach ⁹²).

3.3.2.3 Lichtmikroskopie

Für die Visualisierung der entwickelten Lipidmikrokapseln wurden zwei unterschiedliche Lichtmikroskope verwendet. Für Übersichten der generierten Mikrokapseln wurde das Auflicht-Mikroskop Olympus SZX 9 (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg) verwendet. Um Probendetails zu verdeutlichen bzw. einzelne Kapseln zu vergrößern, wurde das Durchlicht-Mikroskop Axiolab (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) verwendet.

3.3.2.4 Statische Lichtstreuung

Die Partikelgrößenverteilung der Lipidmikrokapseln wurde durch die statische Lichtstreuung mittels Mastersizer 2000 (Malvern Instruments GmbH, Herrenberg) charakterisiert. Dafür wurden die Kapseln bei Raumtemperatur in gereinigtem Wasser dispergiert. Für die Messung wurde ein roter Laser (Wellenlänge λ : 633 nm) und ein blauer Laser (Wellenlänge λ : 450 nm) verwendet. Zur Berechnung mit der Gerätesoftware (Mastersizer 2000, Version 5.22, Malvern) wurde die Theorie nach Fraunhofer angewendet. Allgemein anerkannt ist, dass eine Partikelgrößenverteilung durch die Werte $d_{(0,1)}$, $d_{(0,5)}$ (Median) sowie $d_{(0,9)}$ charakterisiert ist⁹³. Diese Werte wurden für die entsprechenden Partikelgrößenverteilungen ausgewertet. Die angegebenen Werte entsprechen den arithmetischen Mittelwerten einer Dreifachbestimmung ($n = 3$) mit jeweils fünf Messdurchgängen.

3.3.2.4.1 $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsionen

Die Tropfengrößenverteilung der äußeren W_1/O -Tropfen des Systems DE wurden mit dem im vorhergehenden Kapitel eingeführten Mastersizer 2000 (Malvern Instruments GmbH, Herrenberg) bei Raumtemperatur bestimmt. Für die Auswertung mittels der Mie-Theorie (Mastersizer 2000, Version 5.22, Malvern) wurde ein Brechungsindex von 1,47 vorgegeben. Die charakteristischen Tropfengrößen $d_{(0,1)}$, $d_{(0,5)}$ und $d_{(0,9)}$ sowie der Sauterdurchmesser $d_{(3,2)}$ der volumenverteilten Tropfengrößen Q_3 wurden zur Beschreibung der Mikrostruktur der Emulsion ermittelt. Alle Resultate sind arithmetische Mittelwerte einer dreifachen Bestimmung ($n = 3$) mit jeweils fünf Messdurchgängen. Die Messungen führte der Kooperationspartner des TP 4 (Universität Karlsruhe) durch.

3.3.2.5 Rasterelektronenmikroskopie (ESEM)

Um die genaue Oberflächenstruktur der Lipidmikrokapseln zu charakterisieren, wurden diese mittels atmosphärischer Rasterelektronenmikroskopie bildlich dargestellt (ESEM XL 30 FEG - Philips, Amsterdam, Niederlande). Für einen detaillierten Einblick in das Kapselinnere wurden die Lipidmikrokapseln vor der Analyse auf einem Objektträger aus Glas unspezifisch mit einer Rasierklinge behandelt, um die Kapseln partiell zu zerteilen.

3.3.2.6 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Für die Bestätigung, dass der HBE tatsächlich verkapselt wurde und nicht nur an der Kapselaußenseite haftet, wurden dreidimensionale Scans der Lipidmikrokapseln mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop "LSM 710", ausgerüstet mit einem Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27 Objektiv (beides: Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena), angefertigt. Für diese Aufnahmen lagen die Kapseln auf einem Objektträger, durch ein Deckglas

3. Material und Methoden

abgedeckt, in gereinigtem Wasser dispergiert vor. Die Probe wurde mit einem Helium-Neon-Laser bei λ : 633 nm angeregt. Die Bildaufnahme erfolgte in sechs verschiedenen Ebenen mit einem Abstand von jeweils 6 μm . Ausgewertet wurden die Bilder mit der Software ZEN 2009 Light Edition (Carl Zeiss MicroImaging GmbH).

3.3.2.7 Differenzialthermoanalyse (DSC)

Für die genaue Analyse des Schmelzpunktes der entwickelten Lipidmikrokapseln auf Hartfettbasis wurden diese mittels der Differenzialthermoanalyse (DSC 200 - Netzsch, Selb) untersucht. Ein Analysenzyklus beinhaltete das Aufheizen der Probe von 15 °C auf 80 °C mit der anschließenden Abkühlung auf 15 °C. Die Probe wurde in einen Aluminiumtiegel eingewogen. Als Referenz diente ein unbefüllter Aluminiumtiegel. Um Verschiebungen der Schmelzpunkte herauszufinden, erfolgte nach dem vorherigen Abkühlen eine erneute Erwärmung der Probe auf 80 °C. Die Aufheiz- bzw. Abkühlrate betrug jeweils 5 K/min.

3.3.2.8 Freisetzung

Die Freisetzungsversuche der entwickelten Lipidmikrokapseln wurden analog zu den in Kapitel 3.3.3.2 beschriebenen Freisetzungsversuchen der Kapselsysteme aus dem Cluster durchgeführt. Es wurden jeweils drei Versuchsansätze analysiert (n = 3).

3.3.3 Charakterisierung der Kapselsysteme aus dem Cluster

3.3.3.1 Zusammensetzung der verwendeten Medien

Simulierter Magensaft (SGF)

Die Simulation des Magenmilieus erfolgte in simuliertem Magensaft pH 1,2 (ohne Enzymzusatz) (USP 32 – Gastric Fluid, Simulated, TS).

FaSSIF und FeSSIF

Grundlage der beiden, den Dünndarm simulierenden, Inkubationsmedien bildete der Phosphatpuffer pH 6,8 nach Sørensen (53,4 % Kaliumdihydrogenphosphat 1/15 M und 46,6 % Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat 1/15 M). Beide Medien wurden durch die Zugabe von Gallensalzen, Phospholipiden sowie Natrium- und Calciumchlorid komplettiert (s. Tabelle 3.3-3)⁹⁴. Der heterogene Gallenextrakt aus Schweinegalle als Quelle für die Gallensalze wurde mittels Ecoline[®] S⁺ Test (Diagnostic Systems GmbH, Holzheim) standardisiert.

3. Material und Methoden

Tabelle 3.3-3 Zusammensetzung der verwendeten simulierten Darmmedien

| | FaSSIF | FeSSIF |
|----------------|-----------|-----------|
| Gallensalze | 5,00 mM | 15,00 mM |
| Phospholipide | 1,25 mM | 3,75 mM |
| Natriumchlorid | 150,00 mM | 150,00 mM |
| Calciumchlorid | 5,00 mM | 5,00 mM |

3.3.3.2 Freisetzungsversuche

3.3.3.2.1 Versuchsdesign

Die *in vitro* Freisetzungsversuche wurden in einem End-over-End-Mischer (s. Abbildung 3.3-2) durchgeführt. Dieser Mischer war auf $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ temperiert und drehte sich permanent mit 10 U/min um die eigene horizontale Achse.

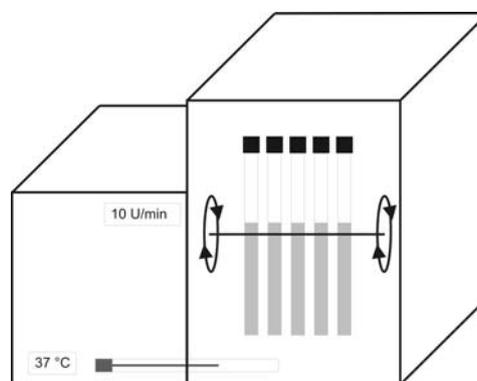


Abbildung 3.3-2 Schematischer Aufbau des End-over-End-Mischers

Die untersuchten Kapselsysteme waren in permanentem Kontakt mit dem jeweiligen Freisetzungsmedium (SGF bzw. FeSSIF). Die eingesetzten Kapselsysteme sowie die verwendeten Inkubationsmedien wurden vor dem Beginn der Inkubationen im Wasserbad auf $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ erwärmt. In vorgelagerten Studien wurde der Gesamtanthocyangehalt jedes einzelnen Kapselsystems ermittelt und als 100 % gesetzt. Alle durch die Freisetzung analysierten Werte wurden auf diesen Gesamtanthocyangehalt bezogen als Cy-3-glc ausgewertet. Die absolute Probenmenge pro Versuchsansatz wurde für den nicht verkapselten HBE sowie die einzelnen Kapselsysteme spezifisch berechnet. Diese lag bei jeweils 0,7 % (m/V) Gesamtanthocyangehalt pro Versuchsansatz.

Unter Berücksichtigung der Methoden zur Wirkstofffreisetzung aus festen, magensaftresistent überzogenen Arzneiformen der gängigen Arzneibücher (Ph. Eur., USP) erfolgte eine Inkubation der Proben für 120 Minuten in SGF. Nach dem geforderten Mediumwechsel hin zu höheren pH-Werten schreiben diese Arzneibücher eine minimale Inkubationszeit von 45 Minuten vor. In den vorliegenden Versuchsreihen wurden die Kapselsysteme für 150 Minuten in dem Medium mit höherem pH-Wert inkubiert, da nach 45-

3. Material und Methoden

minütiger Inkubation noch eine anhaltende Freisetzung der verkapselten Anthocyane zu beobachten war.

Die Versuche wurden nach der Kontrolle der pH-Werte mit einer Glaselektrode (Inlab[®] Semi-Micro, Mettler-Toledo GmbH, Gießen) durch das Zusammengeben von Probe und Inkubationsmedium mit der Entnahme der ersten Probe zum Zeitpunkt $t = 0$ Minuten gestartet. Bei den Inkubationen in FeSSIF wurden anschließend 450 U/mL Pankreatin zugesetzt. Zu definierten Zeitpunkten (10, 20, 30, 45, 60 und 120 Minuten für Inkubationen in SGF; 10, 20, 30, 60, 120 und 150 Minuten für Inkubationen in FeSSIF) wurde jeweils 100 μ l Probe entnommen und zum Stoppen der Enzymreaktion sowie zur Stabilisierung der freigesetzten Anthocyane mit 900 μ l eines Gemisches aus Ameisensäure / Methanol / doppelt destilliertem Wasser (10 / 50 / 40 V/V/V) versetzt^{39,71}. Um die dispergierten Anteile abzutrennen, wurden die Proben für 5 Minuten bei 11.300* g zentrifugiert (Eppendorf MiniSpin[®], Eppendorf, Hamburg). Die so gewonnenen Überstände wurden in HPLC-Probengefäße aus Braunglas überführt und bei -20 °C im Dunkeln gelagert. Bei den Versuchsansätzen in FeSSIF wurde vor der Entnahme der 100 μ l Probe der pH-Wert mittels 1 N Natriumhydroxid Lösung auf das initiale Level von pH 6,8 justiert⁹⁵. Die Absenkung des pH-Wertes beruht auf der Freisetzung von freien Fettsäuren aus den Phospholipiden, die Bestandteil des Inkubationsmediums sind. Bei den Ansätzen in SGF war keine Justierung des pH-Wertes notwendig, da sich dieser während der gesamten Inkubationszeit nicht änderte.

Alle Versuchsansätze wurden dreifach durchgeführt ($n = 3$).

3.3.3.2.2 HPLC-UV/Vis-Identifizierung und -Quantifizierung

Die freigesetzten Anthocyane wurden unter Verwendung eines HPLC-UV/Vis Systems der Firma Jasco (Gross-Umstadt) bei einer Wellenlänge von λ : 520 nm vermessen. Anhand vorhandener Referenzsubstanzen wurden die unterschiedlichen Anthocyane des HBE charakterisiert und quantifiziert.

Das verwendete HPLC-System setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

- Entgaser: DG-2080-53 3-Line Degasser
- Pumpe: PU-2080 Intelligent HPLC-Pump
- Autosampler: AS-2055/2057 Intelligent Autosampler
- Injektor: AS-2055 Plus Intelligent Sampler
- Detektor: UV-2075 Plus Intelligent UV/Vis Detektor (Wellenlänge: λ : 520 nm)
- Software: ChromPass Chromatography Data System

Als Säule wurde eine Phenomenex Luna 3 μ m C18 (2) 100 Å 250 mm x 4,6 mm sowie eine entsprechende Vorsäule (beide: Phenomenex, Aschaffenburg) verwendet.

3. Material und Methoden

Für die Messung der 15 Anthocyane des HBE sowie des zugesetzten internen Standards (IS) wurden 20 µl Probe in das System injiziert. Dabei betrug die Flussrate 0,5 mL/min. Die mobilen Phasen (Fließmittel A und B) wurden in einem Gradientensystem (s. Tabelle 3.3-4) eingesetzt:

Fließmittel A: Wasser / Acetonitril / Ameisensäure (87 / 3 / 10 V/V/V) und

Fließmittel B: Wasser / Acetonitril / Ameisensäure (40 / 50 / 10 V/V/V).

Beide Fließmittel wurden in einem Gradienten eingesetzt (s. Tabelle 3.3-4)

Tabelle 3.3-4 Zusammensetzung des Gradienten für die Auftrennung der Anthocyane mittels HPLC (nach ⁵⁵)

| Zeit [min] | Fließmittel A [% (V/V)] | Fließmittel B [% (V/V)] | Fluss [mL/min] |
|------------|-------------------------|-------------------------|----------------|
| 0 | 98 | 2 | 0,5 |
| 20 | 86 | 14 | 0,5 |
| 25 | 86 | 14 | 0,5 |
| 33 | 86 | 14 | 0,3 |
| 40 | 86 | 14 | 0,3 |
| 50 | 85 | 15 | 0,5 |
| 55 | 81 | 19 | 0,5 |
| 65 | 80 | 20 | 0,5 |
| 65,1 | 1 | 99 | 0,5 |
| 70 | 1 | 99 | 0,5 |
| 70,1 | 98 | 2 | 0,5 |
| 75 | 98 | 2 | 0,5 |

Des Weiteren wurden ein Fließmittel (Fließmittel C) zum Spülen der Säule und ein Fließmittel (Fließmittel D) zum Spülen der Spritze nach der Injektion verwendet:

Fließmittel C: Wasser / Acetonitril (40 / 60 V/V) und

Fließmittel D: Wasser / Acetonitril / Ameisensäure (10 / 80 / 10 V/V/V)

Die in den Proben enthaltenen Anthocyane wurden über die Retentionszeiten mit denen von Referenzsubstanzen identifiziert ⁷¹. Die gesamte Quantifizierung der 15 einzelnen Anthocyane wurde jedoch nur als Cy-3-glc vorgenommen und als Gesamtanthocyangehalt ausgewertet.

Für die Kalibrierung wurde das isolierte, reine Cy-3-glc in Laufmittel A gelöst und in Konzentrationen zwischen 0,262 µg/mL bis 62 µg/mL analysiert. Als interner Standard wurde Delphinidin-2,5-O-diglukpyranosid (Delphin) (0,8 mg/mL) hinzugefügt. Delphin ist ebenfalls ein Anthocyan, welches jedoch nicht im verwendeten HBE vorkommt. Die Absorptionsmaxima des Cy-3-glc und des Delphins liegen beide bei λ : 520 nm. Nach der

3. Material und Methoden

Integration der ermittelten Peakflächen beider Substanzen wurde der Quotient gebildet und gegen den Quotienten der jeweiligen Konzentration aufgetragen⁵⁵. Das Limit der Quantifizierung (limit of quantification – LOQ) mit einem Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) (10:1) schwankte um 0,3 mg/l und das Limit der Detektion (limit of detection – LOD; S/N 3:1) um 0,1 mg/mL⁹⁶.

Die HPLC-UV/Vis-Identifizierung und -Quantifizierung erfolgte in Zusammenarbeit mit den Partnern des Teilprojektes 7 (TU Kaiserslautern).

3.3.3.2.3 Lipidanalytik: Pankreatintest

Die Durchführung des Pankreatintests erfolgte analog zu den Freisetzungsuntersuchungen (s. Kapitel 3.3.3.2.1) in einem End-over-End-Mischer (siehe Abbildung 3.3-2). Die Inkubationsmedien (FaSSIF und FeSSIF) wurden vor dem Beginn des Experimentes im Wasserbad auf $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ erwärmt. Die für jeden Versuchsansatz benötigte Menge an Emulsion wurde auf 1 % (m/V) Lipidanteil pro Reaktionsgefäß kalkuliert. Um den Einfluss der freien Fettsäuren, welche sich in den Verdaumedi en aus den Phospholipiden bilden, zu analysieren, wurde jeweils parallel ein Blindversuch durchgeführt. Nach der Kontrolle des pH-Wertes der Inkubationsmedien mit einer Glaselektrode (Inlab[®] Semi-Micro, Mettler-Toledo GmbH, Gießen) wurde der Pankreatintest durch die Zugabe der Doppelemulsion gestartet. Nach der Entnahme der ersten Probe (t = 0 Minuten) wurde den Ansätzen jeweils 450 U/mL Pankreatin zugesetzt. Zu festgelegten Zeitpunkten (5, 10, 20, 30, 60, 120 min) wurde der pH-Wert mittels 1 N Natriumhydroxidlösung zu seinem initialen Wert von pH 6,8 justiert. Anschließend wurden 100 µl Probe entnommen und mit 900 µl einer Mischung aus Chloroform / Methanol (50 / 50 V/V) verdünnt, um die Enzymreaktion zu stoppen und die gebildeten Lipidfraktionen in die organische Phase zu überführen. Zur Abtrennung der dispergierten Bestandteile wurden die Proben bei 11.300*g für 5 Minuten zentrifugiert (Eppendorf MiniSpin[®], Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde in ein HPLC-Probengefäß aus Braunglas überführt und bei -18 °C gelagert. Alle Versuche wurden dreifach durchgeführt (n = 3).

3.3.3.2.4 Hochauflösende Dünnschichtchromatographie (HPTLC)

Die Auftrennung der Lipidfraktionen wurde mittels Hochauflösender Dünnschichtchromatographie (HPTLC) durchgeführt (AMD 2, CAMAG, Muttenz, Schweiz). Als Elutionsmittel wurde ein elfstufiger Gradient, basierend auf Hexan und Ethylacetat, verwendet (s. Tabelle 3.3-5).

3. Material und Methoden

Tabelle 3.3-5 Zusammensetzung des elfstufigen Gradienten für die Auftrennung der Lipidfraktionen mittels HPTLC

| Stufe | Hexan [% (V/V)] | Ethylacetat [% (V/V)] | Elutionstrecke [mm] |
|-------|--------------------|--------------------------|------------------------|
| 1 | 70,0 | 30,0 | 20,0 |
| 2 | 73,0 | 27,0 | 25,1 |
| 3 | 76,0 | 24,0 | 30,2 |
| 4 | 79,0 | 21,0 | 35,3 |
| 5 | 82,0 | 18,0 | 40,4 |
| 6 | 85,0 | 15,0 | 45,5 |
| 7 | 88,0 | 12,0 | 50,6 |
| 8 | 91,0 | 9,0 | 55,7 |
| 9 | 94,0 | 6,0 | 60,8 |
| 10 | 97,0 | 3,0 | 65,9 |
| 11 | 100,0 | 0,0 | 71,0 |

Zur Fixierung der Lipidfraktionen (Triglyceride, Diglyceride, Monoglyceride und freie Fettsäuren) wurden die entwickelten HPTLC-Platten für 20 Sekunden in eine wässrige Kupfersulfatlösung (Kupfersulfat / Phosphorsäure / Methanol 15 / 8 / 5 m/m/m) getaucht und anschließend für 50 Minuten bei 150 °C im Ofen fixiert. Die Lipidderivate wurden *in situ* spektrodensitrometrisch bei λ : 675 nm (Wolfram-(Halogen)-Lampe) quantifiziert (CAMAG TLC Scanner 3) ⁹⁷. Ölsäure ist die am häufigsten vorkommende Fettsäure im verwendeten Lipid (~ 65 %; analysiert durch St. Wendeler Ölsaaten GmbH & Co. KG, St. Wendel). Auf Grund dessen wurden alle detektierten Acylglyceride als Ölsäure und dessen Glyceride quantifiziert. Für die Quantifizierung wurden Standardsubstanzen auf jede HPTLC-Platte aufgetragen. Die Kalkulation der Resultate erfolgte mittels der CAMAG Gerätesoftware winCATS (Version 1.4.2.8121).

3.3.4 Rheologische Untersuchungen an Molkenproteinisolat-Gelen

Alle untersuchten Molkenproteinisolat-Lösungen wurden aus einer 30%igen (m/m) MPI-Stammlösung in gereinigtem Wasser hergestellt. Diese Stammlösung wurde vor der Weiterverarbeitung für mindestens 12 h bei 2 °C bis 8 °C gelagert, um die Proteine komplett zu hydratisieren ⁹⁸. Anschließend wurde der Ansatz mit gereinigtem Wasser zu einer 15%igen bzw. 20%igen Lösung verdünnt. Die Kontrolle der pH-Werte (Soll: pH 6,8) der verdünnten Lösungen erfolgte mit einer Glaselektrode (Inlab[®] Semi-Micro, Mettler-Toledo GmbH, Gießen). Um die gewünschten Konzentrationen von 15 % (m/m) und 20 % (m/m) MPI bei einem pH-Wert von pH 1,5 einzustellen, wurde die 30%ige (m/m) MPI-Stammlösung unter stetigem Rühren mit 1 N Salzsäure langsam auf pH 1,5 justiert. Falls nötig wurde diese Lösung mit gereinigtem Wasser unter der Kontrolle des pH-Wertes auf die gewünschte

3. Material und Methoden

Konzentration von 15 % bzw. 20 % MPI verdünnt.

Bis zur Weiterverarbeitung lagerten die hergestellten MPI-Verdünnungen bei 2 °C bis 8 °C. Direkt vor der Weiterverarbeitung wurden diese Lösungen unter stetigem Rühren auf Raumtemperatur erwärmt. Die verwendeten Lösungen lagerten nicht länger als sieben Tage bis zu den jeweiligen Untersuchungen.

3.3.4.1 Gefäß-Wasserbad-Methode

In 1,5 mL HPLC-Probengefäßen aus Klarglas wurde jeweils 1 mL der zu untersuchenden MPI-Lösungen gefüllt und dicht verschlossen. Dieses Gefäß wurde senkrecht in einem Wasserbad in 2 K Temperaturschritten von 40 °C bis 90 °C inkubiert. Zwischen den einzelnen Messpunkten wurde eine 5-minütige Aufheizphase eingehalten, damit sich die vorgegebene Temperatur des Wasserbades in der zu untersuchenden Probe einstellen konnte. Eine zusätzliche Überprüfung der digitalen Temperaturanzeige des Wasserbades erfolgte mit einem externen Thermometer. Bei den jeweiligen Messpunkten wurde das Probengefäß entnommen und horizontal um 180 ° gedreht, um den Sol / Gel-Übergang zu visualisieren. Während des Umkehrens des Probengefäßes wurde deutlich, ob das Sol der Schwerkraft folgend im Gefäß fließt (= Sol) oder ob es bereits geliert war und am Gefäßboden haftete (= Gel). Die angegebenen Temperaturen sind auf ganze Zahlen gerundete, arithmetische Mittelwerte der dreifachen Versuchsdurchführung (n = 3).

3.3.4.2 Oszillierende Rheologie

Für oszillierende Messungen wurde ein Rotations-Viskosimeter nach dem Kegel-Platte-Prinzip verwendet (Physika MCR 301 - Anton Paar, Ostfildern). Dieses Rheometer ist mit einer temperierbaren Heizeinheit aufgebaut, die es ermöglicht, die Probe kontrolliert zu erwärmen. Der verwendete Kegel hatte einen Durchmesser von 5 cm und eine Krümmung von 1 °. Zur Auswertung wurde das Programm Rheoplus (Anton Paar) genutzt, welches das Speicher (G')- und das Verlustmodul (G'') der Proben bei den jeweiligen Versuchsdurchführungen berechnete.

Die zu untersuchenden MPI-Lösungen (s. Kapitel 3.3.4) wurden zwei unterschiedlichen Messverfahren unterzogen:

1. einer Temperaturrampe im Temperaturbereich von 25 °C bis 95 °C mit einer Heizrate von 5 K pro Minute, mit darauf folgenden Messungen beim Abkühlen der Probe. Die Deformation der Amplitude betrug 5 % bei einer konstanten Frequenz von 1 Hz. Die Dauer eines Messpunktes betrug 0,5 min. Für diese Versuchsanordnung wurde jeweils 1 mL Probe aufgetragen. Nach dem korrekten Einsetzen des Kegels wurden überstehende Probenreste entfernt. So konnte die Abwesenheit von Luftblasen im

3. Material und Methoden

Messsystem sichergestellt werden.

2. einem Frequenztest der auf 25 °C abgekühlten Gele bei konstant bleibender Temperatur. Die Deformation der Amplitude betrug 5 % bei einer variierenden Frequenz von 0,1 Hz bis 100 Hz.

Die angegebenen Sol / Gel-Übergangstemperaturen sind arithmetische Mittelwerte aus den jeweils dreifach durchgeführten Messungen (n = 3). Die dargestellten Rheogramme entsprechen einer Auswahl der bei dieser Dreifachbestimmung ermittelten Rheogramme.

3.3.4.3 Benchtop-NMR

Für die nicht invasive Benchtop-NMR-Analyse wurde ein 20 MHz Benchtop-NMR-System (Maran DRX2, Oxford Instruments Molecular Bio Tools, Oxford, UK) eingesetzt. Der verwendete Resonator ist mit einer 18 mm (Durchmesser) großen Probenaufnahmeröhre bestückt und über die geregelte Luftzufuhr temperierbar. Mit diesem System ist es möglich, T_1 - (Spin-Gitter) und T_2 - (Spin-Spin) Relaxationszeiten zu ermitteln. Des Weiteren können 3D-Bilder aufgezeichnet werden (MRI Imaging). Für diese Arbeit wurden T_2 -Relaxationszeiten mittels CPMG-Sequenz bestimmt. Dafür wurde jeweils 1 mL Probe (s. Kapitel 3.3.4) in ein 1,5 mL HPLC-Probengefäß aus Klarglas gefüllt und im Resonator erschütterungsfrei positioniert. Der Luftraum über der Probe im Probengefäß sollte möglichst gering sein, um störende Einflüsse von verdunstetem Wasser ausschließen zu können. Um die temperaturabhängigen Relaxationszeiten der Proben zu ermitteln, wurde ein Temperaturprogramm eingestellt. Dieses wärmte die Probe von 40 °C bis 90 °C in 2 K-Schritten auf. Zwischen den einzelnen Temperaturschritten war eine Aufwärmzeit von 5 Minuten gegeben. Bei jedem Temperaturpunkt wurden zwei Messungen im Abstand von 2 Minuten durchgeführt, um aufheizbedingte Messfehler auszuschließen. Die weiteren Messparameter sind in Tabelle 3.3-6 aufgeführt. Die durch das Gerät angezeigte Temperatur wurde durch Temperaturmessungen von gereinigtem Wasser (ohne Zusätze) mit einem externen Thermometer überprüft und bei Abweichungen in der Auswertung angepasst.

Tabelle 3.3-6 Übersicht über die am Benchtop-NMR verwendeten Messparameter

| Parameter | | Wert |
|------------------|--------|--------|
| Anzahl der Echos | NECH | 12.288 |
| Verstärkung | RG | 25 |
| Verzögerungszeit | RD [s] | 12 |
| Anzahl der Scans | NS | 16 |
| Pulssequenz | SEQ | CPMG* |

*Carr-Purcell-Meiboom-Gill

3. Material und Methoden

Mit Hilfe des Programmes Windows Distributed EXponential analysis (WinDXP, Oxford Instruments Molecular Bio Tools) wurden die bei den jeweiligen Temperaturen aufgezeichneten Relaxationsabfälle mittels der inversen Laplace-Theorie analysiert und die T_2 -Relaxationszeiten der Protonen des Lösungsmittels (gereinigtes Wasser) ausgewertet. Diese T_2 -Relaxationszeiten der einzelnen Messpunkte wurden für jede Probe gegen die Temperatur aufgetragen. Die Sol / Gel-Übergangstemperatur wurde graphisch durch den Schnittpunkt zweier Geraden (1. Gerade: abfallende T_2 -Relaxationszeitkurve; 2. Gerade: nach dem Abfall konstante T_2 -Relaxationszeitkurve) ermittelt. Von diesem Schnittpunkt wurde das Lot auf die Abszisse gefällt um die Temperatur des Gelpunktes abzulesen.

Für Vergleiche der T_2 -Relaxationszeiten wurden Spektren der MPI-Lösungen, von Salzsäure pH 1,5 sowie von gereinigtem Wasser bei 25 °C aufgezeichnet. Die Gele, die sich während des Temperaturprogramms gebildet haben, wurden nach dem Abkühlen ebenfalls bei 25 °C vermessen.

Die angegebenen Temperaturen sind arithmetische Mittelwerte aus den dreifach durchgeführten Messungen ($n = 3$). Die dargestellten Relaxationszeitverteilungen entsprechen einer Auswahl der ermittelten Spektren.

3.3.4.4 Prüfung der Geltextrur

Für die Ermittlung der Textur der MPI-Gele wurden diese unter Druck mit einem Texture Analyzer (EZ Test, Shimadzu Europa GmbH, Duisburg) komprimiert. Dafür wurden die MPI-Lösungen in beidseitig verschlossenen Aluminiumröhrchen (Länge: 3,5 cm, Durchmesser: 1,0 cm) für 10 Minuten bei 80 °C im Wasserbad geliert. Diese Zeiten entsprechen dem Verkapselungsprozess des Systems MP (s. Kapitel 3.2.3). Die entstandenen Gelstränge wurden nach dem Abkühlen aus dem Aluminiumröhrchen entnommen und mit einem Skalpell in Zylinder geschnitten (Höhe: 0,5 cm, Durchmesser: 1,0 cm). Der Stempel des Texture Analyzers hatte einen Durchmesser von 1,0 cm. Dieser komprimierte den Gelzylinder mit einer Geschwindigkeit von 0,5 mm/min. Alle 0,1 mm wurde die auf den Gelzylinder einwirkende Kraft gemessen. Nach 3,0 mm wurde die Belastung von der Probe genommen. Zur Dekompression wurde der Stempel mit 0,5 mm/min vom Gelzylinder entfernt. Alle 0,1 mm wurde die Kraft gemessen, die bei der Dekompression auf den Gelzylinder einwirkte. Es wurden jeweils drei Gelstränge hergestellt, aus deren Mitte die Gelzylinder geschnitten wurden. Alle Messungen wurden dreifach ($n = 3$) an einem separaten Gelzylinder durchgeführt.

3. Material und Methoden

3.3.5 Datenauswertung

Diese Arbeit stellt eine Pilotstudie dar. Die aus den ermittelten Daten bestimmten statistischen Parameter (Arithmetische Mittelwerte, Standardabweichungen) beruhen auf der Annahme, dass die zur Grundlage dienende Grundgesamtheit der Daten normalverteilt ist. Der Test auf Normalverteilung wurde auf Grund der geringen Stichprobenumfänge ($n = 3$ bzw. $n = 4$) nicht durchgeführt.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Charakterisierung Heidelbeerextrakt

4.1.1 Auftrennung der Anthocyane mittels HPLC-UV/Vis-Spektroskopie

Zu Beginn der Untersuchungen des Heidelbeerextraktes wurden die darin enthaltenen Anthocyanfraktionen mittels HPLC-UV/Vis aufgespalten (s. 3.3.3.2.2). Das HPLC-UV/Vis Chromatogramm ist in Abbildung 4.1-1 dargestellt.

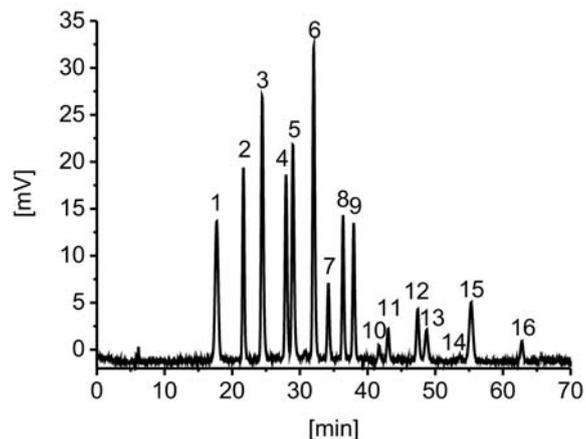


Abbildung 4.1-1 HPLC-UV/Vis Chromatogramm (520 nm – verdünnt in Laufmittel A) der im HBE vorkommenden Anthocyane: 1: IS (Delphinidin-3,5-O-diglukosid); 2: Del-3-gal; 3: Del-3-glc; 4: Cy-3-gal; 5: Del-3-ara; 6: Cy-3-glc; 7: Pet-3-gal; 8: Cy-3-ara; 9: Pet-3-glc; 10: Peo-3-gal; 11: Pet-3-ara; 12: Peo-3-glc; 13: Mal-3-gal; 14: Peo-3-ara; 15: Mal-3-glc; 16: Mal-3-ara

Die 15 Anthocyanfraktionen des HBE konnten erfolgreich aufgetrennt werden. Durch die Integration der einzelnen Peaks wurde der jeweilige Gesamtanthocyangehalt der Kapselsysteme (als Cy-3-glc angegeben) ermittelt. Auf diesen Ergebnissen basierend wurden die einzelnen Proben der folgenden Kapitel quantitativ ausgewertet.

4.1.2 Lösen des HBE in Puffersystemen

Für die im folgenden Kapitel (4.1.2.1) bestimmte antioxidative Kapazität der HBE-Anthocyane wurde der HBE in drei Puffermedien gelöst (s. Kapitel 3.3.1). Mit diesen drei Medien sollte der gesamte pH-Bereich dargestellt werden: der stark saure pH-Bereich (HCl pH 1,5), der neutrale pH-Bereich (Trizma[®]-Puffer pH 7,0) sowie der alkalische pH-Bereich (Carbonatpuffer pH 10,0). Der Gesamtanthocyangehalt wurde mittels HPLC-UV/Vis-Spektroskopie bestimmt (s. 3.3.3.2.2) und als Cy-3-glc dargestellt (s. Tabelle 4.1-2). Bei den verwendeten Medien sank der eingestellte pH-Wert rapide ab. Die Pufferkapazität des Trizma[®]-Puffers sowie des Carbonatpuffers reichte nicht aus um den jeweils eingestellten pH-Wert aufrecht zu erhalten (s. Tabelle 4.1-1).

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.1-1 Änderung des pH-Wertes von verschiedenen Medien nach der Zugabe von 10 % (m/m) HBE

| System | pH-Wert | |
|-----------------------------|----------|---------|
| | ohne HBE | mit HBE |
| HCl | 1,50 | 1,34 |
| Trizma [®] -Puffer | 7,00 | 1,76 |
| Carbonatpuffer | 10,00 | 4,60 |

Begründet wird dies mit dem Herstellungsverfahren des Heidelbeerextraktes. Dabei wird der Heidelbeertrester mit einer methanolischen Citronensäurelösung pH 1-3 behandelt um die Anthocyane zu extrahieren. Beim Trocknen der anthocyanhaltigen HBE-Lösung kristallisiert die Citronensäure aus und bleibt im anthocyanhaltigen Extrakt zurück.

Die Einflussnahme des HBE auf den pH-Wert wurde durch das Lösen von 10 % (m/m) HBE in gereinigtem Wasser getestet. Diese Lösung hatte eine pH-Wert von pH 1,8. Dieser änderte sich auch bei einer weiteren Inkubation von 24 h nicht. Der resultierende pH-Wert war direkt durch das Lösen des Heidelbeerextraktes eingestellt.

4.1.2.1 Antioxidatives Potential der Heidelbeerextrakt-Anthocyane

Als antioxidatives Potential einer natürlichen Substanz wird deren Fähigkeit bezeichnet, freie Radikale zu reduzieren bzw. die Bildung freier reaktiver Radikale anderer Substanzen zu verhindern^{99,100}. Für die Bestimmung des antioxidativen Potentials gibt es eine Vielzahl an Methoden, die auf photometrischen, elektrochemischen oder Chemilumineszenz-Analysen basieren. Der Großteil dieser Methoden, wie beispielsweise der TEAC- und der DPPH-Assay, beruhen auf photometrischen Analysen^{99,101,102}. Beiden Assays liegt die Reaktion von Radikalen (ABTS[•] bzw. DPPH[•]) mit den zu testenden Antioxidantien zugrunde. Die nicht invasive Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) ist eine weitere Methode, die in der Bestimmung des antioxidativen Potentials immer öfter eingesetzt wird^{99,103,104}. Der Vorteil der ESR gegenüber den herkömmlichen Methoden ist ihre Spezifität auf Grund der Ausbildung von charakteristischen Signalen. Durch den Einsatz verschiedener Spinsonden ist es möglich, zwischen phenolischen und nicht phenolischen Antioxidantien zu unterscheiden⁹⁹.

Mittels der ESR können freie Radikale oder paramagnetische Verbindungen detektiert werden. Proben, die keine Radikalmoleküle enthalten, sind ESR-stumm. Diesen Proben können zur Charakterisierung stabile Radikalmoleküle, sogenannte Spinsonden, zugesetzt werden¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Mittels ESR können ebenfalls kurzlebige Radikale detektiert werden, die während eines Lagerungs- oder Produktionsprozesses entstehen. Dazu werden den zu untersuchenden Proben sogenannte Spin Traps zugesetzt. Die in der Probe intermediär entstehenden kurzlebigen Radikale wandeln die Spin-Traps zu stabilen Radikalen um, die

4. Ergebnisse und Diskussion

mittels ESR detektiert werden können. Die ESR-Spektroskopie wird in der Pharmazie bereits vielfältig angewendet. Beispiele sind die Charakterisierung von Gelen und Implantaten¹⁰⁸⁻¹¹⁰, die Charakterisierung von nanoskaligen Arzneistoffträgersystemen^{89,97}, die Messung von Sauerstoffkonzentrationen¹¹¹ und von pH-Werten¹¹².

Der reine HBE ist ESR-stumm, da er keine freien Radikale bzw. paramagnetischen Verbindungen enthält. Die dem HBE zugesetzte Spinsonde TEMPOL ist ein stabiles Nitroxidradikal (s. 3.3.1.1) und gibt ein Signal, welches aus drei Linien besteht (s. Abbildung 4.1-2). In diesem Versuchsaufbau simuliert TEMPOL durch seine Nitroxidstruktur ($\text{NO}\cdot$) die im menschlichen Organismus vorkommenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Durch die Veränderung der Signalamplitude (A) des TEMPOL-Signals ist die Interaktion zwischen den im HBE enthaltenen Anthocyanen und dem TEMPOL ersichtlich (vergleiche Abbildung 4.1-2 a und c).

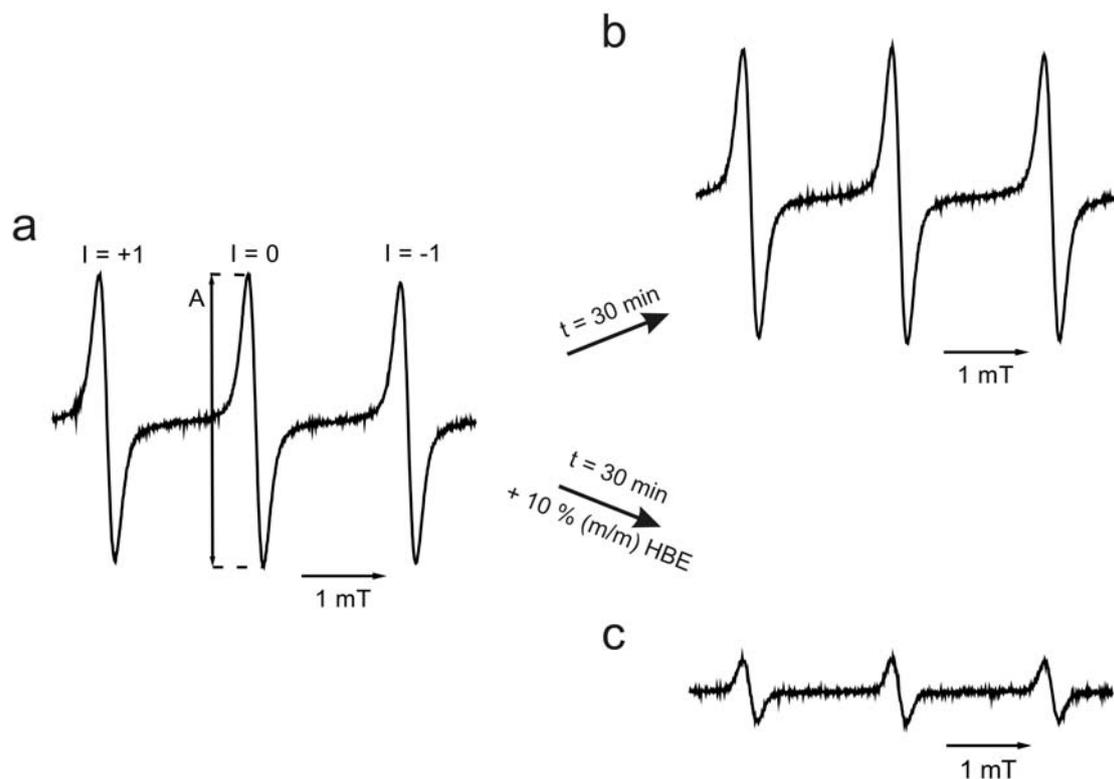


Abbildung 4.1-2 ESR-Spektren von 5 mmol TEMPOL in Trizma®-Puffer pH 7: a) direkt nach der TEMPOL-Zugabe, b) nach 30-minütiger Inkubation und c) nach 30-minütiger Inkubation mit 10 % (m/m) HBE-Zusatz. In Teil a) ist die Amplitude (A) der ausgewerteten mittleren Linie gekennzeichnet.

Abbildung 4.1-2 a) zeigt das Spektrum von 5 mmol TEMPOL in Trizma®-Puffer pH 7. Während der 30-minütigen Inkubation des Trizma®-Puffers pH 7 mit 5 mmol TEMPOL zeigen sich keine Veränderungen der Amplitude im ESR-Spektrum (s. Abbildung 4.1-2 a und b), was die Stabilität der verwendeten Spinsonde in diesem Medium belegt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Stabilität von TEMPOL bei den weiteren untersuchten pH-Werten pH 1,5 und pH 10 wurde durch die Inkubation der Spinsonde in dem jeweiligen Inkubationsmedium ohne HBE Zusatz bewiesen (s. Abbildung 4.1-4 – nicht ausgefüllte Symbole). Die Signalamplitude blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum des jeweiligen pH-Wertes konstant. Ein Einfluss des pH-Wertes auf die Abnahme der Signalamplitude wurde daher ausgeschlossen.

Bedingt durch die Absenkung des pH-Wertes durch den HBE haben die Puffersysteme mit HBE Zusatz einen geringeren pH-Wert als die Referenzlösungen. Dies ist in der folgenden Diskussion berücksichtigt. Durch die Zugabe von TEMPOL zu dem 10 % (m/m) HBE-haltigen Medium pH 7 (resultierender pH-Wert 1,76) nahm die Signalamplitude während der 30-minütigen Inkubation ab (Abbildung 4.1-2 a und c). Der Signalabnahme liegt die Reduktion der Nitroxylgruppe des TEMPOLs zum ESR-stummen Hydroxylamin durch die Anthocyane (Flavyliumkation) zu Grunde (s. Abbildung 4.1-3).

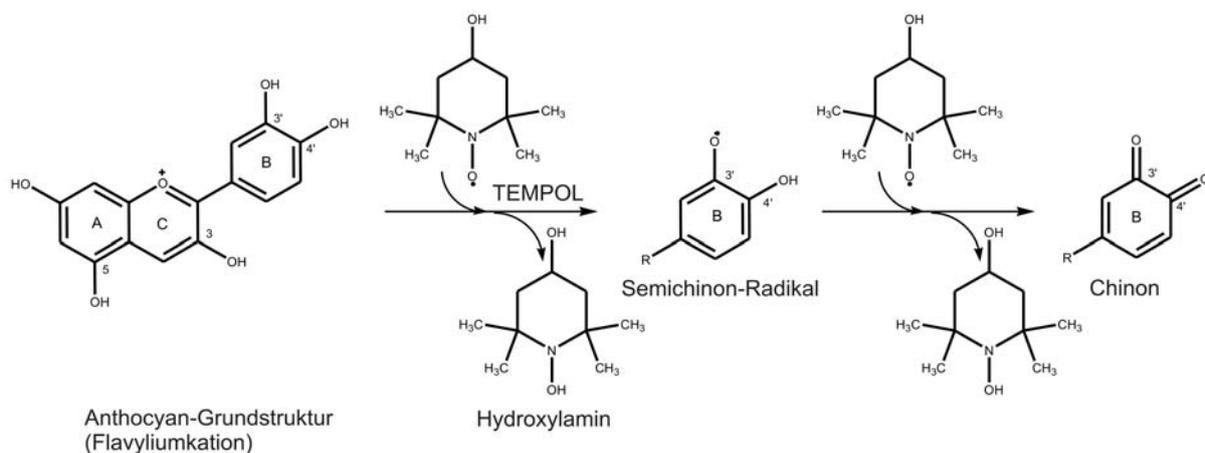


Abbildung 4.1-3 Reaktion zwischen einem Flavyliumkation und der Spinsonde TEMPOL zum Chinon bei pH 1,5 (modifiziert nach ¹¹³)

Ein Vergleich des Abfalls der Signalamplituden der drei verschiedenen Prüflösungen mit 10 % (m/m) HBE ist in Abbildung 4.1-4 dargestellt. Die Signalhalbwertszeit der jeweiligen Prüflösungen ist durch die Parallele zur Abszisse bei der relativen Signalamplitude von 0,5 gekennzeichnet. Der stärkste Abfall der Amplitude ist bei einem pH-Wert von pH 1,5 (ist: pH 1,34) zu beobachten, der schwächste bei pH 10 (ist: pH 4,6). Im Vergleich mit den Gehaltsangaben in Tabelle 4.1-2 ist ersichtlich, dass der Abfall der Amplitude konzentrationsabhängig ist.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.1-2 Gesamtanthocyangehalt (berechnet als Cy-3-glc) der verwendeten HBE-Lösungen im Vergleich mit den Signalhalbwertszeiten der TEMPOL-Lösungen

| Medien | resultierender pH-Wert | Gesamtanthocyangehalt | Signalhalbwertszeit |
|----------------------|------------------------|-----------------------|---------------------|
| HCl pH 1,5 | 1,34 | 2,1000 % | 16 ± 1 min |
| Trizma®-Puffer pH 7 | 1,76 | 1,7000 % | 30 ± 2 min |
| Carbonatpuffer pH 10 | 4,60 | 0,0039 % | 84 ± 2 min |

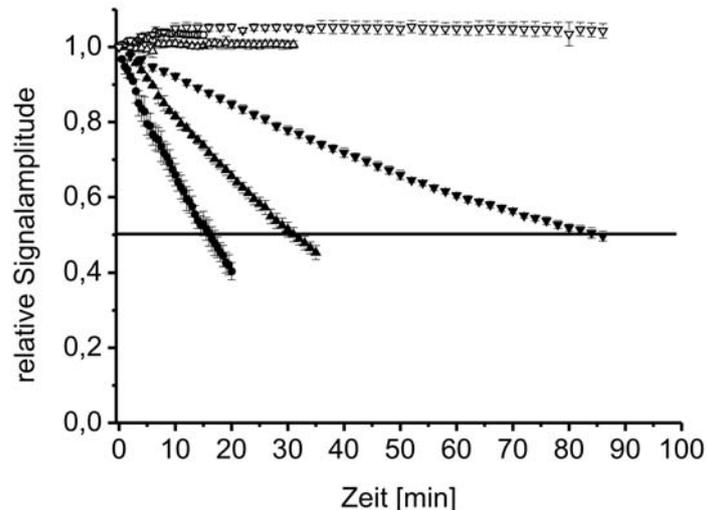


Abbildung 4.1-4 Abfall der relativen Signalamplitude der Spinsonde TEMPOL während der Inkubation in drei Medien mit unterschiedlichen pH-Werten (pH 1,34 ●; pH 1,76 ▲; pH 4,60 ▼). Die nicht ausgefüllten Symbole stellen die Vergleichsmessungen von TEMPOL in den jeweiligen Medien ohne HBE-Zusatz dar (pH 1,5 ○; pH 7 △; pH 10 ▽). Durch die Parallele zur Abszisse bei der relativen Signalamplitude von 0,5 wird die Halbwertszeit des Signals angezeigt.

Der schnelle Abfall der Signalamplitude ist mit dem höchsten Anthocyangehalt bei pH 1,5 verknüpft (2,1 %). Begründet ist dies mit der strukturellen Stabilität der Anthocyane, die bei diesem stark sauren pH-Milieu als antioxidativ wirksames Flavylumkation vorliegen³⁴. Terao postulierte mehrere Strukturmerkmale, die für die antioxidative Wirkung der Anthocyane verantwortlich sind: zum einen die o-Dihydroxylstruktur am Ring B und zum anderen jeweils eine Hydroxylgruppe an Position 3 (Ringe C) und 5 (Ringe A) (Abbildung 4.1-3)¹¹³. Das Gleichgewicht der oben beschriebenen Strukturmerkmale am Ring B ist bei schwach sauren pH-Werten um pH 4,60 zur chinoiden Base verschoben (s. Kapitel 2.1). Diese Strukturen sind weniger antioxidativ wirksam als das Flavylumkation. Die Umwandlung wird durch den Konzentrationsabfall der Anthocyane in dem Prüfmedium deutlich (0,0039 %). Diese Ergebnisse zeigen, dass der HBE bei stark sauren pH-Milieus um pH 1-2 verkapselt werden sollte, um eine optimale antioxidative Wirkung der Anthocyane zu ermöglichen (s. Kapitel 2.1).

4.2 Lipidmikrokapseln (LMK)

Bei der Entwicklung der Lipidmikrokapseln stand die Vorgabe im Vordergrund, Hilfsstoffe, die sowohl in der Lebensmittel- als auch in der pharmazeutischen Industrie eingesetzt werden, anzuwenden. Auf organische Lösungsmittel sollte auf Grund der Toxizität während des Herstellungsprozesses verzichtet werden. In Anlehnung an die Arbeit von Matsumoto *et al.* wurden Sorbitanfettsäureester (Span®) und Saccharoseester als Emulgatoren eingesetzt¹¹⁴. Tabelle 4.2-1 zeigt die E-Nummern der zur Herstellung der LMK eingesetzten Hilfsstoffe nach ZZuV.

Tabelle 4.2-1 Übersicht über die E-Nummern der für die LMK verwendeten Stoffe

| Stoff | E-Nummer |
|-----------------------|----------|
| Saccharoseester S-370 | 473 |
| Span® 80 | 494 |
| Hartfett | * |
| Heidelbeerextrakt | 163 |

*gilt als Lebensmittel und nicht als Zusatzstoff und hat daher keine E-Nummer

4.2.1 Entwicklung der Lipidmikrokapseln

4.2.1.1 Hartfetttyp

Für das Hüllmaterial wurden zwei Hartfetttypen ausgewählt, die sich vor allem in ihren Schmelzbereichen unterscheiden (s. 3.1.2). Bei den jeweiligen Herstellungsversuchen blieb die Zusammensetzung der weiteren Bestandteile unverändert. Die Unterschiede der mit den beiden Witepsol®-Typen gebildeten Lipidmikrokapseln wurden hinsichtlich ihrer Inkorporationsrate und ihrer Partikelgröße ausgewertet. Abbildung 4.2-1 vergleicht die Ergebnisse der Kapselherstellung mittels Becherglasmethode aus Witepsol® W 35 und Witepsol® E 76. Im Hinblick auf die Inkorporationsrate (Abbildung 4.2-1 a) zeigt Witepsol® W 35 mit $87 \pm 2 \%$ ein, bei einer geringeren Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert, höheres Inkorporationsvermögen als Witepsol® E 76 mit $78 \pm 4 \%$. Im Vergleich der Partikelgrößenverteilung der beiden Hartfetttypen (s. Abbildung 4.2-1 b) zeigt sich hinsichtlich des $d_{0,5}$ ein Unterschied von etwa $50 \mu\text{m}$. Der $d_{0,5}$ -Wert für Witepsol® W 35 liegt bei $203 \pm 24 \mu\text{m}$, der von Witepsol® E 76 bei $155 \pm 17 \mu\text{m}$. Bei der Betrachtung des Kurvenverlaufes zeigt Witepsol® W 35 die engere Verteilung. Auf der Grundlage der besseren Inkorporation mit den aus Witepsol® W 35 entwickelten Kapseln wurde die weitere Entwicklung der LMK mit Witepsol® W 35 fortgeführt.

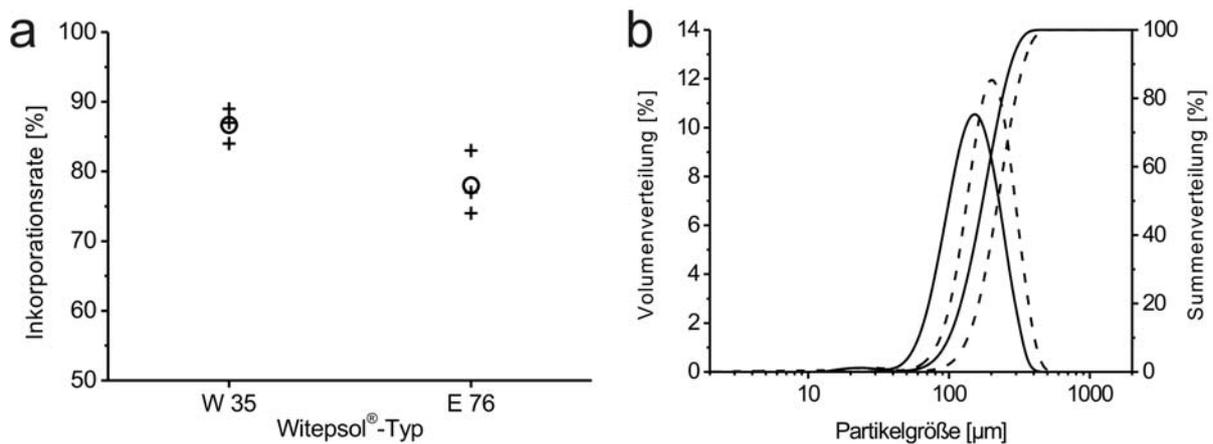


Abbildung 4.2-1 Vergleich der hergestellten Lipidmikrokapseln aus den verwendeten Hartfetttypen Witepsol® W 35 und Witepsol® E 76 hinsichtlich (a) des Inkorporationsverhaltens (○ Mittelwert; + einzelne Messwerte) und (b) der Partikelgröße (--- Witepsol® W 35; — Witepsol® E 76).

4.2.1.2 Ermittlung der Emulgatoren und deren Konzentrationen

Ein weiteres Ziel der Entwicklung des LMK-Systems war es, ohne den Einsatz von Emulgatoren zu arbeiten bzw. die Konzentration der Emulgatoren so gering wie möglich zu halten. In Vorversuchen ohne den Einsatz von Emulgatoren zeigte sich jedoch eine breite Partikelgrößenverteilung und eine schlechte Inkorporation der wässrigen Phase. Aus diesem Grund wurde die Entwicklung der LMK mit dem Einsatz von Emulgatoren weiter fortgeführt. Eine Emulgatorenklasse, die sowohl in der Lebensmittel- als auch in der pharmazeutischen Industrie eingesetzt wird, sind die Saccharoseester. Diese haben eine geringe Toxizität, eine gute Biokompatibilität und sind sehr gut bioabbaubar^{115,116}. In der Lebensmittelindustrie werden Saccharoseester zur Stabilisierung von Emulsionen oder zur Solubilisierung von Instantpulvern eingesetzt¹¹⁷. In der pharmazeutischen Industrie werden Saccharoseester beispielsweise als Schmiermittel beim Pressen von Tabletten, als amphiphile Stabilisatoren sowie als Matrix für retardierte Freisetzungen angewendet^{118,119}. Eingesetzt wurde der Saccharoseester S-370 (HLB 3). Laut ZZuIV besteht keine Höchstmengengrenze (qs) an Saccharoseestern für Nahrungsergänzungsmittel. Durch die Einarbeitung des Saccharoseesters war die Inkorporationsrate der wässrigen Phase verbessert, jedoch nicht optimal. Aus diesem Grund wurde ein weiterer W/O-Emulgator aus der Klasse der Sorbitanfettsäureester, Span® 80 (HLB 4,3), hinzugefügt. Sorbitanfettsäureester werden ebenfalls zur Stabilisierung von Emulsionen und zur Solubilisierung in der Nahrungsmittel-¹¹⁷ und in der pharmazeutischen Industrie eingesetzt. Für Span® 80 gibt es laut ZZuIV, wie bei Saccharoseestern, keine Höchstmengenbegrenzung (qs) für den Einsatz in Nahrungsergänzungsmitteln. Die Konzentrationen der beiden Emulgatoren wurden empirisch ermittelt. Als optimal in Bezug auf die resultierende Kapselgröße und das Inkorporationsverhalten erwies sich jeweils ein 5%iger Zusatz (bezogen auf das Hartfett) der

4. Ergebnisse und Diskussion

beiden Emulgatoren. Eine höhere Konzentration der beiden Emulgatoren führte zu einem schlechteren Inkorporationsverhalten. Von einer weiteren Absenkung der Emulgatorenkonzentration wurde abgesehen. Vorversuche zeigten, dass die daraus resultierenden Kapseln nach der Filtration und Trocknung mechanisch nicht stabil waren und zusammenklebten. Des Weiteren wurde der Einsatz des in Eiern und Soja natürlich vorkommenden Emulgators Lecithin (E 322) untersucht. Hierbei kam es während des Herstellungsprozesses zu Aggregatbildungen des Hartfetts. Aus diesem Grund wurde die Weiterentwicklung der LMK mit Lecithin nicht fortgesetzt.

4.2.1.3 Variation des Volumens der inneren Phase

Um den Einfluss des Volumens der inneren Phase (W_1 -Phase) auf die Inkorporationsrate zu ermitteln, wurden die Lipidmikrokapseln mit variierenden Anteilen der W_1 -Phase hergestellt (s. Abbildung 4.2-2). Bei allen drei unterschiedlichen Volumina wurden feste LMK hergestellt, die auch nach dem Filtrieren und dem anschließenden Trocknen mechanisch stabil waren. Die Abhängigkeit der Inkorporationsrate vom Anteil der W_1 -Phase ist in Abbildung 4.2-2 a) dargestellt. Mit steigendem Anteil der W_1 -Phase nimmt die Inkorporationsrate ab. Dabei steigt die Streuung der Einzelmesswerte an. Die absoluten Inkorporationswerte der verkapselten Anthocyane zeigt Tabelle 4.2-2. Der durchschnittliche absolute Anthocyangehalt ist bei den Kapseln, die mit 40 % (V/m) innerer Phase hergestellt wurden, am höchsten.

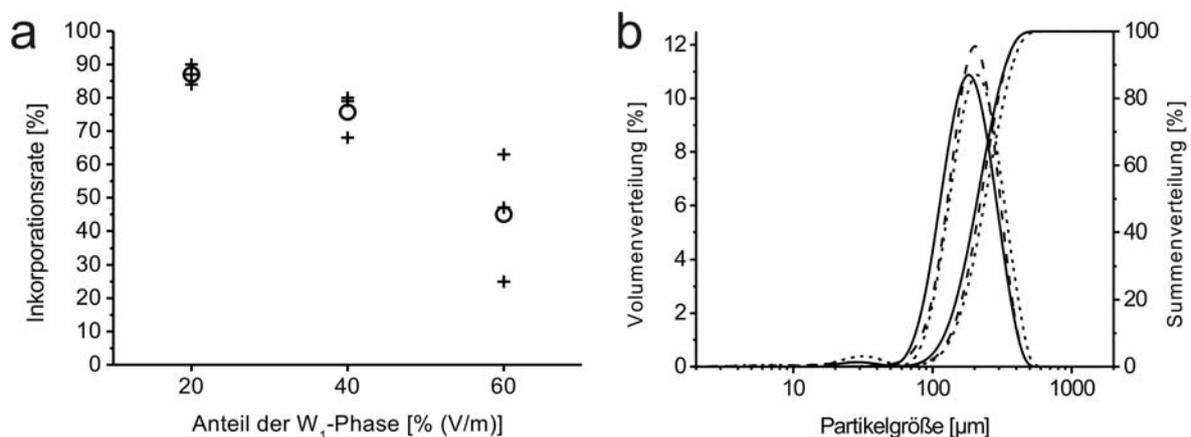


Abbildung 4.2-2 Vergleich der hergestellten Lipidmikrokapseln mit variierendem Volumen der W_1 -Phase hinsichtlich (a) des Inkorporationsverhaltens (○ Mittelwert; + einzelne Messwerte) und (b) der Kapselgröße (— 20 % (V/m) W_1 -Phase; --- 40 % (V/m) W_1 -Phase; ... 60 % (V/m) W_1 -Phase).

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.2-2 Durchschnittlicher absoluter Anthocyangehalt der hergestellten LMK in Abhängigkeit vom Anteil der W_1 -Phase.

| Anteil W_1 -Phase [% (V/m)] | Inkorporierte Anthocyane [mg pro g LMK] |
|----------------------------------|--------------------------------------------|
| 20 | 1,25 ± 0,05 |
| 40 | 2,23 ± 0,15 |
| 60 | 2,00 ± 0,70 |

In Abbildung 4.2-2 b) ist die Partikelgrößenverteilung der mit den unterschiedlichen Anteilen der W_1 -Phase hergestellten Kapseln dargestellt. Aus den Daten geht hervor, dass die W_1 -Phase keinen Einfluss auf die Größe der Kapseln hat. Die $d_{(0,5)}$ -Werte der einzelnen Messreihen unterscheiden sich kaum. Der Unterschied der Breite der Partikelgrößenverteilung ist vernachlässigbar. Bei der mikroskopischen Betrachtung (Daten nicht gezeigt) zeigte sich, dass das Verhältnis der Lipidhülle zum anthocyanhaltigen Kern mit steigendem Anteil der W_1 -Phase abnimmt.

Tabelle 4.2-3 Vergleich des Medians $d_{(0,5)}$ in Abhängigkeit von der Variation der W_1 -Phase.

| Anteil W_1 -Phase [% (V/m)] | $d_{(0,50)}$ [μm] |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| 20 | 189 ± 15 |
| 40 | 203 ± 24 |
| 60 | 215 ± 7 |

Auf Grund der erzielten Daten wurde die weitere Charakterisierung der LMK hinsichtlich der höheren Verluste an Anthocyanlösung bei der Einarbeitung von 40 % (V/m) W_1 -Phase mit 20 % (V/m) innerer Phase durchgeführt.

4.2.1.4 Zusammenfassung der Entwicklung der LMK

Die in Tabelle 4.2-4 dargestellte Rezeptur wurde aus den Entwicklungsdaten herausgearbeitet. Alle weiteren Charakterisierungsschritte wurden mit LMK dieser Zusammensetzung durchgeführt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.2-4 Aus den Entwicklungsdaten ermittelte Zusammensetzung der LMK

| | |
|----------------------|----------------|
| Saccharoseester S370 | 5 % (m/m) |
| Span® 80 | 5 % (m/m) |
| Witepsol® W 35 | zu 100 % (m/m) |
| Anthocyanlösung pH 2 | 20 % (V/m) |

4.2.2 Becherglasmethode

Für die Herstellung der LMK wurden die Emulgatoren und das Hartfett in einem Becherglas unter stetigem Rühren zur Klarschmelze des Hartfetts geschmolzen. Zu dieser Klarschmelze wurde die Anthocyanlösung pH 2 gegeben. Um einen vorzeitigen Abbau der Anthocyane zu vermeiden, wurde die Anthocyanlösung pH 2 vor der Zugabe nicht erwärmt. Die bei diesem Schritt entstehende W_1/O -Emulsion wurde nach 5 Minuten stetigem Rühren bei 600 U/min durch eine Einmalspritze in 60 °C warmes gereinigtes Wasser gegeben, wodurch eine $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsion entstand. Die Homogenisierung der $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsion in diesem Herstellungsschritt wurde zunächst unter Einsatz eines Ultra Turrax® durchgeführt. Es zeigte sich jedoch ein zu großer Verlust an Verkapselungsmaterial an den Wandungen des Ultra Turax®. Dieser Verlust ist auf die schlechte Temperierbarkeit des Dispergierwerkzeugs des Ultra Turrax® zurückzuführen. Die Temperatur des Dispergierwerkzeugs ließ das Hartfett an dem Dispergierstab erstarren. Aus diesem Grund wurde auf den Einsatz des Ultra Turrax® verzichtet und stattdessen weiterhin stetig mit einem Magnetrührer gerührt. Die Herstellung in einem Becherglas unter Einsatz eines Magnetrührers zeigte keine Verluste des Verkapselungsmaterials.

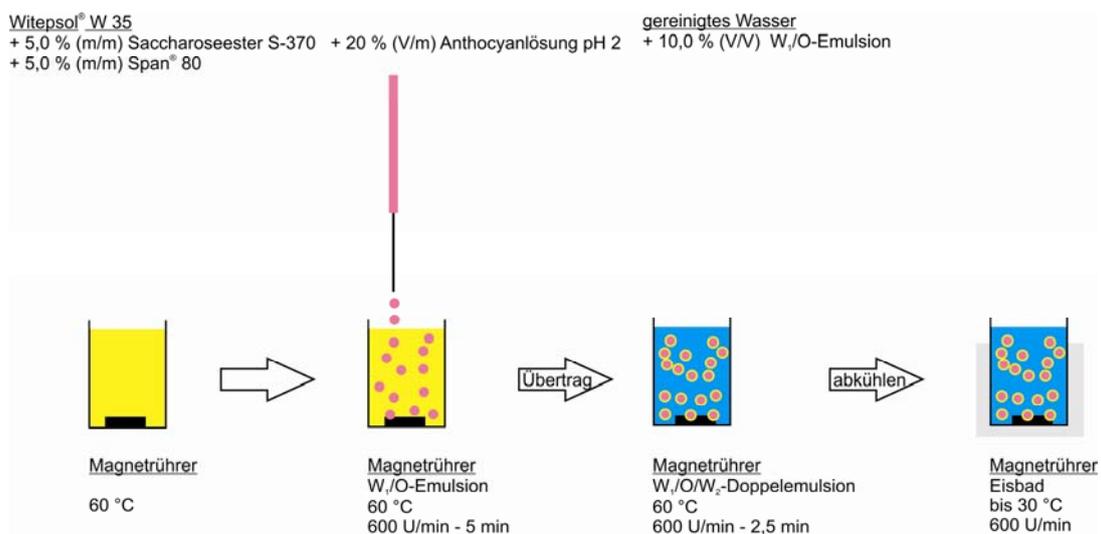


Abbildung 4.2-3 Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses der Lipidmikrokapseln (LMK) mittels Becherglasmethode.

Durch das Abkühlen der $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsion unter den Schmelzpunkt des Hartfetts auf

4. Ergebnisse und Diskussion

30 °C in einem Becherglas mit einer Eis-Ummantelung wird die Lipidphase fest. Dadurch bildet sich eine feste Kapselhülle um die eingeschlossenen, flüssigen anthocyanhaltigen Kerne. Im Anschluss an die Herstellung wurden die Kapseln durch Vakuumfiltration durch einen Büchnertrichter von dem Dispersionsmittel getrennt und im geschlossenen Exsikkator bei RT getrocknet. Eine schematische Darstellung der Herstellung der LMK Kapseln mittels Becherglasmethode unter genauer Angabe der eingesetzten Bestandteile zeigt Abbildung 4.2-3.

Die mittels UV/Vis-spektroskopischer Methode (s. Kapitel 3.3.2.1 folgende) ermittelte Inkorporationsrate dieser Kapseln betrug $87 \pm 2 \%$.

4.2.3 SpeedMixer™

Um den Herstellungsprozess zu vereinfachen und die LMK mit einer kürzeren Temperaturbelastung herzustellen, wurde die Herstellung der optimierten Rezeptur mittels Becherglasmethode auf den SpeedMixer™ übertragen. Ziel war es, bei dem Herstellungsprozess im SpeedMixer™ keine zusätzlichen Hilfsstoffe zu verwenden. Die Reproduzierbarkeit der Kapselherstellung sollte im Vergleich zur Becherglasmethode verbessert sein, da der Prozess des manuellen Einspritzens der W₁/O-Emulsion in das gereinigte Wasser durch das Mischprinzip des SpeedMixers™ ersetzt wurde.

Der SpeedMixer™ wird vor allem in der chemischen Industrie zur Verarbeitung und Mischung von Farben, Lacken und Ölen angewendet. In der Pharmazie wird der SpeedMixer™ bisher selten eingesetzt. Einige Anwendungsgebiete sind die Herstellung von Phospholipidgelen sowie von Liposomen^{92,120}.

In einer Kunststoffkruke wurden das Hartfett und die beiden Emulgatoren im Wasserbad unter stetigem Rühren zur Klarschmelze erhitzt. In diese Schmelze wurde unter kontinuierlichem Rühren die Anthocyanlösung pH 2 gegeben. Nach der Abkühlung auf etwa 37 °C wurde zu diesem Ansatz die doppelte Ansatzmenge auf 40 °C erwärmtes gereinigtes Wasser gegeben. Direkt nach der Zugabe des gereinigten Wassers wurde die Kunststoffkruke verschlossen und im SpeedMixer™ für 2 Minuten bei 3500 U/min und daran nahtlos anschließend für 2 Minuten bei 500 U/min zentrifugiert. Während des Herstellungsprozesses im SpeedMixer™ kühlte sich der Ansatz um etwa 10 °C ab. Dadurch konnte der Abkühlungsschritt im Eisbad ausgelassen werden. Die Kapseln wurden direkt im Anschluss mittels Vakuumfiltration durch einen Büchnertrichter vom Dispersionsmedium getrennt. Anschließend wurden sie zur Trocknung bei RT im Exsikkator gelagert. Eine schematische Darstellung der Herstellung der LMK mittels SpeedMixer™ unter genauer Angabe der eingesetzten Bestandteile zeigt Abbildung 4.2-4.

4. Ergebnisse und Diskussion

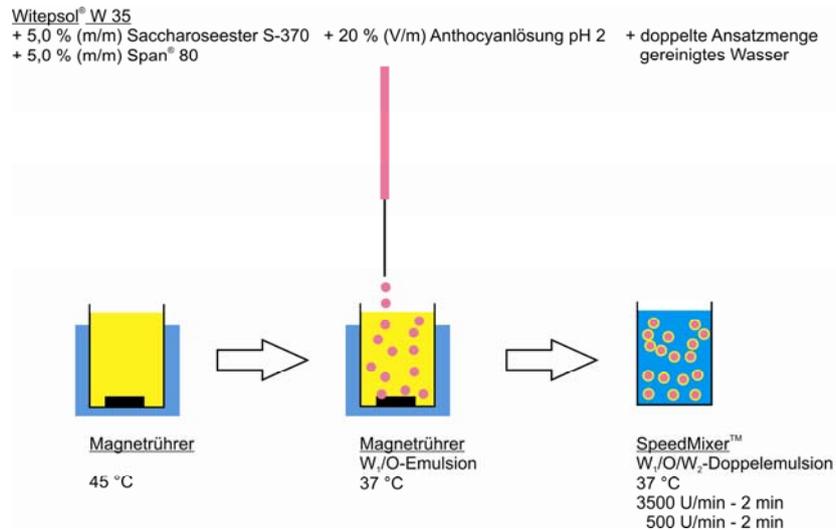


Abbildung 4.2-4 Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses der Lipidmikrokapseln (LMK) mittels SpeedMixer™.

Auf Grund der durch die Charakterisierung erzielten Ergebnisse (s. Kapitel 4.2.4.1 und 4.2.4.2), wurden die Inkorporationsrate der mittels SpeedMixer™ hergestellten Lipidmikrokapseln nicht bestimmt.

4.2.4 Charakterisierung der Lipidmikrokapseln

4.2.4.1 Lichtmikroskopie

Zur ersten Charakterisierung der entwickelten Lipidmikrokapseln wurde die Lichtmikroskopie angewendet. Durch dieses einfach durchzuführende, nichtinvasive bildgebende Verfahren war eine erste Bewertung der jeweiligen Ansätze möglich.

Abbildung 4.2-5 a) zeigt eine durchlichtmikroskopische Darstellung der mittels Becherglasmethode hergestellten Kapseln. Bei den runden Kapseln sind deutliche Einschlüsse des Heidelbeerextraktes zu erkennen. Das Kern-Hülle-Verhältnis variiert zwischen den einzelnen LMK stark. Die Kapseln weisen teilweise mehrere Kerne auf. Außerdem ist ersichtlich, dass die Partikelgröße nicht einheitlich verteilt ist. Die Aufsicht auf die Kapseln (s. Abbildung 4.2-5 b) bestätigt diese Beobachtungen. Die unterschiedlich intensive Färbung der LMK zeigt ein zu Gunsten des Kerns verschobenes Kern-Hülle-Verhältnis und eine stärkere Inkorporation. Auch aus diesem mikroskopischen Ausschnitt ist ersichtlich, dass keine einheitliche Partikelgrößenverteilung vorliegt. Deutlich ist jedoch, dass die Kapseln alle eine sphärische Form aufweisen.

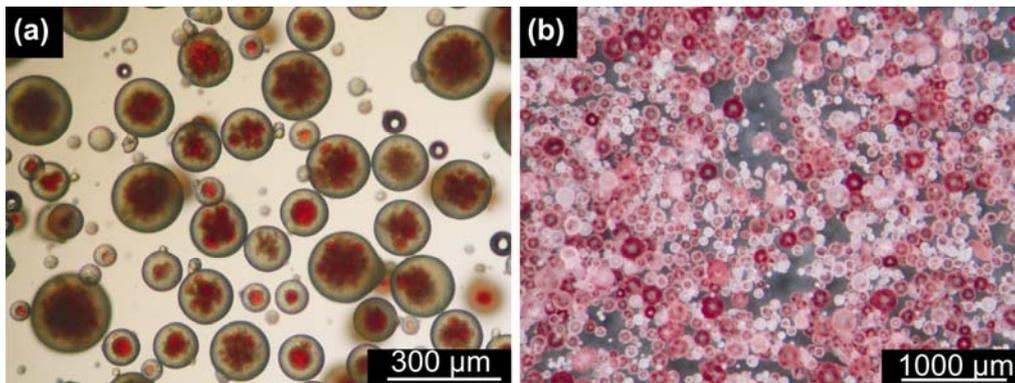


Abbildung 4.2-5 Mikroskopische Darstellung der mittels Becherglasmethode hergestellten Lipidmikrokapseln: a) Durchlicht-Mikroskop, b) Aufsicht-Mikroskop

Abbildung 4.2-6 a) zeigt die durchlichtmikroskopische Darstellung der mittels SpeedMixer™ hergestellten LMK. Die nicht einheitlich geformten Kapseln weisen nur geringe Einschlüsse des Heidelbeerextraktes auf. Es sind keine definierten Kerne zu erkennen. Die Partikelgröße der entwickelten Kapseln variiert stark. Die auflichtmikroskopische Darstellung (s. Abbildung 4.2-6 b) bestätigt die nicht einheitliche Partikelform. Im Gegensatz zu der durchlichtmikroskopischen Abbildung sind die Kapseln einheitlich rot gefärbt, ohne dass Kerne innerhalb der Kapseln erkennbar sind. Diese rote Färbung liegt im Herstellungsprozess der LMK mittels SpeedMixer™ begründet. Die Verkapselungsrate (nicht bestimmt) ist offensichtlich sehr gering, was sich auch in einer tief roten Farbe des Dispersionsmediums äußerte. An die Herstellung anschließend wurden die LMK abfiltriert. Dabei fiel ein Teil der im Dispersionsmittel gelösten Anthocyane auf dem Kapselkuchen im Filter aus. Die im auflichtmikroskopischen Bild zu sehende Färbung der LMK kommt daher nicht durch die Inkorporation, sondern durch die Anhaftung der Anthocyane an die äußere Hülle zustande.

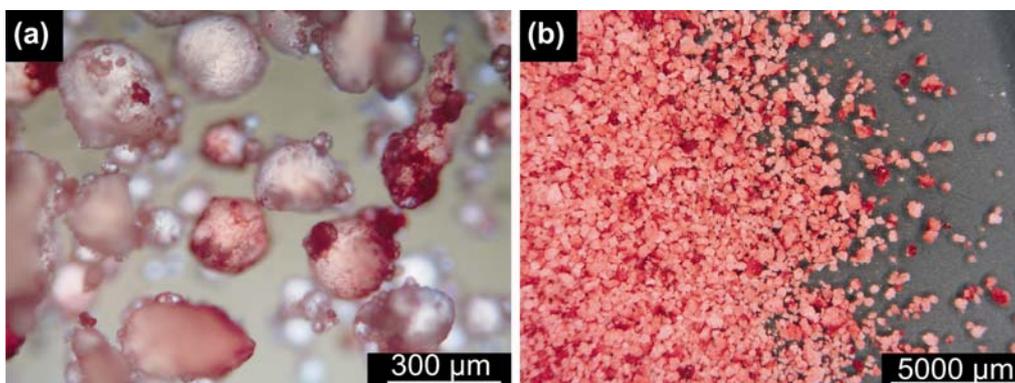


Abbildung 4.2-6 Mikroskopische Darstellung der mittels SpeedMixer™ hergestellten Lipidmikrokapseln: a) Durchlicht-Mikroskop, b) Aufsicht-Mikroskop

Aus diesen Ergebnissen abgeleitet zeigt sich, dass die mittels Becherglasmethode

4. Ergebnisse und Diskussion

hergestellten LMK rein visuell bessere Eigenschaften bezüglich der Kapselform und -größe sowie der Inkorporation besitzen.

4.2.4.2 Statische Lichtstreuung (LD)

Zur vergleichenden Charakterisierung der Größen der entwickelten LMK wurden diese mittels statischer Lichtstreuung vermessen. Die Auswertung ist unter Anwendung der Fraunhofer-Theorie durchgeführt worden, da die Partikel wesentlich größer als die Wellenlänge des Messlichtes (s. Kapitel 3.3.2.3) und nicht transparent sind^{93,121}. Dadurch hängt das Streumuster ausschließlich von der Teilchengröße ab. Die Fraunhofer-Theorie besagt, dass kugelförmige Partikel, denen eine Linse nachgeschaltet ist, in deren Brennweite ein von der Partikelgröße abhängiges radialsymmetrisches Beugungsbild erzeugen. Ein Vorteil gegenüber der Mie-Theorie ist, dass zur Bestimmung der Partikelgröße nach Fraunhofer keine Brechungsindizes der Partikel und des Dispersionsmediums benötigt werden.

Abbildung 4.2-7 zeigt die Ergebnisse der Charakterisierung der LMK mittels statischer Lichtstreuung. Im Vergleich der beiden volumengewichteten Partikelgrößenverteilungen zeigen die mit der Becherglasmethode hergestellten LMK eine schmalere und symmetrischere Größenverteilung als die mit dem SpeedMixerTM hergestellten Kapseln. Die engere Größenverteilung wird durch den steileren Anstieg der Summenverteilung der mittels Becherglasmethode im Vergleich zu den mittels SpeedMixerTM hergestellten LMK verdeutlicht.

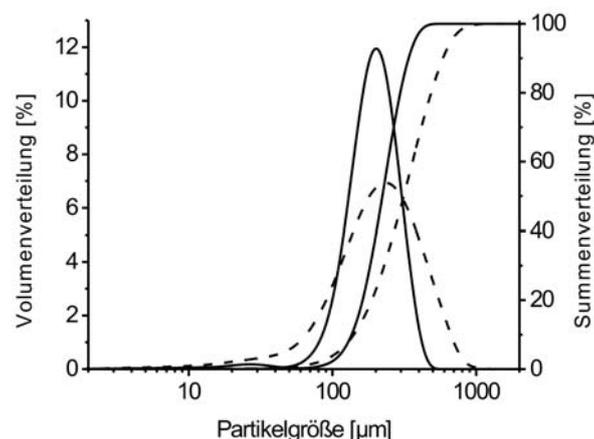


Abbildung 4.2-7 Vergleich der Partikelgrößenverteilung der mittels Becherglasmethode (—) und mittels SpeedMixerTM (---) hergestellten Lipidmikrokapseln.

Der Vergleich der charakteristischen Partikeldurchmesser $d_{(0,1)}$, $d_{(0,5)}$ und $d_{(0,9)}$ (s. Tabelle 4.2-5) zeigt, dass der Anteil kleiner Partikel bei den Ansätzen, die mittels SpeedMixerTM hergestellt worden sind, geringer ist. Bei einer rein visuellen Betrachtung der beiden

4. Ergebnisse und Diskussion

Versuchsansätze zeigen sich bei der SpeedMixerTM-Methode mehr nicht zu Kapseln generierte Lipidreste. Diese stellen einen Zusammenschluss von kleinen Partikeln dar. Dadurch ist bei diesen Ansätzen der Anteil kleiner Partikel vermindert. Der Median ($d_{(0,5)}$) der mit den unterschiedlichen Methoden entwickelten LMK ist mit $203 \pm 24 \mu\text{m}$ für die Becherglasmethode bzw. $213 \pm 19 \mu\text{m}$ für den SpeedMixerTM vergleichbar. Der $d_{(0,9)}$ -Wert der mittels SpeedMixerTM hergestellten LMK ist mit $454 \pm 17 \mu\text{m}$ jedoch über $100 \mu\text{m}$ größer als der Vergleichswert der mittels Becherglasmethode entwickelten LMK. Dies zeigt den relativ hohen Anteil an größeren LMK bzw. Lipidresten in der Probe.

Tabelle 4.2-5 Übersicht der charakteristischen Partikeldurchmesser $d_{(0,1)}$, $d_{(0,5)}$ und $d_{(0,9)}$ der mittels Becherglasmethode und mittels SpeedMixerTM hergestellten Lipidmikrokapseln.

| | $d_{(0,1)}$ [μm] | $d_{(0,5)}$ [μm] | $d_{(0,9)}$ [μm] |
|--------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Becherglasmethode | 124 ± 29 | 203 ± 24 | 317 ± 23 |
| SpeedMixer TM | 80 ± 10 | 213 ± 19 | 454 ± 17 |

Die durch die lichtmikroskopische Analyse gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der breiten Partikelgrößenverteilung beider Herstellungsmethoden werden durch diese Ergebnisse bestätigt. Die durch die statische Lichtstreuung gewonnenen Detailinformationen zeigen, dass die Partikelgrößenverteilung der anhand der Becherglasmethode hergestellten LMK zwar nicht optimal, aber dennoch gut ist.

4.2.4.3 Vergleich: Becherglasmethode und SpeedMixerTM

Im ersten Vergleich der entwickelten Herstellungsmethoden für die LMK scheint die Durchführung mittels SpeedMixerTM reproduzierbarer, da weniger Herstellungsschritte benötigt werden und die W₁/O-Emulsion nicht manuell in das Dispersionsmedium gegeben wird. Die Ergebnisse der Charakterisierung durch Lichtmikroskopie und statischer Lichtstreuung zeigen das Gegenteil. Die mittels Becherglasmethode hergestellten LMK zeigen sphärische Partikel mit deutlich eingeschlossenen Kernen und einer engeren Partikelgrößenverteilung. Im direkten Vergleich zeigen die mit dem SpeedMixerTM hergestellten Kapseln keine einheitliche Form und Inkorporation. Dies ist auf die nicht gegebene Temperierbarkeit des SpeedMixersTM zurückzuführen. Während des Mischprozesses kühlt sich der Herstellungsansatz unkontrolliert ab. Dies führt zu einem Anstieg der Viskosität. Dieser Viskositätsanstieg ist für die gegenläufige Rotation der dualen asymmetrischen Zentrifuge (SpeedMixerTM) von Vorteil. Bedingt durch die nicht steuerbare Abkühlung und die damit verbundene Aushärtung des Lipids entstehen jedoch unförmige Kapseln, was sich nachteilig auf die erarbeiteten Verkapselungsansätze auswirkt. Verursacht

4. Ergebnisse und Diskussion

durch die fehlende Temperierung der Spritze in Kombination mit der zurückgelegten Fallstrecke der W_1/O -Emulsion steigt die Viskosität des Lipids während des Herstellungsprozesses mit der Becherglasmethode ebenfalls an. Bedingt durch die Oberflächenspannung bildet sich beim Austreten der W_1/O -Emulsion aus der Kanüle eine tropfenförmige Lipidhülle um den hydrophilen, anthocyanhaltigen Kern. Beim Auftreffen auf das temperierte Dispersionsmedium (W_2 -Phase) behalten die Tropfen auf Grund der geringeren Grenzflächenspannung ihre sphärische Gestalt. Als Folge bilden sich sphärische Kapseln mit einer guten Inkorporation der Anthocyane. Der einzige Nachteil beider Methoden ist die relativ breite Streuung der Partikelgrößenverteilung auf Grund der manuellen Zugabe der W_1/O -Emulsion.

Abgeleitet aus diesen Ergebnissen wurde die weitere Charakterisierung der LMK (s. Kapitel 4.2.4.4 bis 4.2.4.7) nur mit den mittels Becherglasmethode hergestellten Kapseln durchgeführt.

4.2.4.4 Rasterelektronenmikroskopie (ESEM)

Mit Hilfe von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der mit der Becherglasmethode hergestellten LMK sollten die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Darstellung (s. Kapitel 4.2.4.1) bestätigt werden. Des Weiteren sollten die Aufnahmen detaillierte Informationen über die Oberflächenstruktur bzw. die Einsicht in das Innere der Kapseln geben. Zu diesem Zweck wurden die LMK auf einem Objektträger mit einer Rasierklinge behandelt, um die Kapseln partiell zu teilen. Abbildung 4.2-8 a) zeigt eine Übersichtsaufnahme der LMK.

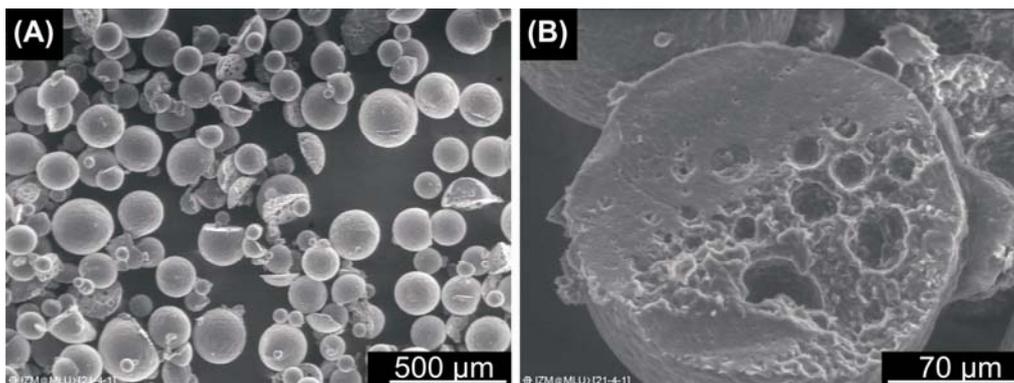


Abbildung 4.2-8 Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der mittels Becherglasmethode generierten Lipidmikrokapseln. Die Kapseln wurden vor den Aufnahmen mit einer Rasierklinge behandelt, um die Mikrokapseln partiell zu zerstören: A Übersichtsaufnahme; B Detailansicht einer aufgeschnittenen Kapsel.

Die durch die lichtmikroskopische Analyse gewonnene Information über die Form der Kapseln wird durch diese Aufnahme bestätigt. Die Kapseln sind sphärisch und weisen eine

4. Ergebnisse und Diskussion

glatte Oberfläche auf. Die Ergebnisse der statischen Lichtstreuung über die nicht einheitliche Partikelgrößenverteilung werden ebenfalls bestätigt. Durch das Behandeln mit der Rasierklinge sind Einsichten in das Innere einiger Kapseln möglich (Bildmitte).

Eine detaillierte Einsicht in eine zerteilte LMK zeigt Abbildung 4.2-8 b). Es sind deutlich mehrere Kavitäten zu erkennen, was für eine mehrkernige Kapsel spricht. Bedingt durch das eingestellte Vakuum in der Probenkammer des Rasterelektronenmikroskopes ist das Lösungsmittel der inkorporierte Anthocyanlösung verdampft und daher nicht zu erkennen.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Anthocyanlösung erfolgreich verkapselt wurde. Alle hergestellten Kapseln haben eine gleichmäßige Oberfläche und Form. Lediglich die Partikelgrößenverteilung ist heterogen.

4.2.4.5 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Die Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie ist eine Abwandlung der Lichtmikroskopie. Im Unterschied zur herkömmlichen Lichtmikroskopie wird bei der CLSM nicht das komplette Präparat auf einmal, sondern jeweils nur ein Ausschnitt beleuchtet. Ist die Wellenlänge des verwendeten Lasers gleich der Anregungswellenlänge des Präparates kann eine Emission beobachtet werden. Durch die Messung der emittierten Lichtintensitäten während des Scannens des gesamten Präparates kann im Anschluss aus diesen Daten ein vollständiges Bild der Probe zusammengesetzt werden. Im Unterschied zur herkömmlichen Lichtmikroskopie ist im Strahlengang des detektierten Lichtes eine Lochblende installiert. Diese blockiert Licht, welches von außerhalb der Schärfenebene kommt. Dadurch können Bilder in verschiedenen Schärfenebenen aufgenommen werden. Bei der Analyse der durch die Becherglasmethode hergestellten LMK wurde diese Technik genutzt, um durch verschiedene Ebenen der LMK zu scannen und die dabei unterschiedlich starken Emissionen der verkapselten Anthocyanlösung aufzuzeichnen. Als Referenz wurden Placebokapseln, die ohne die Anthocyanlösung pH 2 hergestellt wurden, sowie die reine, unverkapselte Anthocyanlösung pH 2 untersucht.

Abbildung 4.2-9 zeigt den Vergleich der bildlich dargestellten Proben. Bei den ohne Anthocyanlösung pH 2 hergestellten Placebo-LMK (s. Abbildung 4.2-9 a) ist kein Kontrast zu erkennen. Dies ist auf die Abwesenheit der Anthocyane zurückzuführen. Gleichzeitig zeigt dieser Abbildungsteil, dass das Lipid sowie die beiden eingesetzten Emulgatoren keine Emission aufweisen und somit keinen Einfluss auf die Auswertung haben. Die Probe der Anthocyanlösung pH 2 (s. Abbildung 4.2-9 b) zeigt dagegen deutliche Kontraste, die auf die Emission der gelösten Bestandteile des Heidelbeerextraktes zurückzuführen sind. Die Anregungswellenlänge für Anthocyane liegt unter λ : 460 nm¹²². In einer komplex zusammengesetzten Lösung, wie der Anthocyanlösung pH 2, überlagern sich mehrere Fluoreszenzen. Auf Grund dessen ist es nicht möglich eine einzelne Substanz aus dieser

4. Ergebnisse und Diskussion

Lösung als fluoreszierende Spezies zu identifizieren¹²². Des Weiteren hängt die Anregung der einzelnen Anthocyane von deren pH-Wert-abhängigem Protonierungs- und Glycosylierungsgrad ab. Die Lösung wurde aus einem Heidelbeerextrakt gewonnen, der neben den Anthocyanen weitere Komponenten enthält, die teilweise ebenfalls fluoreszieren, wie beispielsweise Chlorophyll (s. Kapitel 3.1.1). Bei Vorversuchen zeigte die Anregungswellenlänge von λ : 633 nm die beste Emission und die kontrastreichsten Bilder.

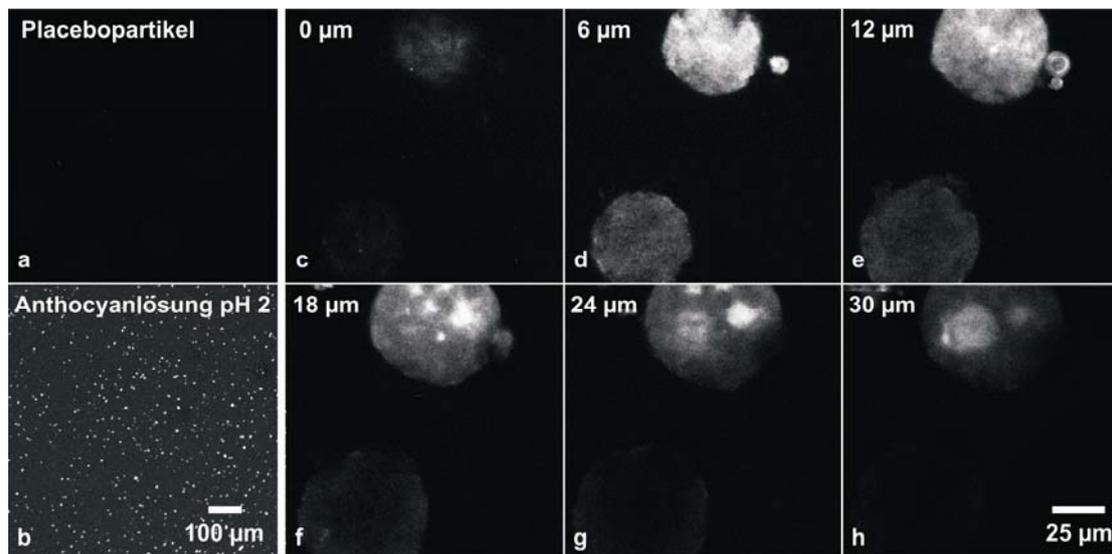


Abbildung 4.2-9 Vergleich der Aufnahme von Placebo-LMK (a) und unverkapselter Anthocyanlösung pH 2 (b) mit einem dreidimensionalen Scan der mittels Becherglasmethode hergestellten LMK (weißer Kontrast) durch sechs Bildebenen (0 μm , 6 μm , 12 μm , 18 μm , 24 μm , 30 μm) mit einem Abstand von jeweils 6 μm (c bis h).

Darüber hinaus zeigt Abbildung 4.2-9 c) bis h) die Bilder der Rasterung einer LMK Präparation. Die LMK zeigen eine Emission, die im Vergleich mit den Aufnahmen der Placebokapseln sowie der Anthocyanlösung pH 2 auf die Anthocyanlösung pH 2 zurückzuführen ist. Der Kontrast dieser Emission differiert auf Grund der Fokussierung von Ebene zu Ebene. Diese unterschiedliche Emission der LMK zeigt, dass die LMK fluoreszierend gefüllt sind. Wäre die Anthocyanlösung nicht verkapselt worden, sondern außen an den Kapseln adsorbiert, würde bei allen Bildern nur ein fluoreszierender Ring um die Partikelhülle erkennbar sein. Durch die unterschiedlich starken Kontraste der LMK wird erneut deutlich, dass die generierten LMK teilweise mehrere mit Anthocyanlösung pH 2 gefüllte Kerne aufweisen.

Durch die Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass die Anthocyanlösung in die Lipidmatrix verkapselt wurde.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.2.4.6 Differenzialthermoanalyse (DSC)

Um die in den LMK inkorporierten Anthocyane freizusetzen müssen die Mikrokapseln schmelzen. Für die genaue Bestimmung des Schmelzpunktes der LMK wurden diese mittels Differenzialthermoanalyse (DSC) analysiert.

Abbildung 4.2-10 a) zeigt die Schmelzkurve von reinem Witepsol[®] W 35 (als Bulk). Die Kurve zeigt einen deutlichen Schmelzpunkt bei 40,6 °C. Nach dem Abkühlen wurde die Probe erneut erwärmt. Der dabei auftretende Schmelzpunkt lag mit 34,9 °C um etwa 5 °C unter dem der ersten Messung. Witepsol[®] W 35 ist ein komplexes Gemisch aus Mono-, Di- und Triglyceriden (s. Kapitel 3.1.2). Bedingt durch diese Zusammensetzung und die unterschiedlichen Kettenlängen der jeweiligen Glyceride existiert ein breiter Schmelzbereich, der jedoch einen klaren Schmelzpunkt aufweist¹²³. Der Haupterstarrungspunkt des Lipid-Bulks liegt bei 25,3 °C.

Für die Entstehung der Temperaturdifferenz zwischen den zwei Aufheizphasen gibt es mehrere Theorien, die anhand der ermittelten Daten nicht zu belegen sind. Eine Möglichkeit ist die kurze Wartezeit nach dem Abkühlen vor dem zweiten Aufschmelzen. Das Lipid-Bulk hatte nicht ausreichend Zeit um zu erstarren. Es lagen flüssige und feste Phase zugleich vor. Die Einhaltung einer längeren Wartezeit bis zum zweiten Aufheizen der Probe könnte Aufschluss darüber geben. Eine weitere Möglichkeit für die Temperaturdifferenz ist das Auftreten von Lipidmodifikationen. Hierzu sollte in weiterführenden Untersuchungen eine Röntgenstrukturanalyse der LMK durchgeführt werden¹²⁴.

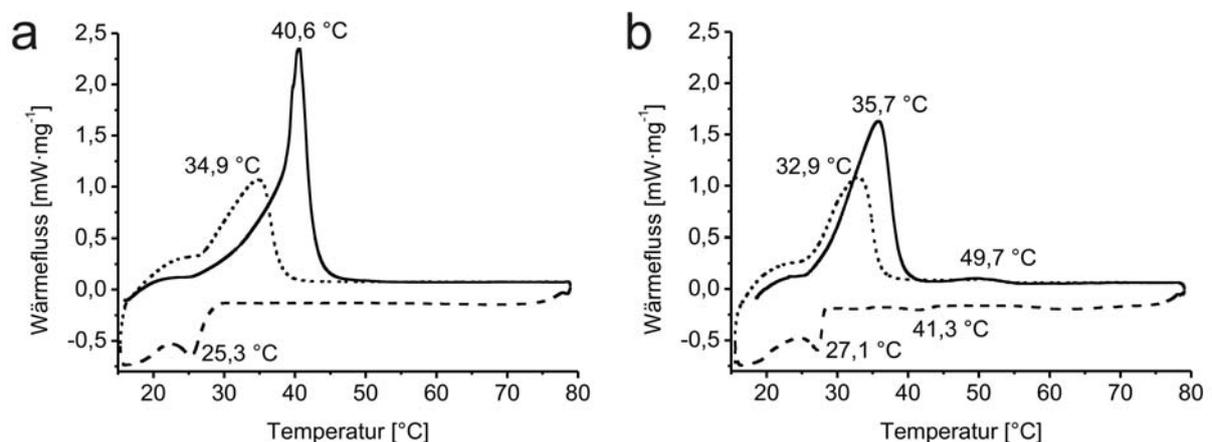


Abbildung 4.2-10 DSC Schmelzkurven von a) reinem Witepsol[®] W 35 (als Bulk) und b) mittels Becherglasmethode hergestellten Lipidmikrokapseln: (—) Aufheizen von 15 °C bis 80 °C, (- - -) Abkühlen von 80 °C auf 15 °C, (···) Aufheizen von 15 °C bis 80 °C.

Im Vergleich der Schmelzkurve des reinen Witepsol[®] W 35 (40,6 °C) mit der der generierten LMK (35,7 °C) (s. Abbildung 4.2-10 b) zeigt sich eine Verschiebung des Schmelzpunktes der ersten Aufheizkurve um etwa 5 °C zu niedrigeren Temperaturen. Bedingt durch die für die

4. Ergebnisse und Diskussion

Verkapselung zugesetzten Emulgatoren und den inkorporierten HBE haben die LMK einen geringeren Schmelzpunkt als das reine Witepsol® W 35^{124,125}.

Im Verlauf der Abkühlungskurve der LMK ist neben dem Erstarrungspunkt bei 27,1 °C ein zweiter, wesentlich schwächerer Erstarrungspeak bei 41,3 °C zu erkennen. Um den Einfluss der verwendeten Emulgatoren auf diesen Erstarrungspunkt zu analysieren, wurden Erstarrungskurven von Witepsol® W 35 mit einem Zusatz von jeweils 5 % (m/m) Span® 80 bzw. Saccharoseester S-370 aufgezeichnet (s. Abbildung 4.2-11).

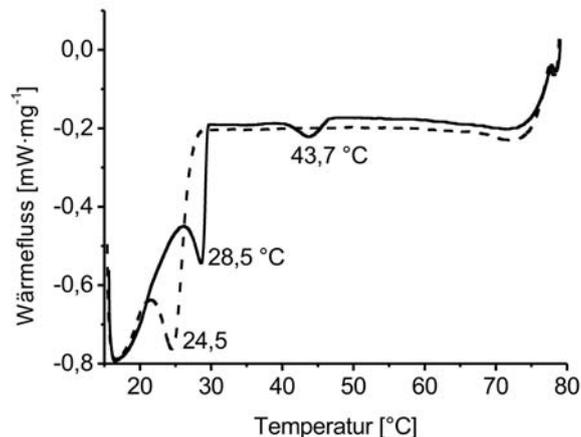


Abbildung 4.2-11 Vergleich der Erstarrungskurven von Witepsol® W 35 mit dem Zusatz von 5 % (m/m) Saccharoseester S-370 (—) bzw. 5 % (m/m) Span® 80 (- - -).

Aus dem Vergleich der beiden Erstarrungskurven geht hervor, dass der zusätzliche Erstarrungspunkt bei etwa 43 °C auf den Saccharoseester S-370 zurückzuführen ist. Das Witepsol® W 35 / Span® 80-Gemisch weist keinen zusätzlichen Erstarrungspunkt auf. Die unterschiedliche Lage des Haupterstarrungspunktes (Span® 80: 24,5 °C; Saccharoseester S-370: 28,5 °C) ist auf die Struktur und die Kettenlänge der substituierten Fettsäuren der jeweiligen Emulgatoren zurückzuführen¹²⁵.

Die Ergebnisse der DSC-Analyse zeigen, dass die LMK einen deutlichen Schmelzpunkt aufweisen und dadurch die inkorporierten Anthocyane freisetzen können. Da die LMK bereits knapp unterhalb der Körpertemperatur schmelzen (bei 35,7 °C), ist eine Freisetzung *in vivo* gewährleistet.

4.2.4.7 Freisetzung

Für die Absorption der Anthocyane im Organismus ist die Liberation aus dem jeweiligen Vehikel erforderlich. Um die Freisetzung der Anthocyane aus den mittels Becherglasmethode entwickelten LMK zu testen, wurden diese in simuliertem Magensaft pH 1,2 (SGF) und in einem den Dünndarm simulierenden Medium (FeSSIF) inkubiert (s. Kapitel 3.3.3.1). Die Quantifizierung der freigesetzten Anthocyane erfolgte mittels HPLC-

4. Ergebnisse und Diskussion

UV/Vis-Analyse (s. Kapitel 3.3.3.2.2). Eine detaillierte Diskussion zu der angewendeten Methode sowie zu dem als Referenz analysierten reinen, unverkapselten Heidelbeerextrakt ist in Kapitel 4.3.1 wiedergegeben.

Abbildung 4.2-12 zeigt die Konzentrations-Zeit-Profile der aus den LMK freigesetzten Gesamtanthocyane in den entsprechenden Medien im Vergleich mit reinem, unverkapseltem HBE. Während der Inkubation in SGF (s. Abbildung 4.2-12 a) steigt der Gesamtanthocyangehalt in den ersten 10 Minuten der Inkubation langsam (bis 9 %) und darauf folgend bis zur 20. Minute rapide an (bis 52 %). Daran anschließend steigt die Anthocyankonzentration langsam bis zur 60. Minute (75 %). Im weiteren Verlauf der Inkubation bleibt der Gesamtanthocyangehalt nahezu konstant bei diesem Wert. Dadurch, dass die LMK nicht vortemperiert waren, mussten diese sich in den $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ warmen Inkubationsmedien erst erwärmen, um die Schmelztemperatur zu erreichen. Abhängig von der Größe der LMK beginnen diese bereits in diesem Zeitraum zu schmelzen und die Anthocyane freizusetzen. Im weiteren Verlauf der Freisetzung schmilzt ein immer größerer Anteil der LMK, wodurch der sprunghafte Anstieg des Gesamtanthocyangehalts auf 52 % zu erklären ist. Die größten LMK schmelzen zuletzt (20. Bis 60. Minute). Ab der 60. Minute sind alle LMK geschmolzen und die Anthocyane liberiert. Auf Grund des niedrigen pH-Wertes des Inkubationsmediums bleiben die Anthocyane in Form des Flavyliumkations stabil (s. Kapitel 2.1), was den konstanten Gesamtanthocyangehalt bis zum Ende der Messung nach 120 Minuten erklärt. Der Anthocyangehalt des reinen, unverkapselten HBE bleibt den gesamten Inkubationszeitraum über konstant. Auffällig ist, dass es trotz des kompletten Aufschmelzens der LMK in dem Inkubationsmedium nicht zu einer 100%igen Freisetzung kommt. Dies ist auf die Bildung von nicht charakterisierten Einschlussverbindungen im Inkubationsmedium zurückzuführen, die die Anthocyane für die Detektion unzugänglich machen. Aufschluss über die Beteiligung des Witepsols[®] an derartigen Verbindungen im SGF hätte eine Wiederholung der Versuche mit dem Zusatz von gastrischer Lipase gebracht. Diese ist jedoch kommerziell nicht erhältlich.

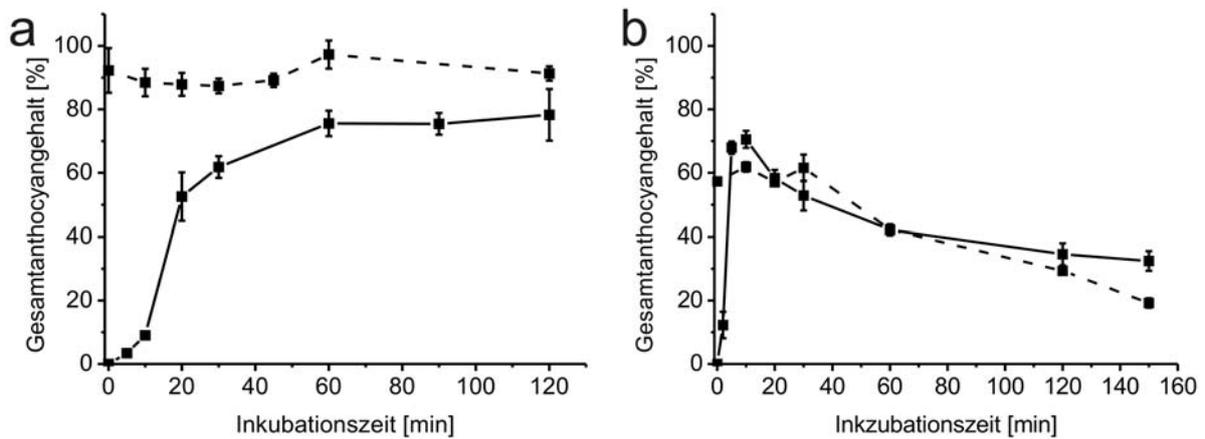


Abbildung 4.2-12 Vergleich der Konzentrations-Zeit-Profile des Gesamtanthocyangehalts von unverkapseltem HBE (---) mit durch die Becherglasmethode hergestellten Lipidmikrokapseln (—): a) in SGF und b) in FeSSIF.

Im Anschluss an die Inkubation in SGF wurden die LMK in FeSSIF inkubiert (s. Abbildung 4.2-12 b). Ein Übertrag der LMK zwischen den beiden Medien war nicht möglich, da diese bereits während der Freisetzung im SGF komplett geschmolzen waren. Das Freisetzungprofil der LMK in FeSSIF zeigte eine beschleunigte Anthocyanfreisetzung von fast 68 % innerhalb der ersten 5 Minuten der Inkubation. Darauf folgend stieg der liberierte Anthocyananteil bis zur 10. Minute leicht an (70,5 %) um anschließend bis zum Ende der Inkubation bis auf 32 % abzufallen. Durch den Zusatz von Pankreatin mit den darin enthaltenen Lipasen zu dem FreisetzungsmEDIUM war die Freisetzung im FeSSIF Medium in den ersten 10 Minuten gegenüber der Freisetzung in SGF beschleunigt. Diese Lipasen wirkten durch den Lipidverdau unterstützend auf den Freisetzungsprozess. Durch den pH-Wert bedingten Abbau der Anthocyane (s. Kapitel 2.1) blieb die Gesamtanthocyankonzentration nicht konstant, sondern sank ab der 10. Minute bis zum Ende der Inkubation ab. Überlagerte Prozesse von Freisetzung und Abbau der Anthocyane sind wahrscheinlich.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Freisetzung der in die LMK inkorporierten Anthocyane stattfindet. Nach der Aufnahme in den Organismus schmelzen die LMK ihrer Größe entsprechend unterschiedlich schnell und setzen die inkorporierten Anthocyane frei. Am Ende der Inkubation in FeSSIF ist der Gesamtanthocyangehalt der aus den LMK freigesetzten Anthocyane um 13 ± 2 % höher als bei dem reinen, unverkapselten HBE. Die entwickelten LMK bilden einen Schutz für die darin verkapselten Anthocyane gegenüber dem unverkapselten HBE, vorausgesetzt, dass eine Freisetzung im Magen verhindert ist.

4.3 Charakterisierung der Kapselsysteme aus dem Cluster

4.3.1 Freisetzungsversuche

Um die Freisetzung der Anthocyane aus den Kapselsystemen AP, MP und SL (s. Kapitel 3.2.1) sowie die Stabilität der freigesetzten Anthocyane im Vergleich mit unverkapseltem HBE zu analysieren wurden die Kapselsysteme in SGF und FeSSIF inkubiert. Diese Medien simulieren die physiologischen Bedingungen im Magen und im Darm (nach der Nahrungsaufnahme).

Der für die Inkubationen eingesetzte End-over-End-Mischer (s. Abbildung 3.3-2) ist nicht in den Arzneibüchern erwähnt. Im Vergleich zu den klassischen Freisetzungsapparaturen, die in den Arzneibüchern beschrieben sind (Drehkörbchen-Apparatur – Apparatur 1 nach Ph. Eur. und USP bzw. die Blattrührer-Apparatur – Apparatur 2 nach Ph. Eur. und USP), besitzt der End-over-End-Mischer eine Vielzahl an Vorteilen, die im Folgenden diskutiert werden. Der Scherstress im verwendeten End-over-End-Mischer ist geringer und konstanter als bei den genannten Apparaturen der Arzneibücher. Bei der Verwendung der Blattrührerapparatur hängt der Scherstress, den die Probe erfährt, von der Lokalisation des Freigabesystems im Probengefäß ab. Es ist ebenfalls möglich, dass der Blattrührer dem Freigabesystem einen Stoß gibt und dieses dadurch einen mechanischen Schaden nimmt, der die Freisetzung beeinflusst. Bei der Anwendung von Drehkörbchen-Apparaturen ist die Gefahr des mechanischen Abriebs durch Interaktionen des Freigabesystems mit den Maschen der Körbchenwandung gegeben. Dadurch werden unter Umständen variable Resultate erzielt. Ein weiterer Vorteil des End-over-End-Mischers ist das geringere Volumen der Probengefäße. Diese fassen von 7,5 mL bis 15 mL. Die in den Arzneibüchern beschriebenen Apparaturen haben Probengefäße, die 1 Liter Prüfflüssigkeit fassen. Das kleinere Volumen der Probengefäße beim End-over-End-Mischer ist gerade bei kleinen Probenmengen von Vorteil. Durch den geringeren experimentellen Aufwand sind End-over-End-Versuche sehr gut reproduzierbar. Die experimentellen Bedingungen, wie eine permanente Rotation der Probe, ein permanenter Kontakt der Probe mit dem FreisetzungsmEDIUM und die vorherrschenden Temperaturen, die bei den Apparaturen der Arzneibücher gefordert sind, wurden bei den Freisetzungsversuchen im End-over-End-Mischer entsprechend der Arzneibuchmonographien eingehalten (s. Kapitel 3.3.3.2.1).

Um die Anthocyanfreisetzung der Kapselsysteme sowie die Stabilität der freigesetzten Anthocyane zu analysieren wurden die Kapselsysteme entsprechend dem Nahrungsverlauf im menschlichen Organismus zuerst in SGF ohne den Zusatz von Enzymen inkubiert. Während der 120-minütigen Inkubationen wurden keine Veränderungen des pH-Wertes des FreisetzungsmEDIUMS ermittelt. Die Änderungen des Gesamtanthocyanangehalts während der Inkubation von unverkapseltem HBE sind in Abbildung 4.3-1 a dargestellt.

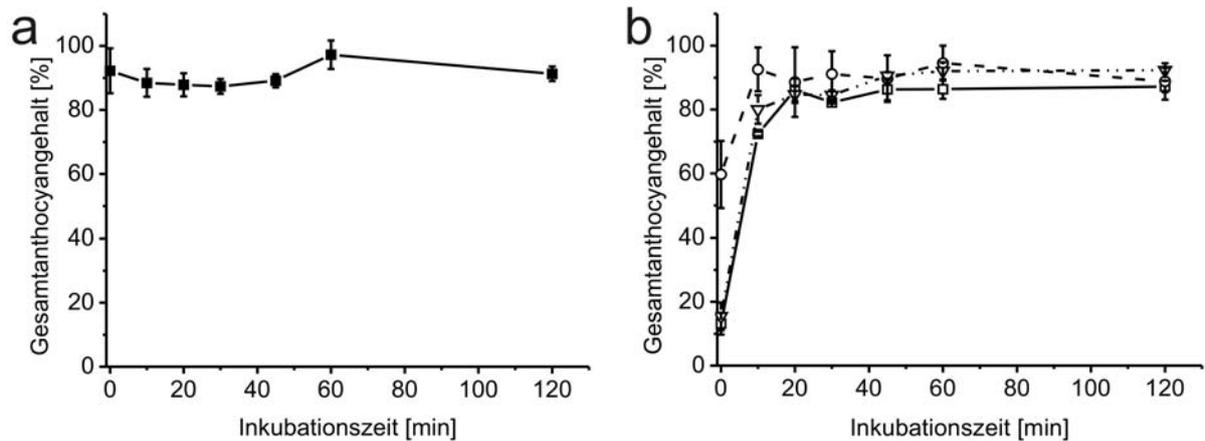


Abbildung 4.3-1 Konzentrations-Zeit-Profil des Gesamtanthocyangehalts von a) unverkapseltem HBE (■) und b) den drei Mikrokapselsystemen: AP (□), MP (○), SL (▽) in SGF.

Der Gesamtanthocyangehalt ist über den gesamten Inkubationszeitraum nahezu konstant. Diese Daten werden durch Literaturangaben bestätigt, welche eine gute Stabilität der Anthocyane bei niedrigen pH-Werten (pH 1 - 2) aufzeigten^{126,127}. Diese beruht auf dem stabilen Flavyliumkation, welches sich bei diesen Bedingungen ausbildet (s. Kapitel 2.1). Anschließend wurden die Kapselsysteme AP, MP und SL in SGF inkubiert (s. Abbildung 4.3-1 b). Während der ersten 20 Minuten der Inkubation in SGF zeigen die Systeme AP und SL gleiche Freisetzungprofile. Nach dem Erreichen der Maximalkonzentration zwischen 85 % - 92 % bleiben die jeweiligen Kurvenverläufe über die verbleibende 100-minütige Inkubationszeit nahezu konstant. Das MP-System zeigt ähnliche Resultate. Die Freisetzung der darin verkapselten Anthocyane ist im Vergleich mit den anderen beiden Systemen jedoch schneller und binnen der ersten 10 Minuten nahezu vollständig.

Die drei Freisetzungprofile zeigen, dass die generierten Kapselsysteme nicht in der Lage sind, die verkapselten Anthocyane vor einer frühzeitigen Freisetzung im Magen zu schützen. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass Mikropartikel in diesem Größenbereich unabhängig von der Art und Menge der Füllung des Magens diesen schneller passieren, als die Dauer der Inkubation betrug. Des Weiteren verhalten sich Partikel, die kleiner als 2 mm sind, *in vivo* annähernd wie Flüssigkeiten und können den geschlossenen Pylorus passieren. Schellack ist ein Hilfsstoff, der magensaftresistente Eigenschaften aufweist^{69,128-130}. Überraschenderweise zeigt das mit einem Schellackfilm überzogene System SL ebenfalls eine Freisetzung im simulierten Magensaft. Dies ist zum einen mit dem im Filmüberzug enthaltenen Porenbildner Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) zu erklären. Das Freisetzungsmittel löst die HPMC aus dem Filmüberzug heraus. Als Konsequenz bilden sich Poren, durch die das Inkubationsmedium in die Kapseln eindringen kann. Der Filmüberzug verliert dadurch seine magensaftresistenten Eigenschaften. Die inkorporierten Anthocyane können durch die entstandenen Poren in das Magenlumen freigesetzt werden.



Abbildung 4.3-2 Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme eines mit Schellack überzogenen Matrixpartikels aus amidiertem Pektin (System SL) (zur Verfügung gestellt von TP 5)

Zum anderen hat der nicht gleichmäßige Filmüberzug einen Einfluss auf das Freisetzungsverhalten der SL-Kapseln. Beim Überziehen von Granulaten in der Wirbelschicht ist es schwierig, einen homogenen Filmüberzug zu erzielen. Durch die unebene, brombeerartige Oberflächenstruktur des Granulates (s. Abbildung 4.3-2) ist die Bildung eines homogenen, zusammenhängenden Filmes ohne Defekte erschwert¹³¹. Dies führt zu einer Minderung der magensaftresistenten Eigenschaften des Filmüberzugs, da bei Schellack die resultierenden Eigenschaften des Filmüberzugs unter anderem über die Schichtdicke des aufgetragenen Filmüberzuges gesteuert werden^{132,133}. Durch die Veränderung der Zusammensetzung des Filmüberzuges ist eine Zurückhaltung der Anthocyane in den Mikrokapseln zu erwarten⁶⁹.

Auf Grund der Freisetzung der Anthocyane aus allen drei Kapselsystemen binnen der ersten 20 Minuten der Inkubationen wurde eine Wiederholung der Freisetzungsversuche mit dem Zusatz von Pepsin (Protease), als im Magen vorkommendes proteinspaltendes Enzym, nicht durchgeführt. Der Einsatz von gastrischer Lipase, einem lipidspaltenden Enzym, war nicht möglich, da diese nicht kommerziell erhältlich ist. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen wäre der Einsatz von gastrischer Lipase nicht reproduzierbar möglich gewesen, da diese ihr Aktivitätsmaximum um pH 5,4 hat. Trotz des breit gefächerten Aktivitätsspektrums der gastrischen Lipase von pH 3 - pH 7, wäre diese bei den vorliegenden experimentellen Bedingungen (pH 1,2) nicht reproduzierbar aktiv gewesen¹³⁴.

Der dem Magen folgende Abschnitt des GIT ist der Dünndarm. Dieser Abschnitt wurde durch das FeSSIF-Medium unter Zusatz von Pankreatin als Enzymquelle (enthält Lipasen, Amylasen und Proteasen) simuliert. Der laut den Arzneibüchern vorgeschriebene Übertrag der zu untersuchenden Darreichungsformen zwischen den beiden Medien wurde nicht durchgeführt, da im SGF bereits alle Anthocyane aus den Mikrokapseln freigesetzt wurden. Ein großer Unterschied zwischen dem Magen und dem Dünndarm ist der vorherrschende

4. Ergebnisse und Diskussion

pH-Wert, der im Dünndarm auf ca. pH 6,8 ansteigt.

Das Konzentrations-Zeit-Profil von nicht verkapseltem HBE in FeSSIF ist in Abbildung 4.3-3 a) dargestellt. Bereits zu Beginn der Inkubation wurden ca. 40 % der Anthocyane abgebaut. Der initial gemessene Gesamtanthocyangehalt erreichte ungefähr 60 % und blieb in den ersten 30 Minuten der Inkubation konstant. Im weiteren Verlauf sank der Gesamtanthocyangehalt auf 19 % ab. Dieser Konzentrationsabfall ist auf die Instabilität des Flavyliumkations bei nahezu neutralen pH-Werten um pH 6,8 zurückzuführen^{34,127,135}. Dabei ist bekannt, dass sich die einzelnen Anthocyane in ihrer Stabilität im Magen-Darm-Trakt unterscheiden⁷¹. Diese unterschiedlichen Stabilitäten der einzelnen Anthocyane beeinflussen die hier dargestellten Untersuchungen jedoch nicht, da für diese Ergebnisse der Anthocyangehalt aller 15 im HBE vorkommenden Anthocyane berechnet und auf den Gesamtanthocyangehalt jedes Kapselsystems bezogen wurde.

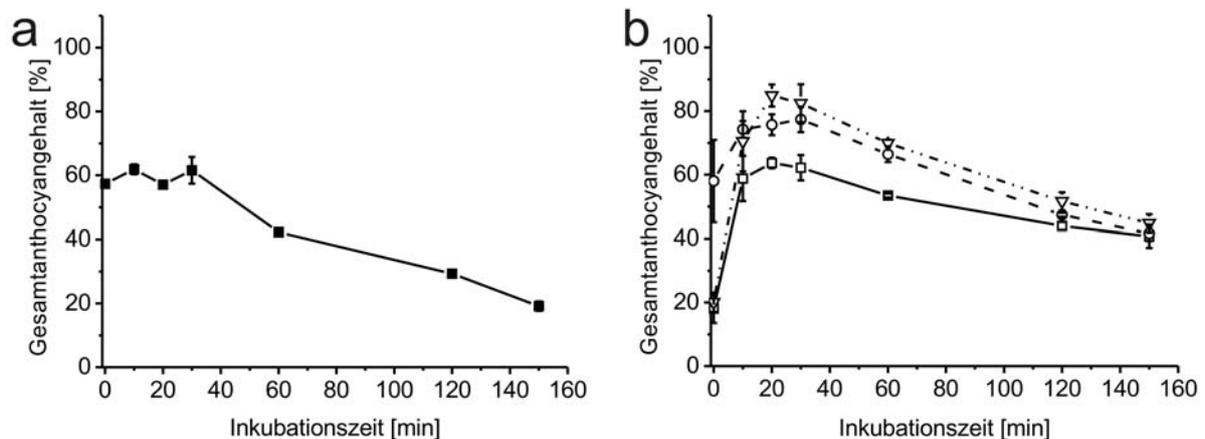


Abbildung 4.3-3 Konzentrations-Zeit Profil des Gesamtanthocyangehalts von a) unverkapseltem HBE (■) und b) den drei Mikrokapselsystemen: System AP (□), System MP (○), System SL (▽) in FeSSIF.

Abbildung 4.3-3 b) zeigt das Konzentrations-Zeit Profil der drei Mikrokapselsysteme in FeSSIF. Während der ersten 30 Minuten der Inkubation ist bei allen drei Kapselsystemen ein Anstieg der Gesamtanthocyankonzentration zu beobachten. Dieser Anstieg beruht auf der Freisetzung der Anthocyane aus den jeweiligen Kapseln. Das erreichte Konzentrationsmaximum der einzelnen Kapselsysteme weicht jedoch im Vergleich mit der Inkubation in SGF (s. Abbildung 4.3-1 b) voneinander ab: System AP: 64 % (20 min), System MP: 77 % (30 min) und System SL: 85 % (20 min). Im Anschluss daran fällt der Gesamtanthocyangehalt der aus den Kapselsystemen freigesetzten Anthocyane bis zum Ende der Inkubation ab. Dieser Konzentrationsabfall ist mit dem des nicht verkapselten HBE vergleichbar. Nach 150-minütiger Inkubation erreichen alle Kapselsysteme den gleichen Gesamtanthocyangehalt von 42 %. Damit haben alle drei Kapselsysteme, im Vergleich zur Inkubation von nicht verkapseltem Heidelbeerextrakt, zu einer Verdoppelung des

Gesamtanthocyangehaltes nach 150-minütiger Inkubation geführt.

Während der Inkubation der drei Kapselsysteme in FeSSIF erreicht der Gesamtgehalt an freigesetzten Anthocyanen nicht die 100 %-Marke. Dies führt zu der Annahme, dass ein zeitgleich zur Freisetzung stattfindender pH-Wert bedingter Anthocyanabbau stattfindet¹²⁷. Diese Annahme wird durch den Verlauf des Konzentrations-Zeit-Profiles des unverkapselten HBE im FeSSIF-Medium (Abbildung 4.3-3 a) gestützt. Gleich zu Beginn werden Anthocyane abgebaut, da nicht der theoretisch berechnete 100 % Wert erreicht wird. Der Gesamtanthocyangehalt liegt nur bei 60 %. Dieser Wert bleibt etwa 30 Minuten konstant und sinkt im weiteren Verlauf der Inkubationszeit ab. Die Freisetzungskurven der drei Kapselsysteme steigen ebenfalls in den ersten 20 Minuten (SL und AP) bzw. 30 Minuten (MP) der Inkubation an und sinken danach ab (Abbildung 4.3-3 b).

Während der Inkubationen zeigen die drei Kapselsysteme unterschiedliche Freisetzungseigenschaften, die auf die unterschiedlichen Arten der Kapseln (Kern-Hülle bzw. Matrix), Größen und verwendeten Hilfsstoffe zurückzuführen sind (s. Abbildung 3.2-1 und Tabelle 3.2-1). Für die Systeme AP (Hydrogel-Hülle mit flüssigem Kern) und MP (Hydrogelmatrix) muss eine durch den Herstellungsprozess bedingte Anhaftung der Anthocyane an der Oberfläche beachtet werden¹³⁶. Da es nach der Herstellung keinen Waschprozess der Kapseln gab, werden die an der Oberfläche anhaftenden Anthocyane direkt zu Beginn freigesetzt. Derartige Effekte treten bei dem Kapselsystem SL nicht auf. Der nach dem Granulieren aufgetragene Schellackfilm bildet eine Hülle um die anthocyanhaltige Matrix. Dadurch kommt diese Matrix nicht direkt zu Beginn der Inkubation in den direkten Kontakt mit dem Inkubationsmedium. Ein weiterer, die Freisetzung beeinflussender, Faktor ist die Größe der Kapselsysteme. Abbildung 4.3-1 und Abbildung 4.3-3 zeigen, dass in beiden Inkubationsmedien direkt zu Beginn der Inkubation ($t = 0$) 15 - 20 % Gesamtanthocyangehalt aus den Systemen AP und SL sowie 60 % Gesamtanthocyangehalt aus dem System MP freigesetzt wurde. Dieser Unterschied ist mit den Größen der Kapselsysteme zu erklären. System MP ist mit 180 μm das kleinste der drei untersuchten Kapselsysteme (zum Vergleich: AP: 1800 $\mu\text{m} \pm 200 \mu\text{m}$ und SL 250 μm - 500 μm). Durch den geringeren Durchmesser ist die Diffusion der verkapselten Anthocyane aus dem Inneren der Matrix an die Oberfläche vergleichsweise schneller. Somit ist die Freisetzungsrates höher als bei den anderen beiden untersuchten Systemen. Voraussetzung hierfür ist, dass der Diffusionskoeffizient unabhängig von der Art der Systeme gleich ist. Die Oberfläche der drei Kapselsysteme, die während der Inkubation eines identischen verkapselten Gesamtanthocyangehaltes mit dem FreisetzungsmEDIUM in Kontakt kommt, ist bei den MP-Kapseln größer als bei den beiden Systemen AP und SL, da eine größere Anzahl an Kapseln eingesetzt wurde. Dieser Faktor verstärkt zusätzlich die initiale Freisetzung der Anthocyane des MP-Systems. Die MP-Kapseln bestehen aus einer, bei dem angewendeten

4. Ergebnisse und Diskussion

experimentellen Design, nicht abbaubaren Matrix. Die darin verkapselten Anthocyane des HBE können durch Poren heraus diffundieren. Die gesamte Diffusionsoberfläche A der MP-Kapseln ist direkt proportional zum freigegebenen Gesamtanthocyangehalt (s. Gleichung 9)¹³⁷.

$$GA = k_r * A * \sqrt{t} \quad (9)$$

GA freigegebener Gesamtanthocyangehalt

k_r Freigabegeschwindigkeitskoeffizient

A effektive Diffusionsoberfläche

t Zeit

Bei den anderen beiden Kapselsystemen ist die entsprechende gesamte Diffusionsoberfläche A aller im Ansatz inkubierten Kapselsysteme kleiner, da bei identisch verkapseltem Anthocyangehalt auf Grund der Kapselgröße weniger Kapseln eingesetzt wurden.

Eine durch Quellung und damit einhergehende Vergrößerung des Porendurchmessers der unlöslichen MP-Kapseln hervorgerufene Freisetzung kann nahezu ausgeschlossen werden. Auf Grund der Anwendung der hydratisierten Form der Gele ist die durch Quellung hervorgerufene Änderung des Porendurchmessers vernachlässigbar. Die pH-Wert-abhängige Quellung hätte einen Einfluss auf die Freisetzung, wenn die MP-Kapseln nach dem Herstellungsprozess getrocknet worden und daran anschließend in den Medien inkubiert worden wären. Bei einer derartigen Vorbehandlung der Gele ist die durch Quellung induzierte Veränderung des Porendurchmessers von der zeitabhängigen Rehydratisierung während der Inkubation der Kapseln abhängig¹³⁸.

In der Literatur ist eine Bindungsaffinität der Anthocyane an Proteine beschrieben¹³⁹⁻¹⁴¹. Um einen derartigen Einfluss auf die Freisetzung des MP-Systems auszuschließen, wurde die reine MPI-HBE-Stammlösung (s. Kapitel 3.2.3) in SGF und FeSSIF inkubiert (s. Abbildung 4.3-4).

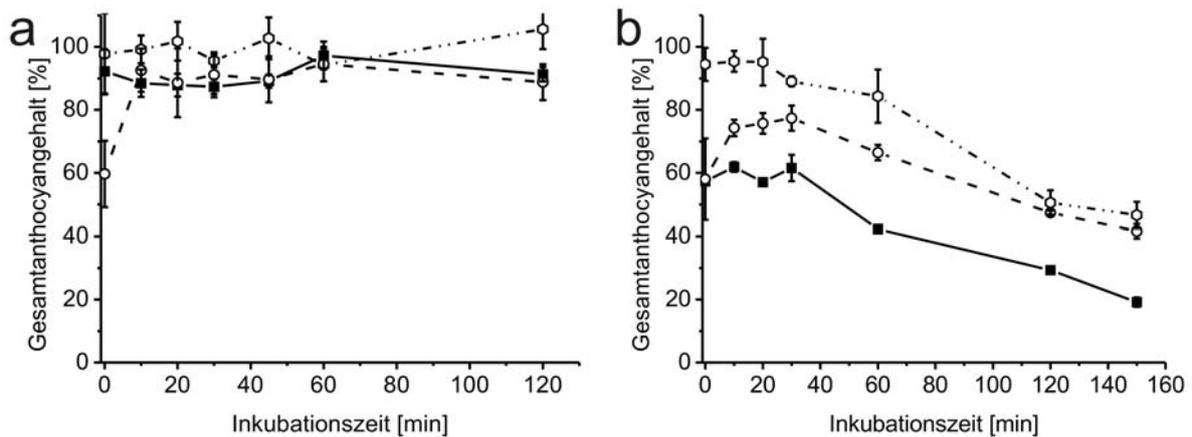


Abbildung 4.3-4 Konzentrations-Zeit-Profil des Gesamtanthocyangehalts von unverkapseltem HBE (■), dem Kapselsystem MP (○) sowie einer MPI-HBE-Stammlösung (◇) während der Inkubation in a) SGF und b) FeSSIF.

Der Gesamtanthocyangehalt der MPI-HBE-Stammlösung in SGF war nahezu konstant und vergleichbar mit dem des reinen HBE (s. Abbildung 4.3-4 - a). Der stabilisierende Effekt der Molkenproteine auf die Anthocyane wird gleich zu Beginn der Inkubation in FeSSIF deutlich (s. Abbildung 4.3-4 - b). Initial werden nur etwa 10 % der Gesamtanthocyane abgebaut. Im weiteren Verlauf der Inkubation sinkt jedoch auch der Gesamtanthocyangehalt der MPI-HBE-Stammlösung auf einen Wert von etwa 45 %. Dies ist ebenfalls auf einen pH-Wert bedingten Abbau der Anthocyane zurückzuführen. Die Stabilisierung der Anthocyane in der MPI-HBE-Stammlösung beruht auf Interaktionen zwischen den nativen Molkenproteinen und den Anthocyanen. Eine derartige Stabilisierung der Anthocyane ist in den MP-Kapseln nicht möglich, da die Molkenproteine hier durch die thermische Gelbildung vernetzt sind und die Proteine nicht in ihrer nativen Form vorliegen¹⁰¹. Eine Beeinflussung der Freisetzung aus den MP-Kapseln durch die Bindung der Anthocyane an Proteine ist somit vernachlässigbar. Die verzögerte Freisetzung und damit die erhöhte Stabilität der Anthocyane aus den MP-Kapseln ist ein zeitabhängiger Diffusionsprozess und zeigt den Nutzen der Verkapselung der Anthocyane durch dieses Kapselsystem¹⁰¹.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass nach 150-minütiger Inkubation der drei getesteten Kapselsysteme der resultierende freie Gesamtanthocyangehalt um 23 % ± 2 % höher ist als bei 150-minütiger Inkubation von nicht verkapseltem HBE. Diese Resultate zeigen den protektiven Effekt der Verkapselung von Anthocyanen im Dünndarm, vorausgesetzt eine Freisetzung im Magen ist verhindert.

4.3.2 Lipidanalytik

4.3.2.1 Partikelgrößenbestimmung

Die Verteilungssumme Q_3 der beiden untersuchten $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsionen sind in Abbildung 4.3-5 dargestellt. Die GSE-Emulsion ist aus kleineren Tropfen zusammengesetzt (mittlerer Sauterdurchmesser $d_{(3,2)} = 6,7 \mu\text{m}$) als die KE-Emulsion (mittlerer Sauterdurchmesser $d_{(3,2)} = 17,0 \mu\text{m}$).

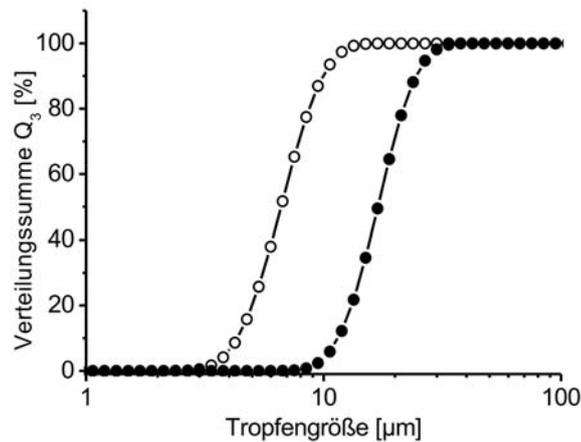


Abbildung 4.3-5 Verteilungssumme Q_3 der inneren Tropfen der beiden untersuchten $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsionen: ○ = Doppelemulsion mit Gallensalzemulgator (GSE), ● = Doppelemulsion mit Protein-Polysaccharid-Konjugatemulgator (KE).

Dies ist auf die unterschiedlichen Adsorptionskinetiken der in den Emulsionen verwendeten hydrophilen Emulgatoren an die O/W_2 -Grenzfläche zurückzuführen^{142,143}. Im Gegensatz zu Gallensalzen, die ein niedriges Molekulargewicht haben, weist der langkettige Konjugatemulgator ein hohes Molekulargewicht auf. Emulgatoren, die ein niederes Molekulargewicht haben, adsorbieren schneller an den Grenzflächen als Emulgatoren mit einem hohen Molekulargewicht¹⁴⁴. Demzufolge ist die Reduktion der Grenzflächenspannung und damit die Stabilisierung der W_1/O -Tropfen unter Anwendung der Gallensalze als hydrophiler Emulgator erhöht. Als Konsequenz kann die Koaleszenz während des Emulgierprozesses effektiv reduziert werden, was im Fall der eingesetzten Gallensalze zu kleineren Tropfen führt⁸⁸. Die charakteristischen Partikelgrößen $d_{(0,1)}$, $d_{(0,5)}$ und $d_{(0,9)}$ sind in Tabelle 4.3-1 dargestellt. Der Vergleich dieser Daten mit denen der Verteilungssumme Q_3 (s. Abbildung 4.3-5) verdeutlicht eine enge monomodale Tropfengrößenverteilung.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.3-1 Übersicht der charakteristischen Tropfendurchmesser [μm] der beiden untersuchten Doppelemulsionen

| | $d_{(3,2)}$ | $d_{(0,1)}$ | $d_{(0,5)}$ | $d_{(0,9)}$ |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| GSE-Emulsion | 6,7 | 4,6 | 7,0 | 10,4 |
| KE-Emulsion | 17,0 | 12,3 | 17,8 | 25,3 |

4.3.2.2 Pankreatintest

Die Durchführung des Pankreatintests ist im Kapitel 3.3.3.2.3 beschrieben. Um die Einflüsse der in den untersuchten Emulsionen enthaltenen Hilfsstoffe sowie der Bestandteile der eingesetzten Verdaumedien auf die Detektion der Lipidfraktionen zu ermitteln, wurden alle verwendeten Hilfsstoffe auf eine HPTLC-Platte aufgetragen (Abbildung 4.3-6). Diese Platte wurde analog der Platten mit den Analysen entwickelt.

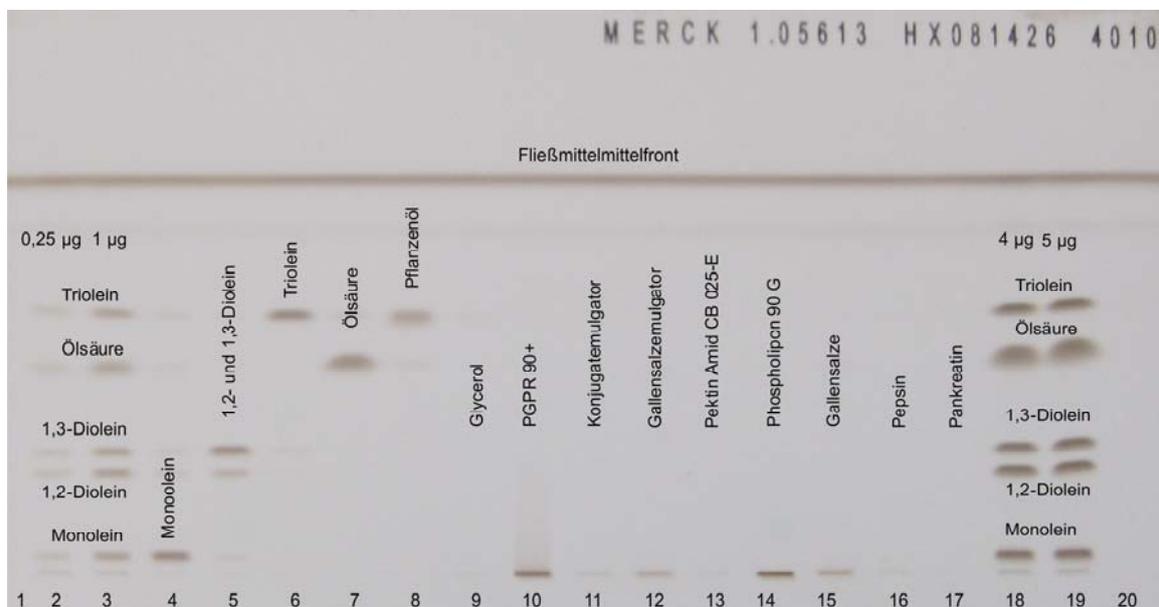


Abbildung 4.3-6 Entwickelte HPTLC-Referenzplatte. Aufgetragen sind die Kalibrierungsstandards (Reihen 2, 3, 18 und 19), die einzelnen Lipidfraktionen (Reihe 4-8), die Inhaltsstoffe der analysierten Emulsionen (Reihen 8-13) sowie Bestandteile der Verdaumedien (Reihen 14-17).

Durch den gewählten Fließmittelgradienten (s. Kapitel 3.3.3.2.4) sind nur die Kalibrierungsstandards sowie die einzelnen Lipidfraktionen aufgetrennt worden. Die verwendeten Hilfsstoffe zeigen keine Beeinflussung des Retentionsverhaltens und der Detektion der einzelnen Lipidfragmente.

4.3.2.3 SGF

Der erste Abschnitt des Gastrointestinaltraktes (GIT) in dem die Nahrung länger verweilt ist der Magen. Um das Verhalten der zu untersuchenden Doppelemulsionen im Magen zu

4. Ergebnisse und Diskussion

simulieren, wurden diese in simuliertem Magensaft pH 1,2 mit dem Zusatz von Pepsin, nach der Vorschrift der USP 32, inkubiert. Pepsin ist eine Protease und spaltet Peptidbindungen. Diese ist jedoch nicht in der Lage, die Esterbindungen von Triglyceriden zu hydrolysieren. Enzyme, die derartige Bindungen spalten, sind die in die Klasse der Hydrolasen gehörenden Lipasen. Eine Zugabe dieser im Magen vorkommenden gastrischen Lipase war nicht möglich, da dieses Enzym nicht kommerziell erhältlich ist. Die durchgeführten Versuche zeigen daher lediglich das Verhalten der Doppelemulsionen im sauren Magenmilieu. Ein Verdau, wie er im Magen stattfindet, konnte nicht simuliert werden.

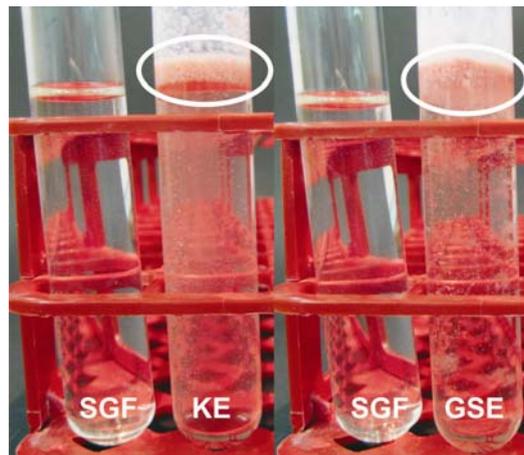


Abbildung 4.3-7 Verhalten der Doppelemulsionen in simuliertem Magensaft pH 1,2. Die weiße Markierung zeigt den aufgerahmten Anteil der Doppelemulsion. SGF = reiner simulierter Magensaft ohne Enzymzusatz; KE = Doppelemulsion mit Protein-Polysaccharid-Konjugatemulgator; GSE = Doppelemulsion mit Gallensalzemulgator.

Hervorgerufen durch das saure Milieu (pH 1,2) des Inkubationsmediums verteilen sich die Emulsionen nicht homogen in dem das Magenmilieu simulierenden Medium, da die Proteine des Konjugatemulgators denaturierten. Wie Abbildung 4.3-7 zeigt, lagen beide Emulsionen nicht mehr als disperses System vor. Die Lipidphasen rahmten auf (weiße Markierung).

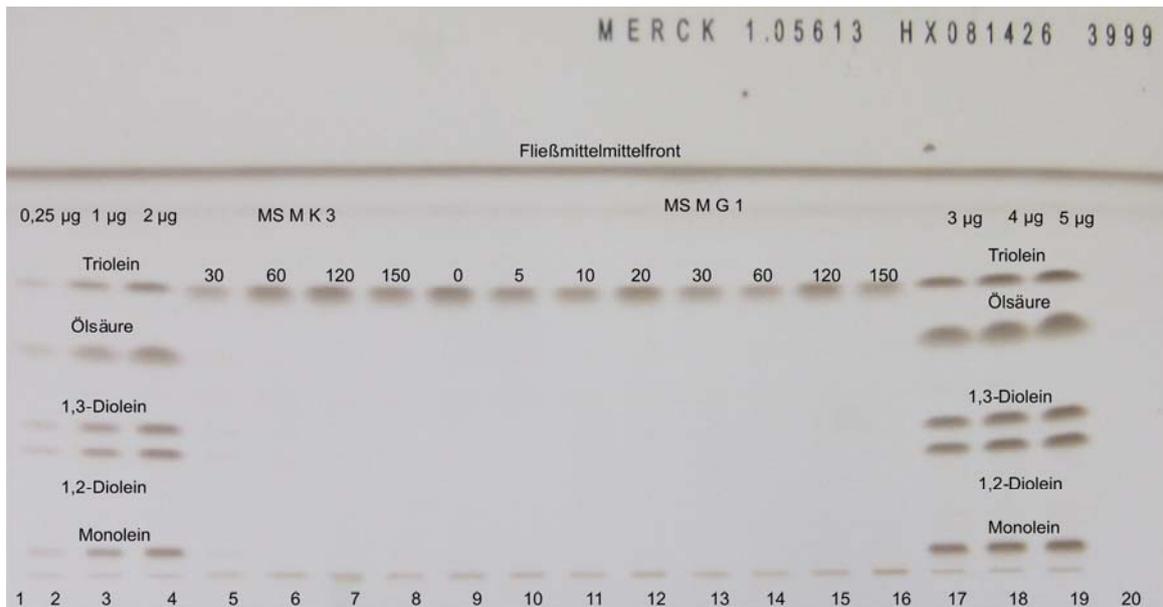


Abbildung 4.3-8 Entwickelte HPTLC-Platte zweier Analysen einer $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsion mit Protein-Polysaccharid-Konjugatemulgator (MS M K 3 – Spuren 5 – 8) sowie Gallensalzemulgator (MS M G 1 – Spuren 9 – 16) in SGF. Die Spuren 2 – 4 sowie 17 – 19 beinhalten die Kalibrierung in dem oberhalb der aufgespaltenen Fraktionen stehenden Gehalt. Die Zahlen auf der Höhe der Trioleinkalibrierung bezeichnen den Zeitpunkt der Probenahme (in Minuten).

Durch das Fehlen von gastrischer Lipase ist im Verlauf der 120-minütigen Inkubation eine konstante Triglyceridbande zu erwarten. Dies stellte sich nach der Entwicklung der Platten jedoch anders dar. Die Schwärzung der Triglyceridbande variierte von stark bis schwach gefärbt (s. Abbildung 4.3-8 Reihen 5 bis 16). Die Ursache liegt in der nicht homogen verteilten Emulsion im Inkubationsansatz. Dadurch wurden beim Probenzug zu den festgelegten Zeitpunkten keine homogenen Mengen des Emulsionsansatzes entnommen. Eine Wiederholung des Versuches im identischen Versuchsdesign, jedoch ohne Zugabe von Pepsin, zeigte das gleiche Versuchsergebnis. Eine quantitative Auswertung der Triglyceridkonzentration während der gesamten Inkubation war dadurch nicht möglich.

Die weiteren Lipidfraktionen (MG, 1,2-DG, FF) wurden nicht detektiert. Dieses Ergebnis bestätigt, dass Pepsin den Abbau der Triglyceride nicht katalysieren kann.

4.3.2.4 FaSSIF / FeSSIF

Das Aufspaltungsverhalten der Lipidfraktionen der untersuchten $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsionen ist in Abbildung 4.3-9 dargestellt. Bereits durch die unterschiedlich intensive Schwärzung der Lipidbanden ist ein erfolgreicher Verlauf des Lipidverdaus ersichtlich: mit der Verlaufszeit der Inkubation (0 Minuten – 150 Minuten) nimmt die Schwärzung der Trioleinbande ab und die Schwärzung der Ölsäurebande zu.

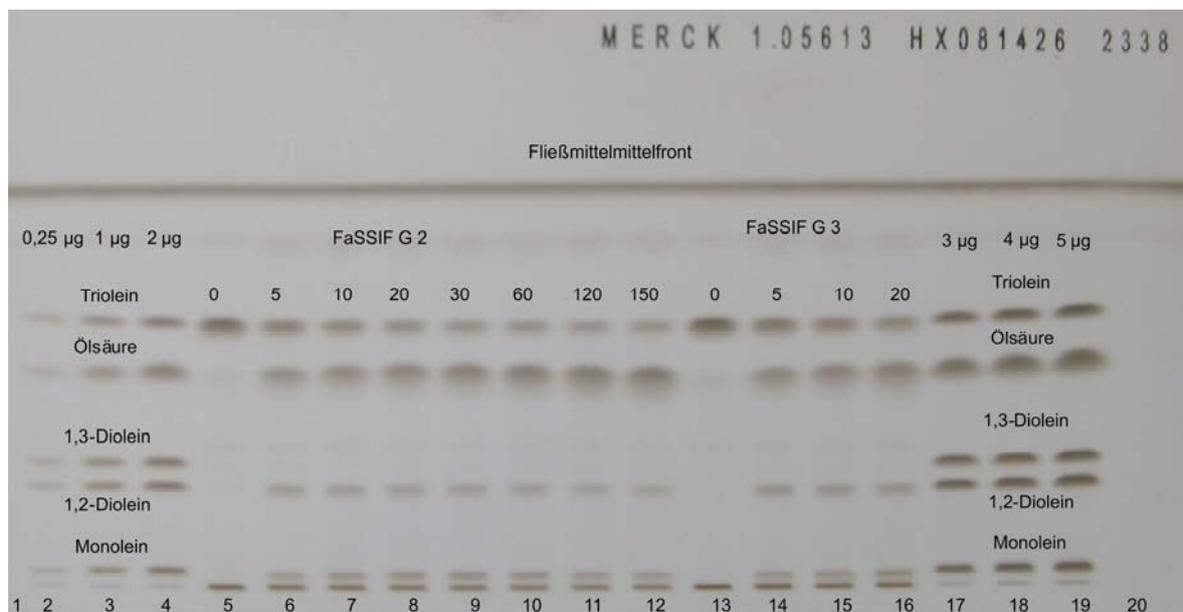


Abbildung 4.3-9 Entwickelte HPTLC-Platte zweier Analysen einer $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsion mit Gallensalzemulgator in FaSSIF. Die Spuren 2 – 4 sowie 17 – 19 beinhalten die Kalibrierung in dem oberhalb der aufgespaltenen Fraktionen stehenden Gehalt. Die Spuren 5 – 12 (FaSSIF G2) stammen vom zweiten Ansatz, die Spuren 13 – 16 (FaSSIF G3) vom dritten Ansatz des Emulsionsverdaus. Die Zahlen auf der Höhe der Trioleinkalibrierung bezeichnen den Zeitpunkt der Probenahme (in Minuten).

Die Abbildung 4.3-10 und Abbildung 4.3-11 zeigen die Konzentrations-Zeit-Profile der Triglyceride und deren Abbauprodukte während des Verdaus der beiden untersuchten $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsionen. Die unterschiedlichen Gehaltsangaben der Lipidfraktionen zu Beginn der Inkubation ($t = 0$ Minuten) sind auf eine nicht homogene Verteilung der Emulsion im Inkubationsgefäß vor der ersten Probennahme der Analyse zurückzuführen.

Die Triglyceridkonzentration der KE-Emulsion (Abbildung 4.3-10 a und e) nimmt während der ersten 5 Minuten der Inkubation in beiden Medien schnell ab. Der größte Anteil dieser Fraktion wurde in diesem Zeitraum hydrolysiert. Im Vergleich zu der Inkubation in FeSSIF-Medium, in welchem der Verdau nahezu vollständig war, waren nach 150-minütiger Inkubation in FaSSIF im Mittel $6 \mu\text{mol/mL}$ der Triglyceridfraktion übrig. Dies zeigt einen nicht vollständigen Verdau im FaSSIF. Durch den schnellen Abbau der Triglyceride steigt die Konzentration der 1,2-Diglyceride zu Beginn der Inkubation sprunghaft an (Abbildung 4.3-10 b und f). Auf Grund der Tatsache, dass 1,2-Diglyceride nur Zwischenprodukte beim Verdau von Triglyceriden sind, sinkt deren Konzentration im weiteren Verlauf der Inkubation weiter ab. Interessanterweise war am Ende der Beobachtungszeit in FaSSIF ein beachtlicher Anteil an 1,2-Diglyceriden übrig. Im FeSSIF war der Anfangsgehalt an 1,2-Diglyceriden geringer und über 50 % der gebildeten Diglyceride wurden weiter abgebaut. Dieses Ergebnis zeigt den langsameren Verdau der Emulsion unter nüchternen Bedingungen. Im Verlauf der Inkubation steigt die Konzentration der Monoglyceride langsam an, erreicht ihr Maximum

4. Ergebnisse und Diskussion

nach 60 Minuten und sinkt anschließend wieder ab (Abbildung 4.3-10 c und g). Auf Grund des verzögerten Abbaus der Diglyceride war der resultierende Anteil an Monoglyceriden in FeSSIF größer als in FaSSIF. Der Gehalt an freien Fettsäuren, bestimmt als Ölsäure, stieg über den ganze Zeitraum der Inkubation an (Abbildung 4.3-10 d und h). Diese Beobachtung beruht auf dem Abbau der einzelnen Lipidfraktionen und der damit verbundenen Freisetzung der korrespondierenden Fettsäuren.

Die Konzentrations-Zeit-Profile der Triglyceride sowie der zugehörigen Abbauprodukte der Emulsion mit Gallensalzen als Emulgator sind in Abbildung 4.3-11 dargestellt. Die Kurvenprofile sind vergleichbar mit denen der KE-Emulsion. Im Vergleich der Verdauresultate beider Emulsionen während der Inkubation in FaSSIF war der Abbau der Triglyceride bei der GSE-Emulsion schneller (Abbildung 4.3-11 a). Im Vergleich zur KE-Emulsion (Abbildung 4.3-10 a und b) wurden bei der GSE-Emulsion geringere mittlere Gehalte an Triglyceriden (Abbildung 4.3-11 a) und 1,2-Diglyceriden (Abbildung 4.3-11 b) ermittelt. Als Folge eines schnelleren Abbaus der 1,2-Diglyceride steigt der Gehalt an Monoglyceriden der GSE-Emulsion schneller an. Dies führt zu einer höheren mittleren Maximalkonzentration sowie zu einer höheren mittleren Endkonzentration als bei der KE-Emulsion. Der Anstieg des Gehalts an freien Fettsäuren der GSE-Emulsion (Abbildung 4.3-11 d) verlief schneller und die mittlere Endkonzentration war 31 % höher, verglichen mit der KE-Emulsion (Abbildung 4.3-10 d).

Im Vergleich der Resultate des Lipidverdaus beider Emulsionen im FeSSIF war der Abfall der Triglyceridkonzentration der GSE-Emulsion (Abbildung 4.3-11 e) vergleichbar mit der Inkubation der Emulsion in FaSSIF (Abbildung 4.3-11 a). Die mittlere Konzentration der 1,2-Diglyceride der GSE-Emulsion (Abbildung 4.3-11 f) lag im Vergleich zu der KE-Emulsion (Abbildung 4.3-10 f) bei einem geringeren Gehalt. Dies zeigt einen schnelleren Verdauverlauf der GSE-Emulsion. Als Konsequenz stieg der Gehalt an Monoglyceriden (Abbildung 4.3-11 g) und freien Fettsäuren der GSE-Emulsion (Abbildung 4.3-11 h) schneller an. Der mittlere Endgehalt der freien Fettsäuren (Abbildung 4.3-11 h) von der GSE-Emulsion lag 19 % höher im Vergleich zur KE-Emulsion (Abbildung 4.3-10 h). Durch den Vergleich der Kurvenverläufe ist ein schnellerer Lipidabbau der GSE-Emulsion ersichtlich.

Der Unterschied im Ergebnis des Lipidverdaus zwischen FaSSIF und FeSSIF beruht auf unterschiedlichen Konzentrationen an gebildeten Mischmizellen. Diese setzen sich aus den Gallensalzen und den Phospholipiden des Mediums zusammen. Da die Konzentration beider Komponenten in FaSSIF geringer ist, ist auch die Konzentration der gebildeten Mischmizellen in FaSSIF geringer. Die gebildeten Mischmizellen entfernen die enzyminhibierenden Substanzen, die freien Fettsäuren und die Monoglyceride, von der Grenzfläche Wasser / Lipid ¹³⁴. Da die Anteile an Gallensalzen und Phospholipiden in FeSSIF höher sind, ist der Lipidverbau von beiden eingesetzten Emulsionen in diesem

4. Ergebnisse und Diskussion

Medium schneller. Diese Erkenntnisse werden durch die Arbeit von Zangenberg *et al.* bestätigt, welche einen Anstieg der Lipolyse mit einem zeitgleichen Anstieg der Gallensalzkonzentration zeigt ¹⁴⁵.

Monoglyceride und freie Fettsäuren stellen die Endprodukte des Lipidverdaus *in vivo* dar und werden von der Mucosa adsorbiert ¹⁴⁶ bevor sie zu Triglyceriden resynthetisiert werden ¹⁴⁷. Auf Grund dieser Tatsache müsste die Konzentration der Monoglyceride während des *in vitro* Lipidverdaus ein konstantes Level erreichen. Allerdings ist ein Abfall des Gehalts an Monoglyceriden ersichtlich (Abbildung 4.3-10 c und g sowie Abbildung 4.3-11 c und g). Dieses Ergebnis ist mit dem Auftreten der Acylwanderung während des *in vitro* Verdaus zu erklären. Die pankreatische Lipase (aus Schweinepankreas isoliert) hydrolysiert Triglyceride regiospezifisch in sn-1 und sn-3 Position. Fettsäurereste in sn-2 Position werden nicht hydrolysiert. Während der *in vitro* Inkubation kann der Fettsäurerest der sn-2 Position spontan intramolekular auf die sn-1 Position übergehen ¹⁴⁸. Das daraus resultierende 1-Monoglycerid wird durch die Lipase in Glycerol und die korrespondierende freie Fettsäure gespalten ^{134,149,150}.

Emulgatoren haben einen Einfluss auf den Verdauprozess ^{134,151}. Der Konjugatemulgator, der in der KE-Emulsion verwendet wurde, hat eine dreidimensionale Struktur im Vergleich zu der planaren Struktur der verwendeten Gallensalze der GSE-Emulsion. Als Konsequenz ist der Prozess des Angriffs des Lipase / co-Lipase-Komplexes an die Grenzfläche lipophil / hydrophil bei der KE-Emulsion sterisch gehindert. Während des Verdauprozesses forcieren die Gallensalze des Verdaumediums diesen Prozess durch die Verdrängung des eigentlichen Emulgators von der Grenzfläche ¹⁵¹. Dadurch ist der Angriff des Lipase / co-Lipase-Komplexes beschleunigt. Durch den Einsatz von Gallensalzen als Emulgator in der GSE-Emulsion wird dieser Prozess übersprungen. Der Verdauprozess ist dadurch beschleunigt ^{134,151,152}.

Kleinere Emulsionstropfen haben eine größere spezifische Oberfläche im Vergleich zu großen Tropfen. Als Konsequenz haben kleine Emulsionstropfen eine größere Bindungsfläche für den Lipase / co-Lipase-Komplex ¹³⁴. Auch wenn die Tropfen der GSE-Emulsion 2,5-fach größer waren als die der KE-Emulsion (s. Abbildung 4.3-5), beeinflusste dies den Verdauprozess der beiden untersuchten Doppelemulsionen nicht. In der Literatur ist ein Einfluss der Tropfengröße auf den Verdauprozess beschrieben ^{153,154}. Gleichwohl ist das Verhältnis der Tropfengrößen bei den untersuchten Emulsionen bei Armand *et al.* ¹⁵³ (bis zu zehnfach) und bei Torkele-Gómez *et al.* ¹⁵⁴ (vierfach) größer als bei den beiden in dieser Arbeit untersuchten Doppelemulsionen. Schlussfolgernd ist der schnellere Lipidverdaus der GSE-Emulsion auf die verwendeten Gallensalze als Emulgator und weniger auf den Einfluss der Tropfengröße bzw. der spezifischen Oberfläche zurückzuführen.

Die Bestimmung der Tropfengröße der beiden Emulsionen während des Versuches war nicht

4. Ergebnisse und Diskussion

möglich. Die Versuchsansätze enthielten zu viele störende Aggregate aus Enzym und überschüssigen Ionen. Eine weitere Emulgierung während der simulierten gastrointestinalen Inkubation ist unwahrscheinlich, da die Scherkräfte des End-over-End-Mischers wesentlich schwächer sind als die Kräfte, die während des Herstellungsprozesses auf die Emulsionen einwirken.

Die verwendete *in vitro*-Methode zur Simulation des Lipidverdaus im Darm ist vergleichbar zu *in vivo*-Bedingungen, da die Emulgierkräfte im Darm wesentlich geringer als im Magen sind¹⁵³. Diese vergleichsweise geringen Scherkräfte des Dünndarms simuliert der verwendete End-over-End-Mischer gut.

Für die Bestimmung der Genauigkeit der Methode haben Rübe *et. al.* und Sek *et. al.* den totalen Lipidumsatz des Experimentes nach Gleichung 10 berechnet^{97,155}:

$$3 * [TG_{\text{übrig}}] + 2 * [DG_{\text{gebildet}}] + [MG_{\text{gebildet}}] + [FA_{\text{gebildet}}] = [FA_{\text{Blindwert}}] + 3 * [TG_{\text{initial}}] \quad (10)$$

Gleichung 10 basiert auf der Annahme, dass 1 Mol Triglycerid 3 Mol Fettsäuren bzw. 1 Mol 1,2-Diglycerid 2 Mol sowie 1 Mol Monoglycerid 1 Mol Fettsäure entsprechen. TG_{initial} ist die Konzentration jeder Probe vor der Enzymzugabe (Zeit: 0 Minuten). Der Wert der Triglyceride wurde als 100 % gesetzt. $FA_{\text{Blindwert}}$ wurde aus dem Ansatz des puren Verdaumediums ohne Emulsionszugabe bestimmt. Der Gehalt an freien Fettsäuren dieser Probe resultiert aus dem Verdau der in den Medien enthaltenen Phospholipiden. Die Wiederfindungsrate der KE-Emulsion in FaSSIF lag zwischen 97 % und 109 % und in FeSSIF zwischen 92 % und 137 %. Die GSE-Emulsion zeigte gleiche Resultate. Die Wiederfindungsrate in FaSSIF lag bei 99 % und 110 % und in FeSSIF zwischen 97 % und 122 %. Die Abweichungen sind auf eine steigende densitometrische Empfindlichkeit der einzelnen Lipidderivate zurückzuführen. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Resultaten von Rübe *et. al.* und Sek *et. al.* und zeigen, dass die Versuche genau waren.

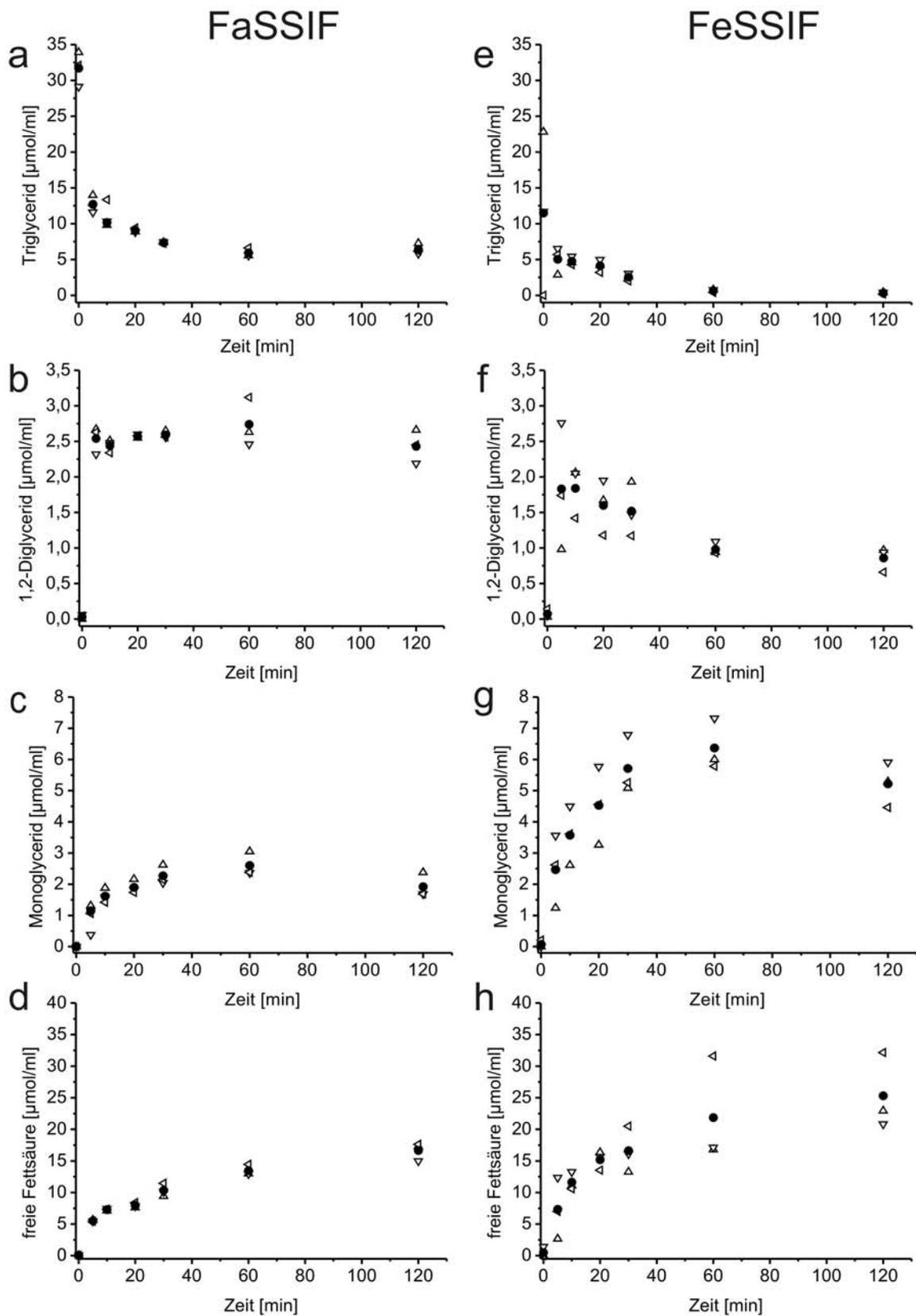


Abbildung 4.3-10 Ergebnisse des Lipidverbaus (a, e = Triglycerid; b, f = 1,2-Diglycerid; c, g = Monoglycerid; d, h = freie Fettsäuren) einer $W_1/O/W_2$ -Doppelmulsion mit Protein-Polysaccharid-Konjugatemulgator in FaSSIF und FeSSIF: ● = arithmetisches Mittel von drei Proben = ◁, △, ▽, (n = 3).

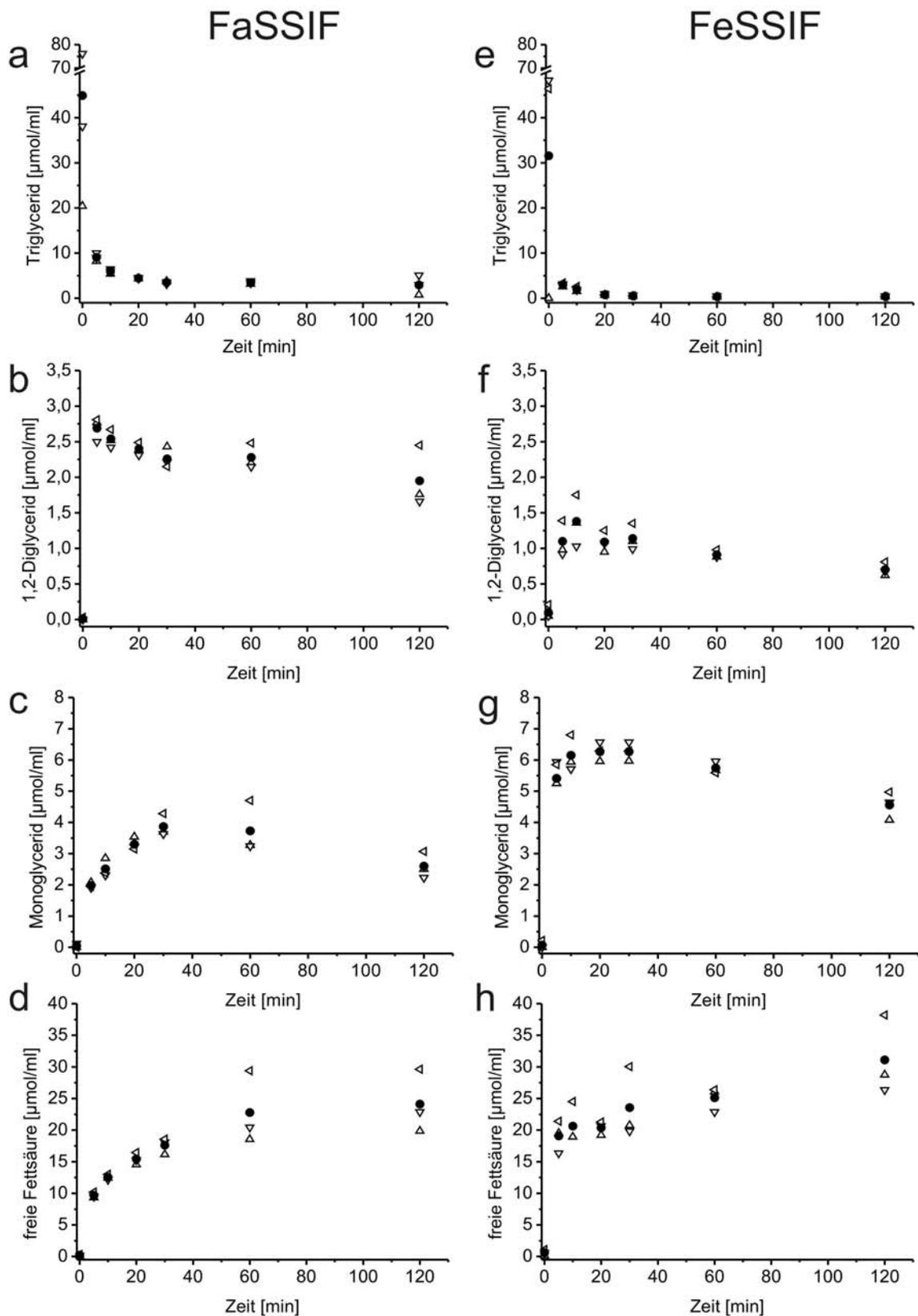


Abbildung 4.3-11 Ergebnisse des Lipidverbaus (a, e = Triglycerid; b, f = 1,2-Diglycerid; c, g = Monoglycerid; d, h = freie Fettsäuren) einer $W_1/O/W_2$ -Doppелеmulsion mit Gallensalzen als Emulgator in FaSSIF und FeSSIF: ● = arithmetisches Mittel von drei Proben = ◁, ▷, (n = 3).

4.4 Vergleich Lipidmikrokapseln und Kapselsysteme aus dem Cluster

Das Ziel der Freisetzungsuntersuchungen war es, die mit HBE beladenen Kapselsysteme hinsichtlich deren Anthocyanfreisetzung zu charakterisieren. Dafür wurden die Kapselsysteme, den physiologischen Weg der Nahrung imitierend, in SGF (Simulation für den Magen) und FeSSIF (Simulation für den Dünndarm) inkubiert. Alle untersuchten Kapselsysteme zeigen in beiden Inkubationsmedien eine Freisetzung der verkapselten Anthocyane. In SGF (s. Abbildung 4.4-1 a) ist eine nahezu vollständige Freisetzung der Anthocyane nach 60 Minuten zu beobachten. Die freigesetzten Anthocyane bleiben auf Grund des niedrigen pH-Wertes stabil (s. Kapitel 2.1). Die entwickelten Lipidmikrokapseln zeigen im Vergleich mit den Kapselsystemen aus dem Cluster eine leicht verzögerte Freisetzung zu Beginn der Inkubation. Dies ist auf das Aufschmelzen der Lipidhülle zurückzuführen. Durch eine vergleichsweise schnelle Magenpassage von Mikrokapseln gegenüber größeren monolithischen Arzneiformen ist die Magenpassagezeit der Kapselsysteme kürzer als die Inkubationsdauer (s. Kapitel 4.3.1). Da die Anthocyane aus pharmakologischer Sicht nicht im Magen freigesetzt werden sollen (s. Kapitel 2.1), zeigen die LMK bedingt durch die verzögerte Anthocyanfreisetzung im SGF ein günstigeres Freisetzungsverhalten als die übrigen drei Kapselsysteme.

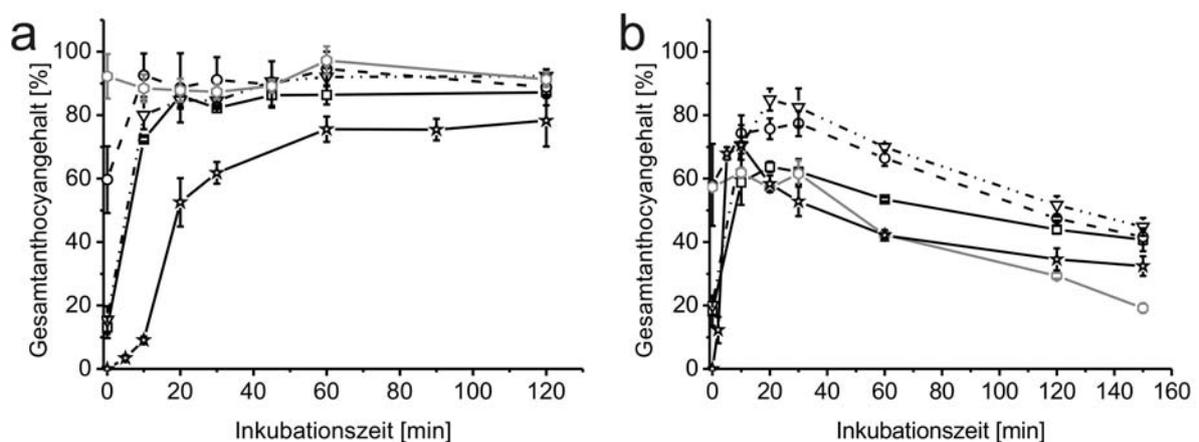


Abbildung 4.4-1 Vergleich der Freisetzungsprofile aller analysierten Kapselsysteme (System AP (□), System MP (○), System SL (▽), System LMK (☆), unverkapselter HBE (◇)) in: a) SGF und b) FeSSIF.

Im Vergleich der Anthocyanfreisetzung der untersuchten Kapselsysteme in FeSSIF (s. Abbildung 4.4-1 b) zeigen alle vier Systeme eine rasche Freisetzung innerhalb der ersten 20 Minuten. Der anschließende Abfall der Anthocyankonzentration ist auf Abbauprozesse der Anthocyane zurückzuführen. In diesem Bereich des Freisetzungsprofils werden überlagerte Freisetzungs- und Abbauprozesse der Anthocyane angenommen, da die Gesamtanthocyankonzentration vor dem Abfall der Anthocyankonzentration nicht den

4. Ergebnisse und Diskussion

100 %-Wert erreicht hat. Der Abbauprozess ist durch die Instabilität des Flavylumkations bei den im Dünndarm vorherrschenden physiologischen pH-Werten zurückzuführen (s. 2.1). Alle vier Kapselsysteme sind nicht in der Lage, die Anthocyane über einen längeren Zeitraum als 20 Minuten zurückzuhalten. Dennoch ist die mittlere Gesamtanthocyankonzentration der untersuchten Kapselsysteme am Ende der Inkubation um etwa $21 \pm 3\%$ höher als bei reinem, unverkapseltem HBE. Dies zeigt, dass alle untersuchten Kapselsysteme trotz der schnellen Freisetzung einen Schutz für die inkorporierten Anthocyane vor vorzeitigem Abbau im Dünndarm bilden.

Bedingt durch die vollständige Freisetzung der verkapselten Anthocyane im SGF wurden die Kapselsysteme nicht in FeSSIF übertragen. Beide Inkubationsprozesse sind *in vitro*-Simulationen. *In vivo* auftretende Absorptionsprozesse, die einen Einfluss auf das Freisetzungs- und Abbauverhalten haben, sind bei diesem experimentellen Design nicht berücksichtigt. Ein weiterer beeinflussender Faktor ist die Präsenz von Lipiden beim LMK-System. Durch diese können ebenfalls Abbau- und Absorptionsprozesse modifiziert sein. Aufschluss über das vollständige Aufschmelzen dieses Kapselsystems hätte eine lichtmikroskopische Analyse des Inkubationsmediums nach Beendigung der LMK-Inkubation gegeben. Bedingt durch die Zusammensetzung war das FeSSIF-Medium sehr trüb. Eine mikroskopische Betrachtung der Kapselsysteme nach erfolgter Inkubation war daher nicht möglich.

4.5 Rheologische Untersuchungen von Molkenproteingelen

Während der Entwicklungsphase des MP-Kapselsystems (TU München Weihenstephan) wurden Molkenproteingele mit verschiedenen Konzentrationen und pH-Werten eingesetzt. Um die thermische Belastung der zu verkapselten Anthocyane während des Verkapselungsprozesses (s. Kapitel 3.2.3) so gering wie möglich zu halten, sollten die Sol / Gel-Übergänge der MPI-Ausgangslösungen charakterisiert werden. Für diese Charakterisierung wurden vier MPI-Lösungen mit unterschiedlichen MPI-Konzentrationen und pH-Werten (Tabelle 4.5-1) untersucht. Diese Charakterisierung wurde mit drei unterschiedlichen Analysemethoden durchgeführt:

- der Gefäß-Wasserbad-Methode für Voruntersuchungen um den Sol / Gel-Übergangsbereich einzugrenzen,
- die Oszillierende Rheologie zur Bestätigung der Voruntersuchungen und zur genaueren Charakterisierung des Sol / Gel-Übergangs,
- der Benchtop-NMR (BT-NMR) für nichtinvasive T_2 -Relaxationszeitmessungen um Mikroviskositäten der MPI-Gele zu ermitteln.

Die aus den vorgegebenen MPI-Lösungen gebildeten Gele wurden anschließend mittels Texture Analyzer auf ihre Elastizität untersucht.

Tabelle 4.5-1 Übersicht über die Konzentrationen der untersuchten MPI-Lösungen und deren resultierende pH-Werte. Die gekennzeichnete Lösung mit 20 % (m/m) MPI bei pH 1,5 wurde nicht untersucht, da diese bereits bei RT hochviskos war.

| MPI-Gehalt [% (m/m)] | pH-Wert |
|-------------------------|---------|
| 15 | 1,5 |
| 15 | 6,8 |
| 20 | 1,5 |
| 20 | 6,8 |

Die Herstellung der untersuchten MPI-Lösungen ist im Kapitel 3.3.4 beschrieben. Die 20%ige MPI-Lösung pH 1,5 war bei RT bereits hochviskos und konnte nicht genau in die entsprechenden Probengefäße abgefasst werden. Auf Grund dessen wurden mit den ausgewählten Methoden für diese Lösung keine Sol / Gel-Übergänge bestimmt.

4.5.1 Gelierungsmechanismus von Molkenproteinisolat

Nach der Definition des Arzneibuchs ist ein Gel eine mit Hilfe eines Quellmittels gelierte Flüssigkeit. Bei dieser Definition wird zwischen Hydrophilen (Flüssigkeit = Wasser, Glycerol oder Propylenglycol) und Lipophilen (Flüssigkeit = dickflüssiges Paraffin, fette Öle) Gelen

4. Ergebnisse und Diskussion

unterschieden⁷⁰. Die generierten MPI-Gele entsprechen nicht dieser Definition, da das MPI im nativen Zustand kein Quellmittel darstellt. Erst durch den Eintrag von Energie in Form von Wärme denaturieren die Molkenproteine und bilden dadurch das dreidimensionale Gelnetzwerk aus. Im MPI ist β -Lactoglobulin (β -Ig) der für die Gelbildung verantwortliche Proteinanteil. Bei Raumtemperatur liegt β -Ig im Bereich zwischen pH 5 bis pH 7 als ein, durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiertes, Dimer vor (M_w : 36,6 kDa). Das monomere β -Lactoglobulin besteht aus 162 Aminosäuren und ist durch seine antiparallele β -Faltblattstrukturen sowie zwei Disulfidbrücken (Cys₁₀₆-Cys₁₁₉ und Cys₆₆-Cys₁₆₀) und eine freie Thiolgruppe (Cys₁₂₁) charakterisiert¹⁵⁶. Bei neutralen pH-Werten weist es amphotere Eigenschaften auf.

Der Denaturierungsprozess des gelösten MPI verläuft in zwei aufeinanderfolgenden Schritten. Während des ersten Schrittes wird die β -Faltblattstruktur des β -Ig durch Erhitzen entfaltet. Dadurch wird die im nativen, gefalteten Zustand im Inneren der Struktur verborgene Thiolgruppe (Cys₁₂₁) nach außen gekehrt. Die freiliegende Thiolgruppe begünstigt die sich im zweiten Schritt bildenden Disulfidbrücken, wodurch sich Hetero-Oligomere zwischen den entfalteten β -Ig und α -la Molekülen bilden. Die in den Oligomeren vorherrschenden Bindungskräfte sind, neben den hauptsächlich vorkommenden inter- und intramolekularen Disulfidbrücken, hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen^{157,158}. Die beiden letztgenannten Bindungsarten stellen, verglichen mit den entstehenden Disulfidbrücken, schwache Bindungskräfte dar. Die sich auf diese Weise bildenden Oligomere schließen sich zu Aggregaten zusammen und bilden dadurch das Hydrogelgerüst¹⁵⁹. Bei neutralen pH-Werten um pH 7 bilden sich fraktale Aggregate¹⁵⁸.

β -Lactoglobulin ist ungewöhnlich stabil gegenüber Säuren, was durch Studien der β -Faltblattstruktur bei pH 2 und pH 7 nachgewiesen wurde¹⁶⁰. Bedingt durch die sinkende Reaktivität der Thiolgruppen bei sauren im Gegensatz zu basischen pH-Werten unterscheidet sich der Gelbildungsmechanismus des β -Ig bei sauren pH-Werten von dem oben beschriebenen im neutralen bis basischen pH-Milieu. Auch im sauren Milieu entfaltet sich β -Ig durch die Einwirkung von Wärme. Im Anschluss daran bilden sich jedoch keine kovalenten Bindungen an der Thiolgruppe (Cys₁₂₁) aus. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den entfalteten β -Ig Monomeren treten in diesem pH-Milieu (pH < 3) ebenfalls nicht auf, da die β -Ig Monomere einen Überschuss an sich abstoßenden positiven Ladungen tragen (21 pro Monomereinheit). Rein physikalische Bindungen (hydrophobe- bzw. Wasserstoffbrückenbindungen) halten die sich bildenden Oligomere zusammen^{159,161}. Als Konsequenz dieser Bedingungen werden große, fibrilläre Aggregate gebildet (M_w bis 10^7 Da)¹⁶¹. Die Grundlage für die Bildung derartig gestreckter Aggregate ist die Annahme, dass bei pH 2 die Anlagerung neuer β -Ig Moleküle an die bereits entstandenen, fibrillären Oligomere einfacher ist als der Zusammenschluss zweier sich abstoßender Monomere¹⁶¹.

4. Ergebnisse und Diskussion

Als beeinflussende Faktoren auf den durch Wärme induzierten Gelierungsprozess von β -Ig wurden hauptsächlich die MPI-Konzentration und der pH-Wert der Lösungen beschrieben¹⁶². Die in dieser Arbeit untersuchten Sol / Gel-Übergänge von MPI-Lösungen in dem stark sauren pH-Milieu von 1,5 wurden bisher noch nicht untersucht.

4.5.2 Gefäß-Wasserbad-Methode

Um den Bereich der Gelbildungstemperatur der Proben eingrenzen zu können, wurde die Gefäß-Wasserbad-Methode angewendet¹⁶³. Die ermittelten Temperaturen für die Sol / Gel-Übergänge der drei MPI-Lösungen sind in Tabelle 4.5-2 dargestellt.

Tabelle 4.5-2 Mittels Gefäß-Wasserbad-Methode ermittelte Sol / Gel-Übergangstemperaturen der drei untersuchten MPI-Lösungen

| | 15 % pH 1,5 | 15 % pH 6,8 | 20 % pH 6,8 |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| Temperatur [°C] | 61 ± 1 | 69 ± 1 | 67 ± 2 |

Die Gelierung der Probe lief nach dem in Kapitel 4.5.1 beschriebenen Mechanismus ab. Zwischen den beiden Proben mit dem schwach sauren pH-Wert von pH 6,8 besteht ein, bei diesem Versuchsdesign, vernachlässigbarer Unterschied in der Gelierungstemperatur von etwa 2 °C. Die ermittelten Werte entsprechen den in der Literatur angegebenen, die besagen, dass β -Ig im pH-Bereich von 2 - 13 ab 60 °C geliert^{157,158}.

Im Vergleich der beiden verschiedenen pH-Werte der 15%igen MPI-Proben ist ein Unterschied des Sol / Gel-Übergangs von 8 °C zu erkennen. Dieser Temperaturdifferenz liegen die unterschiedlichen Bindungsmechanismen der Molkenproteine bei den vorliegenden pH-Werten zugrunde (s. Kapitel 4.5.1). Durch die Stabilisierung der Thiolgruppen im stark sauren Milieu sind diese nicht an den Bindungen des 15%igen Gels pH 1,5 beteiligt. Die sich bei pH 6,8 ausbildenden Disulfidbindungen werden erst ab einer Temperatur von 63 °C generiert¹⁶⁴. Eine Gelierung dieses Gels ist daher erst ab dieser Temperatur möglich. Bei dem 15%igen Gel pH 1,5 findet die Gelbildung bereits bei 61 °C statt. Auf Grund des niedrigeren pH-Wertes herrscht eine hohe Nettoladung vor. Dadurch kann sich das Gelgerüst schneller ausbilden.



Abbildung 4.5-1 MPI-Lösungen (bei RT) mit den daraus entstandenen MPI-Gelen (nach Erhitzen) bei unterschiedlichen Konzentrationen und pH-Werten. Die 20%ige Probe pH 1,5 war bei RT bereits gelartig fest.

Aus Abbildung 4.5-1 ist ersichtlich, dass die hergestellten MPI-Lösungen im Solzustand keine klaren, sondern leicht trübe Flüssigkeiten sind. Diese Trübung war bei den Proben mit pH 6,8 stärker als bei der auf pH 1,5 angesäuerten Probe. Diese Erscheinung beruht auf den bei den vorherrschenden pH-Werten von pH 6,8 geringeren elektrostatischen Abstoßungskräften, da die Proben näher am IEP von β -Ig liegen (IEP: 5,1) und somit weniger Nettoladungen im MPI Molekül vorhanden sind. Die einzelnen Moleküle stoßen sich dadurch nicht so stark ab und neigen zu Aggregatbildungen. Folglich sinkt die Löslichkeit der Proteine, die mit der Trübung der Probe einhergeht ¹⁶⁵.

4.5.3 Oszillierende Rheologie

Um die mittels Gefäß-Wasserbad-Methode erhaltenen Daten über die Lage der Sol / Gel-Übergangstemperaturen der untersuchten MPI-Lösungen zu bestätigen wurden oszillierende Messungen mit einer Kegel-Platte-Anordnung durchgeführt. Dabei wurden die Speicher- (G') und Verlustmodule (G'') während der Gelbildung der Proben ermittelt. Die beiden rheologischen Messwerte G' und G'' charakterisieren die Deformationsenergie eines Systems. G' ist die gespeicherte Deformationsenergie, die nach der Scherung in die Rückbildung des Systems eingeht. G'' ist ein Maß für die während des Prozesses verlorene Deformationsenergie. Diese Energie wird bei der Scherung der Probe verbraucht, da sich beispielsweise das Probenmaterial erhitzt oder die Umgebung erwärmt. G' steht somit für das elastische Verhalten der Probe, wohingegen G'' das viskose Verhalten der Probe darstellt ¹⁶⁶.

In Abbildung 4.5-2 a-c sind die ermittelten Werte von G' und G'' in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen. Die unterschiedlichen Ausgangswerte der beiden Parameter der untersuchten MPI-Lösungen bei 25 °C sind in Tabelle 4.5-3 dargestellt.

Tabelle 4.5-3 Übersicht über die Startwerte von G' und G'' zu Beginn der rheologischen Untersuchungen bei 25 °C (entnommen aus Abbildung 4.5-2).

| | 15 % pH 1,5 | 15 % pH 6,8 | 20 % pH 6,8 |
|------------|-------------|-------------|-------------|
| G' [Pa] | 0,003 | 0,765 | 29,220 |
| G'' [Pa] | 0,079 | 0,554 | 9,087 |

Die Werte für G' und G'' zeigen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Proben. Aus diesen Daten werden die unterschiedlichen Viskositäten der drei untersuchten Lösungen bei 25 °C deutlich. Besonders deutlich wird dieser Unterschied im Vergleich der 15%igen Probe mit den pH-Werten pH 1,5 und pH 6,8. Das Speichermodul variiert um den Faktor 250 und das Verlustmodul um den Faktor 38. Der größere Wert von G' und G'' bei dem Gel pH 6,8 ist ein Indiz für die Elastizität der aus den Solen entstehenden Gele (s. Kapitel 4.5.5).

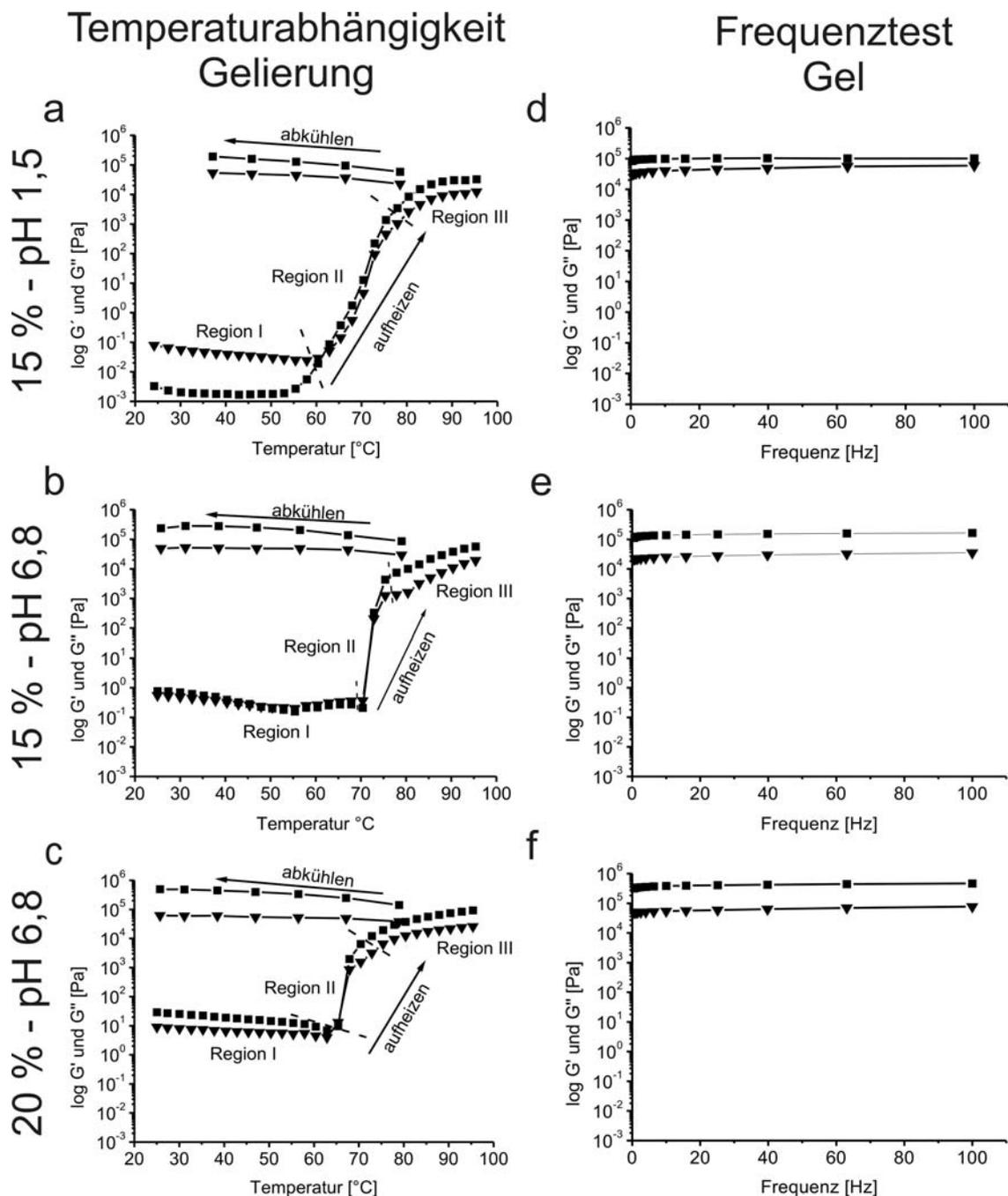


Abbildung 4.5-2 Temperatur- und frequenzabhängige Änderung des Speicher- ($G' = \blacksquare$) und Verlustmodulus ($G'' = \blacktriangledown$) von MPI-Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen und pH-Werten: a) und d) = 15 % (m/m) pH 1,5, b) und e) = 15 % (m/m) pH 6,8, c) und f) = 20 % (m/m) pH 6,8

Die Kurven lassen sich in drei Regionen einteilen: Region I: flüssiges Verhalten der Probe, Region II: schnelle Gellierung und Region III: langsame Gellierung¹⁶⁷. Diese drei Regionen sind bei allen drei Kurven zu erkennen.

Normalerweise gilt $G' < G''$ in Region I. Dies steht für ein flüssiges Verhalten der Probe. Dies ist für die 15%igen Probe pH 1,5 zutreffend (Abbildung 4.5-2 a). Die beiden übrigen Proben zeigen ein anderes Verhalten (Abbildung 4.5-2 b und c). Bei der 15%igen Probe pH 6,8 ist

4. Ergebnisse und Diskussion

$G' \geq G''$ und bei der 20%igen Probe pH 6,8 ist $G' > G''$. Derartige Phänomene sind für β -Ig in der Literatur beschrieben und wurden damit begründet, dass diese Sole bereits unterhalb ihres Gelpunktes auf Grund von Aggregationseffekten strukturiert vorliegen¹⁶⁸. Bei der 15%igen Probe mit pH-Wert von pH 1,5 liegt dies auf Grund des pH-Wert Einflusses auf die Gelierung nicht vor (s. Kapitel 4.5.1). In allen drei Fällen sinken G' und G'' zu Beginn mit steigender Temperatur ab. Dies ist ein Indikator für viskoelastisches Verhalten der Sole¹⁶⁹. Es bilden sich Proteinpräzipitate¹⁷⁰.

In Region II liegt der Schnittpunkt der Kurven von G' und G'' . Dieser Schnittpunkt markiert den Sol / Gel-Übergangspunkt¹⁶⁹. Die Werte von G' und G'' steigen mit zunehmender Temperatur rapide an. Es bildet sich das Gelnetzwerk aus. Dieser Schnittpunkt ist bei allen drei Kurven in Region II zu erkennen.

In Region III ist bei allen drei Proben $G' > G''$. Dies zeigt, dass ein elastisches Gelnetzwerk gebildet wurde¹⁶⁹. Ein weiteres Indiz für die Bildung starker Gelnetzwerke ist der stärkere Anstieg von G' gegenüber G'' ¹⁰⁹. Der im Vergleich zur Region II flacher verlaufende Anstieg von G' und G'' kennzeichnet, dass die Gelierung in dieser Region langsamer verläuft¹⁷⁰.

Um die Irreversibilität des Gelbildungsprozesses zu verdeutlichen, wurden G' - und G'' -Werte bei der Abkühlung der gebildeten Gele aufgezeichnet (s. Abbildung 4.5-2 a-c). Bei allen drei Proben sind die Werte für G' und G'' nahezu konstant geblieben und nicht wieder abgesunken. Dies zeigt die Irreversibilität der Gelbildung¹⁷⁰.

Nach dem Abkühlen der Gele auf 25 °C wurde die Temperatur des Systems bei diesem Wert konstant gehalten. Dabei wurde die Abhängigkeit von G' und G'' von der Frequenz aufgezeichnet. Die Daten sind in Abbildung 4.5-2 d - f aufgetragen. Die Werte von G' und G'' aller generierten Gele bleiben nahezu konstant. Diese Ergebnisse erklären ebenfalls das konstante Relaxationsverhalten und damit die Stärke der generierten β -Ig Gele.

Tabelle 4.5-4 Mittels oszillierender Rheologie ermittelte Sol / Gel-Übergangstemperaturen der drei untersuchten MPI-Lösungen

| | 15 % pH 1,5 | 15 % pH 6,8 | 20 % pH 6,8 |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| Temperatur [°C] | 57 ± 4 | 71 ± 1 | 68 ± 2 |

Die Resultate der Gelbildungstemperaturen (s. Tabelle 4.5-4) zeigen, dass der Einfluss der Konzentration auf die Gelbildungstemperatur der untersuchten Proben wesentlich geringer ist als der des pH-Wertes. Die MPI-Lösung mit einem sauren pH-Wert von pH 1,5 hat eine deutlich verringerte Gelbildungstemperatur als die Proben mit dem pH-Wert von pH 6,8.

4.5.4 Benchtop-NMR (BT-NMR)

Im Unterschied zu den in den beiden vorherigen Kapiteln beschriebenen Methoden ist es möglich, mit BT-NMR genauere Aussagen über den Sol / Gel-Übergang eines Systems in Abhängigkeit von der Temperatur zu treffen, da hier nicht nur Makroviskositäten sondern lokale Beweglichkeiten in den Gelen bestimmt werden.

Die Benchtop-NMR ermöglicht die Messungen von Protonenspins. Für Strukturaufklärungen ist die Auflösung auf Grund der ungenügenden Magnetfeldstabilität zu niedrig. Im Grundzustand sind die Spins der Protonen inhomogen verteilt. Dadurch ist das resultierende magnetische Moment der Probe nahe Null. Erst durch das Anlegen eines externen Magnetfeldes B_0 werden die Spins entlang des angelegten Feldes ausgerichtet. Allgemein beschreibt die Relaxationszeit eines Kernspins die Verweildauer in einem angeregten Zustand. Um in einen energetisch günstigeren Zustand zu gelangen geben die Spins während dieser Zeit Energie an ihre Umgebung (T_1 - Spin-Gitter-Relaxationszeit) oder die benachbarten Spins (T_2 - Spin-Spin-Relaxationszeit) ab. Die T_1 -Relaxationszeit beschreibt exponentiell die Zeit nach der Anregung der Spins, die benötigt wird um die thermodynamisch günstigere Längsmagnetisierung (in Richtung des angelegten Magnetfeldes B_0) einer Probe wiederherzustellen¹⁰⁸. Die überschüssige Resonanzenergie wird an das Gitter abgegeben. Auf Grund dessen hängt die T_1 -Relaxationszeit von der Makroviskosität und Dichte der Probe ab. Weitere Einflussfaktoren sind die NMR-Frequenz sowie die vorgegebene Feldstärke¹⁷¹. Im Gegensatz dazu beschreibt die T_2 -Relaxationszeit den Abfall des NMR Signals nach erfolgter Quermagnetisierung (90 °Impuls). T_2 hängt von der magnetischen Interaktion der Protonen untereinander ab. Diese ist ein Maß, wie stark die Protonen untereinander koppeln. Die T_2 -Relaxationszeit richtet sich nach den physikalischen Eigenschaften der Probe, wie der Dichte und der Viskosität, sowie der Stärke des magnetischen Feldes¹⁷¹. Durch die Ermittlung von T_2 -Relaxationszeiten können die dynamischen Eigenschaften der Protonen des Lösungsmittels mit deren Umgebung aufgezeigt werden. Diese Eigenschaften wurden in der Pharmazie bereits genutzt um die Sol / Gel-Übergänge von Chitosangelen und bolaamphiphilen Lipiden zu untersuchen^{171,172}. Es existieren ebenfalls bereits Studien über die T_2 -Relaxationszeiten von β -Ig^{173,174}. Diese wurden jedoch nicht mit auf pH 1,5 angesäuerten Proben durchgeführt.

Während der Gelbildung wird das Lösungsmittel, im Falle der MPI-Lösungen das Wasser, im Gelnetzwerk gebunden. Dadurch ändert sich im Laufe des Sol / Gel-Übergangs der untersuchten MPI-Lösungen die Beweglichkeit der Protonen des Lösungsmittels. Durch die Bestimmung der T_2 -Relaxationszeiten des Wassers kann diese Immobilisierung der Protonen, also der Unterschied zwischen frei beweglichem und durch die Gelbildung gebundenem Wasser, ermittelt werden^{173,174}. Im Solzustand haben die Protonen des Lösungsmittels freie Beweglichkeit. Die T_2 -Relaxationszeit ist daher, verglichen mit dem

4. Ergebnisse und Diskussion

Gelzustand, hoch (s. Tabelle 4.5-5). Mit zunehmender Viskosität der MPI-Lösung sinkt die Beweglichkeit der Protonen des Lösungsmittels. Daraus folgend sinkt die T_2 -Relaxationszeit der Probe ab (s. Tabelle 4.5-5). Die genannten T_2 -Relaxationszeiten für den Solzustand sind im Vergleich zu reinem Wasser (T_2 : 2500 ms) jedoch niedrig. Die Beweglichkeit der Wassermoleküle in den untersuchten MPI-Lösungen ist durch vorherrschende Dipol-Dipol-Interaktionen bereits erheblich eingeschränkt ¹⁷⁵.

Tabelle 4.5-5 Übersicht über die T_2 -Relaxationszeiten der MPI-Lösungen sowie der daraus gebildeten Gele bei 25 °C (entnommen aus Abbildung 4.5-3)

| | 15 % pH 1,5 | 15 % pH 6,8 | 20 % pH 6,8 |
|----------------|-------------|-------------|-------------|
| T_2 Sol [ms] | 400 | 470 | 210 |
| T_2 Gel [ms] | 140 | 80 | 45 |

In Abbildung 4.5-3 sind ausgewählte Kurvenverläufe des BT-NMR Temperaturprogramms dargestellt. Der Anstieg der T_2 -Relaxationszeit zu Beginn der Messung der 15%igen (m/m) Probe pH 1,5 (s. Abbildung 4.5-3 a) ist ein normales Arrhenius Phänomen. Hierbei gibt es Änderungen der T_2 -Relaxationszeit durch intra- und intermolekulare Dipol-Dipol-Wechselwirkungen ¹⁷⁵. Durch den Energieeintrag der Wärme kommen die Protonen des Lösungsmittels stärker in Bewegung, wodurch die T_2 -Relaxationszeit steigt. Dieser Anstieg von T_2 indiziert, dass in dem Temperaturbereich zwischen 40 °C bis 55 °C die Viskosität der Probe nicht steigt. Ab einer bestimmten Temperatur nimmt die T_2 -Relaxationszeit der Probe rapide ab. Dies ist durch die steigende Viskosität, d. h. die verstärkte Interaktion der Protonen mit den Hydroxylgruppen der Proteine, bedingt. Diese Prozesse überlagern die schwachen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen ¹⁷⁵. Das Wasser wird fest im Gelnetzwerk gebunden. Dadurch werden die Protonen des Lösungsmittels immobilisiert. Die Beweglichkeit der Protonen des Wassers ist damit eingeschränkt. Ist das Gelnetzwerk komplett ausgebildet, bleibt die T_2 -Relaxationszeit daher konstant.

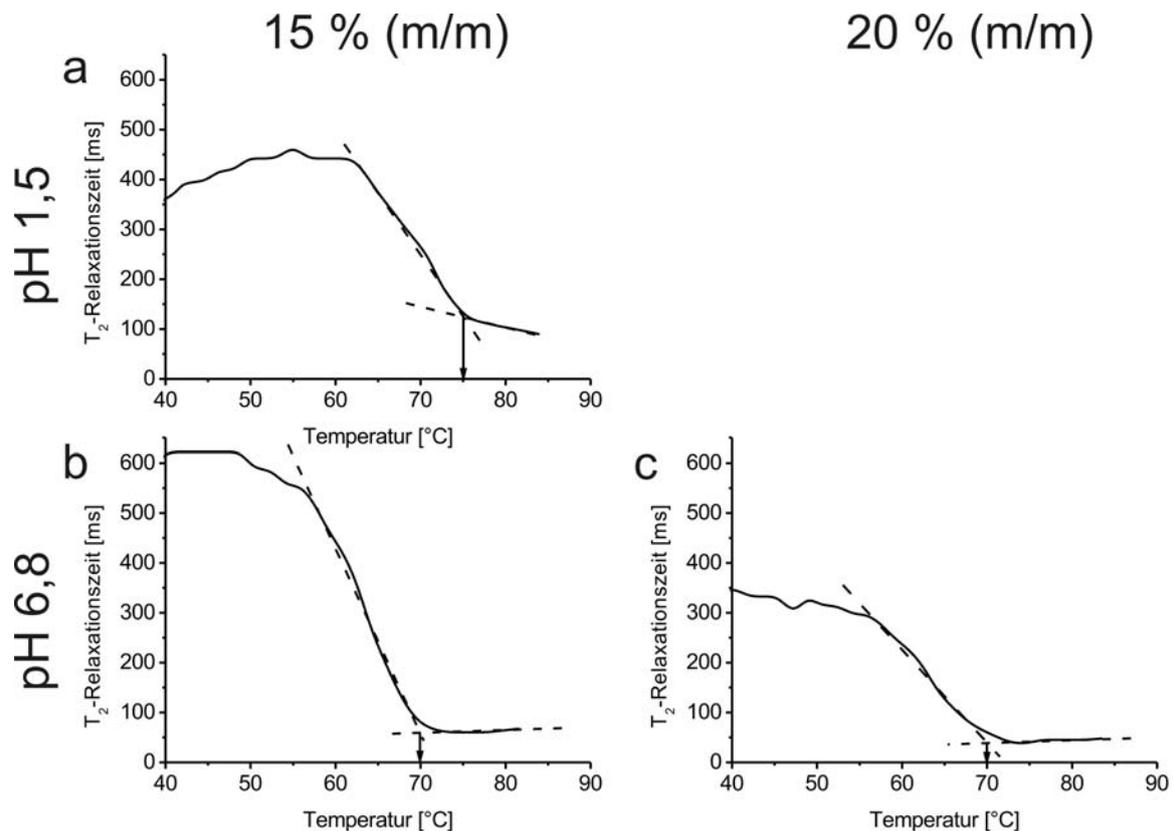


Abbildung 4.5-3 Veränderung der T_2 -Relaxationszeit mit der Temperatur von a) 15%iger (m/m) MPI-Lösung pH 1,5, b) 15%iger (m/m) MPI-Lösung pH 6,8 und c) 20%iger (m/m) MPI-Lösung pH 6,8. Die Pfeile zeigen die Sol / Gel-Übergangstemperatur der jeweiligen Proben an.

Im Vergleich der T_2 -Relaxationszeiten zu Beginn der Inkubation bei 40 °C zeigen die Proben unterschiedliche Ausgangswerte. Diese sind durch die unterschiedlichen Ausgangsviskositäten der Proben bedingt (vgl. Kapitel 4.5.3). Das Lösungsmittel wurde bereits zu Beginn unterschiedlich stark immobilisiert. Die 15%ige Probe pH 6,8 (Abbildung 4.5-3 b) zeigt zwischen 40 °C und 50 °C eine T_2 -Relaxationszeit von etwa 600 ms. Interessanterweise sind die Werte der 15%igen Probe pH 1,5 (Abbildung 4.5-3 a) und der 20%igen Probe pH 6,8 (Abbildung 4.5-3 c) in diesem Temperaturbereich mit 350 ms gleich. Durch die Absenkung des pH-Wertes bei der 15%igen Probe auf pH 1,5 herrscht eine andere Ionenstärke vor. Dadurch ist die Wasserbindungskapazität und damit die freie Beweglichkeit der Protonen erhöht. Die Absenkung der T_2 -Relaxationszeit der 20%igen Probe pH 6,8 aus Abbildung 4.5-3 c beruht auf der höheren Proteinkonzentration und damit auf einer höheren Ausgangsviskosität¹⁷⁴, welche die Wasserbindungskapazität beeinflusst¹⁷⁶. Die aus diesen Kurvenverläufen ermittelten Sol / Gel-Übergangstemperaturen (s. Tabelle 4.5-6) stimmen mit NMR-Studien an reinem β -Ig von Goetz *et. al.* überein, die die Denaturierungstemperatur zwischen 70 °C und 75 °C bestimmt haben¹⁷³.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.5-6 Mittels Benchtop-NMR ermittelte Sol / Gel-Übergangstemperaturen der drei untersuchten MPI-Lösungen

| | 15 % pH 1,5 | 15 % pH 6,8 | 20 % pH 6,8 |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| Temperatur [°C] | 75 ± 1 | 70 ± 1 | 70 ± 1 |

In Abbildung 4.5-4 werden die Relaxationszeiten der gebildeten Gele, der korrespondierenden MPI-Sole sowie von gereinigtem Wasser bei 25 °C miteinander verglichen. Alle Proben zeigen einen deutlich erkennbaren Peak. Dieser beruht jeweils auf dem Signal der Protonen des Wassers. Die Kurven der MPI-Lösungen zeigen vereinzelt kleine Peaks bei niedrigen Relaxationszeiten zwischen 20 ms und 40 ms. Diese sind beweglichen Protonen des MPI zuzuordnen.

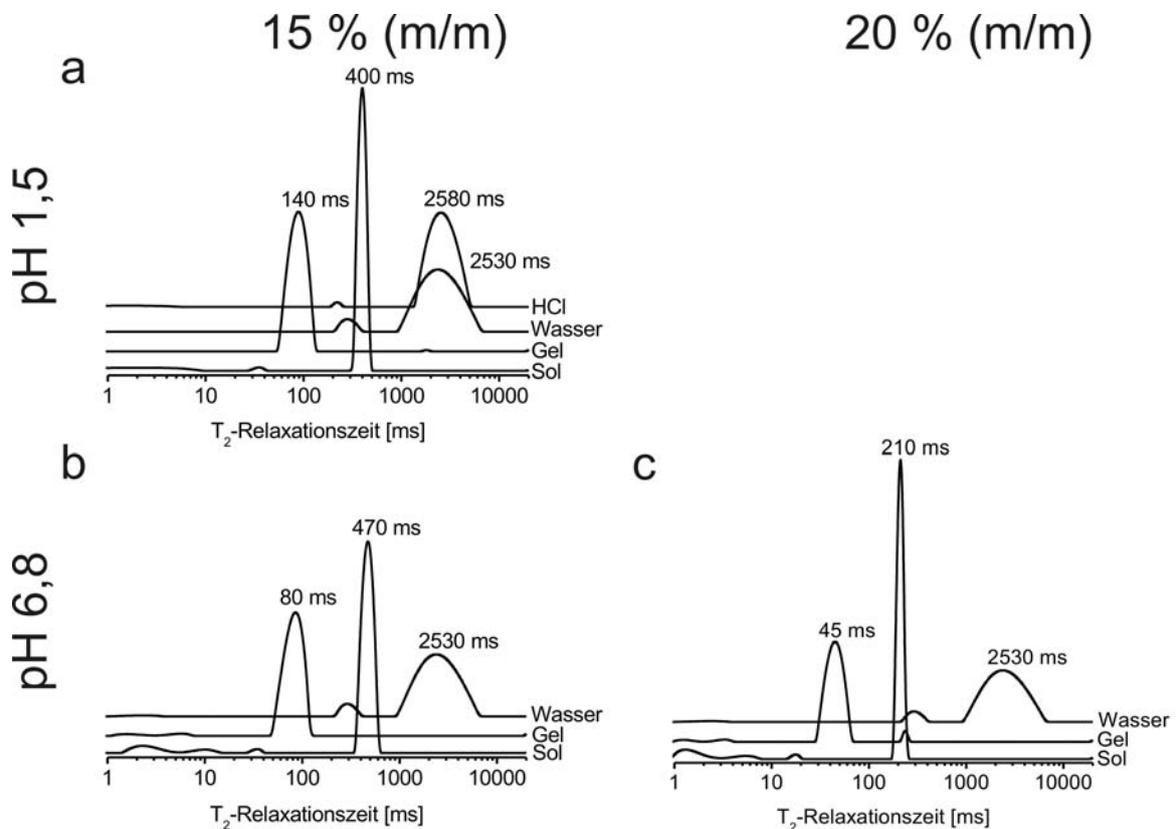


Abbildung 4.5-4 Vergleich der mittels BT-NMR ermittelten T_2 -Relaxationszeiten von a) 15%iger MPI-Lösung pH 1,5, b) 15%iger MPI-Lösung pH 6,8 und c) 20%iger MPI-Lösung pH 6,8 bei 25 °C mit reinem destilliertem Wasser und Salzsäure pH 1,5. Das 20%ige Sol pH 1,5 war bei RT hochviskos und wurde nicht untersucht. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurden die einzelnen Graphen vertikal verschoben.

Die Kurven des gereinigten Wassers zeigen ebenfalls einen weiteren Peak zwischen 200 und 300 ms. Dieser Wasserpeak ist auf Grenzflächeneffekte des Wassers mit den Probengefäßen zurückzuführen¹⁷². Der Hauptpeak bei 2530 ms repräsentiert die Mehrheit

4. Ergebnisse und Diskussion

der Protonen der Wasserreferenzprobe. Die Lage des reinen Wasserpeaks ist temperaturabhängig¹⁷². Die ermittelten Daten von etwa 2530 ms stimmen mit Literaturangaben bei 25 °C überein. Diese besagen, dass die T₂-Relaxationszeit des Wassers größer als 1000 ms ist^{172,177}. Durch Vergleiche der T₂-Relaxationszeiten der jeweiligen MPI-Lösung mit denen der daraus hergestellten Gele bei 25 °C ist ersichtlich, dass die Relaxationszeiten der gebildeten Gele unter denen der korrespondierenden MPI-Lösungen liegen. Dies zeigt, dass der Gelbildungsmechanismus irreversibel ist¹⁷³.

4.5.5 Prüfung der Geltextrur

Die Elastizitäten der durch die thermische Gelbildung erhaltenen Gele wurden mittels Kompression der generierten Gelzylinder (s. Kapitel 3.3.4.4) am Texture Analyzer charakterisiert. Die Kraft-Weg-Diagramme des in die Gele eindrückenden Stempels sind in Abbildung 4.5-5 dargestellt. Alle drei untersuchten Gelsysteme unterscheiden sich wesentlich in ihren Elastizitäten. Innerhalb der einzelnen untersuchten Gelsysteme gibt es Variationen der Maximalkräfte (F_{max}). Ein Vergleich der drei Proben ist trotz dieser Abweichungen innerhalb der jeweiligen Systeme möglich, da sich die Ergebnisse der drei Proben wesentlich voneinander unterscheiden.

Das 15%ige Gel pH 1,5 (Abbildung 4.5-5 a) wurde durch die ausgeübte Kompression zerstört, bevor der Stempel 3 mm tief in das Gel eingedrückt ist. Die sich ergebenden Maximalkräfte sind im Vergleich mit den beiden anderen untersuchten Gelen (Abbildung 4.5-5 b und c) gering. Die Zerstörung der Gelstruktur ist auf die im Gel vorherrschenden geringen Bindungskräfte zurückzuführen. Wie in Kapitel 4.5.1 erläutert, bilden sich auf Grund des niedrigen pH-Wertes fibrilläre Aggregate. Diese bilden ein schwächeres dreidimensionales Gelnetzwerk, da feste, kovalente Bindungen, die bei der Denaturierung bei nahezu neutralen pH-Werten (pH 6,8) entstehen, fehlen. Dies liegt darin begründet, dass die Thiolgruppen der Molkenproteine, die die kovalenten Bindungen ausbilden, durch das saure pH-Milieu stabilisiert und somit nicht in der Lage sind, zur Stabilisierung des Gelnetzwerkes beizutragen. Dieses Ergebnis bestätigen Shimada und Cheftel¹⁷⁸. Ergebnisse dieser Studie zeigen ebenfalls, dass Gele, die unter sauren pH-Bedingungen (pH 3,5) hergestellt wurden, nicht elastisch sind. Sie führen dieses Ergebnis auf die große Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen zurück, die bei diesen pH-Werten vorliegen.

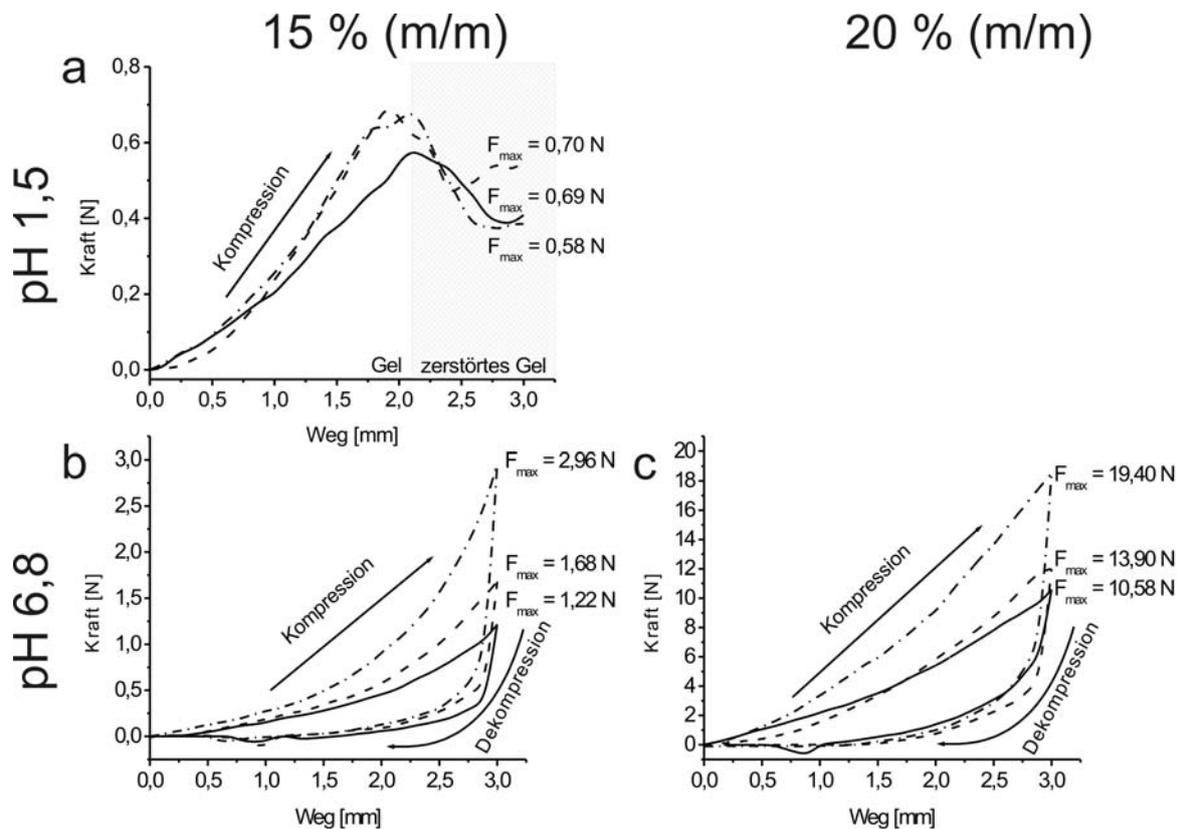


Abbildung 4.5-5 Vergleich der mittels Texture Analyzer ermittelten Elastizitäten von Gelzylindern (Höhe: 0,5 cm, Durchmesser 1 cm) eines a) 15%igen MPI-Gels pH 1,5, b) 15%igen MPI-Gels pH 6,8 und c) 20%igen MPI-Gels pH 6,8 bei 25 °C (1. Probe (---), 2. Probe (— —), 3. Probe (—)). Das 20%ige Gel pH 1,5 war bereits bei Raumtemperatur gelartig fest und wurde nicht untersucht.

Die beiden bei pH 6,8 hergestellten Gele mit 15 % bzw. 20 % MPI sind sehr elastisch. Nach der Kompression der Gelzylinder um 3 mm wurde das Gelgerüst nicht zerstört. Der gemessene Abfall der Kraft während der Dekompression war zu Beginn drastisch und flachte im weiteren Verlauf der Dekompression ab. Die Maximalkräfte (F_{\max}) der Kompression bei einer Eindringtiefe des Stempels von 3 mm sind bei dem 20%igen Gel, begründet durch die höhere Proteinkonzentration, zehnfach höher im Vergleich zu dem 15%igen Gel (s. Abbildung 4.5-5). Die Gelzylinder beider Proteinkonzentrationen sahen rein visuell nach der Entnahme aus dem Testsystem, im Vergleich mit dem Beginn des jeweiligen Tests, unverändert aus. Während der Kompression der Gele trat aus diesen kein Wasser aus. Die Elastizität der beide Gele mit dem pH-Wert von pH 6,8 gegenüber dem Gel mit pH 1,5 ist durch die veränderten Bindungsarten während des Gelbildungsvorgangs zu erklären. Bei pH 6,8 bilden sich zusätzlich kovalente Disulfidbrücken aus, die die Ausbildung eines starken dreidimensionalen Gelnetzwerkes fördern (s. Kapitel 4.5.1).

Der anfangs starke Abfall der Dekompressionskurve zeigt, dass die Verformung bei der Dekompression der Gele stärker ist als bei der Kompression. Dies ist ein Indiz für die Elastizität der Gele ¹⁷⁹. Eine weitere Aussage bezüglich der Elastizität der Gele kann aus

4. Ergebnisse und Diskussion

dem Ausmaß der Hysterese getroffen werden, welche ein Maß für die gespeicherte Energie des jeweiligen Gels ist (Tabelle 4.5-7). Die Daten der Hysterese wurden aus der Differenz der Integrale der Kompressions- und der Dekompressionskurve gewonnen. Bedingt durch die höhere Proteinkonzentration im 20%igen MPI-Gel ist das Ausmaß der Hysterese im Vergleich zu dem 15%igen MPI-Gel bis zu 15 fach größer. Diese Daten bestätigen, dass das 20%ige MPI-Gel elastischer ist als das 15%ige MPI-Gel.

Tabelle 4.5-7 Ausmaß der Hysterese der beiden elastischen MPI-Gele bei pH 6,8 mit 15 % (m/m) bzw. 20 % (m/m) MPI

| | 15 % pH 6,8 | 20 % pH 6,8 |
|------------------|-------------|--------------|
| Hysterese [N*mm] | 1,25 ± 0,38 | 13,13 ± 5,64 |

Betz und Kulozik haben eine Studie über die Festigkeit von MPI-Gelen durchgeführt ⁹⁸. Die Ergebnisse dieser Studie sind mit den hier gewonnenen Ergebnissen jedoch nicht direkt vergleichbar, da die Größe der Gelzylinder und der Stempel sowie die Eindringtiefe variierten. Die Grundaussage, dass MPI-Gele, die mit einer 20%igen Proteinkonzentration generiert wurden, elastischer sind als Gele mit einer 15%igen Proteinkonzentration, ist vergleichbar.

4.5.6 Vergleich der angewendeten Methoden

Die durch die Gefäß-Wasserbad-Methode, Benchtop-NMR sowie die Oszillierende Rheologie ermittelten Sol / Gel-Übergangstemperaturen sind in Tabelle 4.5-8 zusammengefasst. Bei den generierten MPI-Gelen mit pH 6,8 sind die ermittelten Temperaturen vergleichbar. Die geringen Unterschiede sind durch die unterschiedlichen Scherkräfte, die bei den drei angewendeten Methoden auf die Probe einwirken, begründet (Benchtop-NMR < Gefäß-Wasserbad-Methode < Oszillierende Rheologie). Einen weiteren Einfluss haben die verschiedenen experimentellen Aufbauten und Temperaturschwankungen der einzelnen Geräte.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.5-8 Vergleich der mittels Gefäß-Wasserbad-Methode, Oszillierender Rheologie sowie Benchtop-NMR ermittelten Sol / Gel-Übergänge verschieden konzentrierter MPI-Lösungen bei unterschiedlichen pH-Werten

| | 15 % pH 1,5 | 15 % pH 6,8 | 20 % pH 1,5 | 20 % pH 6,8 |
|------------------------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|
| Gefäß-Wasserbad-Methode [°C] | 61 ± 1 | 69 ± 1 | nicht bestimmt* | 67 ± 2 |
| Oszillierende Rheologie [°C] | 57 ± 4 | 71 ± 1 | nicht bestimmt* | 68 ± 2 |
| Benchtop-NMR [°C] | 75 ± 1 | 70 ± 1 | nicht bestimmt* | 70 ± 1 |

*Probe lag bei RT bereits hochviskos vor

Bei dem 15%igen Gel mit dem sauren pH-Wert von pH 1,5 gibt es stärkere Abweichungen. Die Werte, die durch die Gefäß-Wasserbad-Methode sowie durch die Oszillierende Rheologie ermittelt wurden, liegen um 4 °C auseinander, sind aber dennoch vergleichbar. Auch hier muss von Temperaturfehlern während des Aufheizens ausgegangen werden. Die im Vergleich mit den beiden weiteren generierten Gelen niedrigeren Sol / Gel-Übergangstemperaturen der MPI-Lösungen mit dem sauren pH-Wert von pH 1,5 liegen im Gelbildungsprozess begründet. Durch die bereits beschriebene Stabilisierung der Thiolgruppen bei niedrigen pH-Werten sind diese nicht bei der Ausbildung des Gelnetzwerkes beteiligt. Es bilden sich fibrillenartige Gelstrukturen (s. Kapitel 4.5.1). Die mittels Gefäß-Wasserbad-Methode ermittelte, relativ niedrige Gelierungstemperatur von 61 °C ist demnach plausibel und wurde auch schon von anderen Arbeitsgruppen bestätigt^{157,158}. Ein weiterer Beleg für die Richtigkeit dieser Temperatur ist die Erkenntnis, dass Gele, an deren Ausbildung Thiolgruppen beteiligt sind, erst ab einer Temperatur von 63 °C gelieren¹⁶⁴. Eine relativ große Abweichung von 14 °C gibt es zwischen dem mittels Gefäß-Wasserbad-Methode und dem mittels Benchtop-NMR ermittelten Temperaturwert. Das vorherrschende pH-Milieu hat einen Einfluss auf die Gelstruktur (s. Kapitel 4.5.1). Durch die gebildeten Gelfibrillen bei pH 1,5 ist die Wasserbindungskapazität schlechter als durch die festeren Gelstrukturen bei Gelen mit dem pH-Wert von pH 6,8. Das Lösungsmittel Wasser ist daher bei Temperaturen, bei denen optisch bereits ein Gel zu erkennen ist (Gefäß-Wasserbad-Methode), noch nicht vollständig immobilisiert und die Gelbildung daher noch nicht vollständig abgeschlossen. Die Gelierung ist erst bei höheren Temperaturen fortgeschritten, was mit einer zunehmenden Immobilisierung des Wassers und damit der Protonen des Lösungsmittels einhergeht. Die aufgetretene Temperaturdifferenz von 14 °C zwischen der Gefäß-Wasserbad-Methode und der Benchtop-NMR ist mit derartigen Mikroviskositäten zu erklären.

Betz und Kulozik haben gezeigt, dass es bei gleichbleibenden Proteinkonzentrationen aber unterschiedlichen Denaturierungstemperaturen und Erhitzungszeiträumen zu unterschiedlichen Denaturierungsgraden der Molkenproteine in den generierten MPI-Gelen kommt⁹⁸. Dies führt zu einer unterschiedlichen Gelstabilität. Abgeleitet aus den Ergebnissen

4. Ergebnisse und Diskussion

über die Elastizität der Gele unter Einbeziehung der vorherrschenden pH-Werte und der Erkenntnis, dass die Dauer der Temperatureinwirkung eine Rolle auf die Stabilität des Gels hat (s. oben), lässt sich auch ein Zusammenhang zwischen der Elastizität des Gels und der Anzahl der gebildeten Disulfidbrücken schließen. Je höher die Temperatur und je länger die Einwirkzeit der Temperatur ist, desto fester werden die Gele bzw. umso mehr Disulfidbrücken werden gebildet¹⁸⁰.

Die durch die drei angewendeten Methoden ermittelten Sol / Gel-Übergangstemperaturwerte entsprechen in der Literatur genannten Werten. Diese liegen im Bereich von 60 °C bis 75 °C^{157,158,164,173}. Dieser aus der Literatur entnommene weit gefächerte Bereich liegt in den verschiedenen untersuchten Konzentrationsbereichen, pH-Werten, MPI-Chargen sowie den unterschiedlichen experimentellen Aufbauten begründet. Für die MPI-Gele mit einem pH-Wert von pH 1,5 existierten bisher keine Daten. Die ermittelten Sol / Gel-Übergangstemperaturen bei diesem pH-Wert sind, bedingt durch den Gelierungsmechanismus und die Vergleichsdaten, plausibel. Die in dieser Arbeit angewendeten Methoden sind für die Bestimmung von Sol / Gel-Übergängen von MPI-Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen und pH-Werten geeignet, da sie sich gegenseitig bestätigen.

Auch wenn die Resultate der Elastizität der Gele gezeigt haben, dass die MPI-Gele mit einem pH-Wert von pH 1,5 eine geringere Elastizität als die Gele bei pH 6,8 aufweisen, haben diese Gele bei der gegebenen Anwendung als Verkapselungsmatrix für Anthocyane (s. Kapitel 3.2.3) mehrere Vorteile. Durch den niedrigen pH-Wert ist ein mikrobieller Befall des Gels nahezu ausgeschlossen. Eigene Lagerungsstudien zeigten, dass erzeugte Gele bei einem pH-Wert von pH 6,8 nach ca. zehn Tagen sichtbar mikrobiell befallen waren. Proben, die einen pH-Wert von pH 1,5 aufweisen, zeigten bei einer Lagerung bei RT und Lichteinfluss über 3 Jahre keinen sichtbaren mikrobiellen Befall. Des Weiteren ist die Stabilität der in dem Gel eingekapselten Anthocyane bedingt durch die Stabilisierung des Flavyliumkations bei niedrigen pH-Werten (s. Kapitel 2.1) gegeben. Beide Fakten fördern eine längere Lagerstabilität der generierten MP-Matrixkapseln verbunden mit einer über den Lagerungszeitraum stabilisierten Anthocyankonzentration.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Mikrokapselsystem auf der Basis von Hartfett über ein $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsionsverfahren entwickelt. Diese Kapseln bestanden aus einem wässrigen, anthocyanhaltigen Kern, der von einer festen Lipidhülle umgeben wird. Im Verlauf der Entwicklung wurden zwei sich in ihren Schmelzbereichen unterscheidenden Hartfetttypen eingesetzt. Zusätzlich wurden unterschiedliche Konzentrationen an Emulgatoren und Anteilen der inneren, wässrigen, anthocyanhaltigen Phase getestet. Alle eingesetzten Hilfsstoffe (Hartfett, Span[®] 80 und Saccharoseester S-370) sind für den Lebensmittelbereich zugelassen. Über die Becherglasmethode konnten die Lipidmikrokapseln mit Inkorporationsraten von bis zu 90 % reproduzierbar hergestellt werden. Um den Herstellungsprozess zu vereinfachen, wurde das Verfahren auf den SpeedMixer[™], der nach dem Prinzip einer dualen asymmetrischen Zentrifuge rotiert, übertragen. Das Ziel, die Anzahl der Herstellungsschritte bei gleichem Hilfsstoffeinsatz zu minimieren, wurde erreicht. Der fehlerbehaftete Prozess des manuellen Eintropfens der anthocyanhaltigen Lösung in die Lipidschmelze bei der Herstellung nach der Becherglasmethode wurde durch eine Zugabe dieser Lösung als Bulk bei der SpeedMixer[™] Methode eliminiert. Bedingt durch das Rotationsprinzip der dualen asymmetrischen Zentrifuge konnten unter den genannten Bedingungen mit dem SpeedMixer[™] keine gleichmäßigen LMK hergestellt werden. Durch die vergleichende lichtmikroskopische Analyse sowie durch die statische Lichtstreuung wurden diese Ergebnisse bestätigt. Die weitere Charakterisierung der mittels Becherglasmethode hergestellten LMK wurde mittels der Rasterelektronenmikroskopie, der Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie sowie der DSC durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass teilweise mehrkernige, sphärische LMK entstanden sind. Der mittels DSC analysierte Schmelzbereich dieser LMK lag bei etwa 35,7 °C.

Bei einer Weiterentwicklung dieses Mikrokapselsystems sollte die Partikelgröße im Hinblick auf die Sensorik des Konsumenten verringert werden. Für den Verbraucher bleiben mikropartikuläre Systeme, die in Lebensmittel wie beispielsweise Joghurt eingearbeitet sind, sensorisch unbemerkt, wenn die Partikelgröße unter 100 µm liegt¹⁸¹.

Für die Freisetzungskarakterisierung der entwickelten LMK sowie der aus dem Gesamtprojekt zur Verfügung gestellten Systeme AP; MP und SL wurde eine *in vitro*-Freisetzungsmethode entwickelt. Dafür erfolgte eine Inkubation der unterschiedlichen Partikelsysteme in den Magen sowie den Dünndarm simulierenden Medien im Vergleich zu unverkapseltem anthocyanhaltigem HBE in einem End-over-End-Mischer. Die Bestimmung des Gesamtanthocyangehalts wurde mittels HPLC-UV/Vis-Analytik durchgeführt. Bei allen Kapselsystemen zeigte sich nach der Inkubation im simulierten Dünndarmmedium eine erhöhte Gesamtanthocyankonzentration im Vergleich zu dem reinen, unverkapseltem HBE.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Dabei war die Gesamtanthocyankonzentration um $21 \pm 3 \%$ (Systeme: AP, MP, SL) bzw. $13 \pm 2 \%$ (System: LMK) erhöht. Diese Ergebnisse zeigen, dass alle untersuchten Kapselsysteme in der Lage sind, die Anthocyane vor dem vorzeitigen Abbau im GIT zu schützen. Ziel ist es bei weiteren Optimierungen der Kapselsysteme auf die Dichte der Matrix bzw. des Überzugs der Kapseln zu achten. Der Überzug sollte aus einem optimierten Schellackfilm ohne Porenbildner oder höher schmelzenden Lipide zusammengesetzt sein. Alle vier getesteten Systeme zeigten innovative Möglichkeiten bei der Verkapselung von bioaktiven Inhaltsstoffen, wie den Anthocyanen, in der pharmazeutischen und der Lebensmittelindustrie. Um die Beeinflussung des Freisetzungsprozesses der Anthocyane aus den LMK durch die im FeSSIF-Medium enthaltenen Enzyme zu überprüfen, könnten die LMK ohne den Zusatz von Pankreatin (enthält Lipasen, Amylasen und Proteasen) im FeSSIF-Medien inkubiert werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Übertragung des Pankreatintests zur Charakterisierung des *in vitro* Lipidverdaus zweier im Clusterprojekt entwickelten $W_1/O/W_2$ -Doppemulsionen mit jeweils unterschiedlichen Emulgatoren. Der Pankreatintest gibt wesentliche Informationen zur Hydrolyse der in den Emulsionen eingesetzten Triglyceriden. Für beide Doppemulsionen konnte ein Verdauprozess in den simulierten intestinalen Medien (FaSSIF und FeSSIF) beobachtet werden. Der Hauptteil des Lipidverdaus findet in den ersten 5 Minuten der Inkubation statt. Im Vergleich der beiden eingesetzten Emulgatoren ist der Lipidabbau bei der Emulsion mit Gallensalzen als Emulgator schneller als bei der Emulsion mit Protein-Polysaccharid-Konjugatemulgator. Dies ist auf die vereinfachte Anhaftung des Lipase / co-Lipase-Komplexes an die O/W_2 -Grenzfläche zurückzuführen. Unter diesen Bedingungen muss nicht erst der Protein-Polysaccharid-Konjugatemulgator durch die in den Verdauprozess eingebundenen Gallensalze verdrängt werden. Im Vergleich des Lipidverdaus in beiden eingesetzten, den Dünndarm simulierenden Medien war der Verdau im FeSSIF-Medium schneller als im FaSSIF-Medium. Durch die erhöhte Konzentration an Gallensalzen und Phospholipiden sind im FeSSIF-Medium mehr Mischmizellen zum Abtransport der gebildeten freien Fettsäuren und Monoglyceride vorhanden. Durch den schnellen Abtransport wird der Enzymkomplex weniger stark inhibiert. Ein Einfluss der Tropfengröße auf die Verdaukinetik konnte nicht beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen die Bedeutung der Zusammensetzung der Grenzflächen auf den ersten Abschnitt des Verdauprozesses von Emulsionen und unterstreichen den Einfluss von Emulgatoren auf diesen Prozess. Basierend auf einer Acylwanderung sinkt die Konzentration der Monoglyceride im Verlauf des *in vitro*-Verdaus. Dieser finale Abbau von Monoglyceriden in die korrespondierenden freien Fettsäuren und Glycerol ist ein Phänomen von simulierten *in vitro*-Verdauversuchen. Im Falle des Einschusses einer wässrigen Anthocyanlösung in die

5. Zusammenfassung und Ausblick

innere W_2 -Phase der Doppelemulsionen können die Anthocyane, bedingt durch den Lipidverdau der umgebenden O-Phase, freigesetzt werden.

Im Rahmen der Charakterisierung der im Gesamtprojekt verwendeten Hilfsstoffe wurde der Sol / Gel-Übergang von unterschiedlich konzentrierten Molkenproteinisolat-Gelen mit verschiedenen pH-Werten rheologisch charakterisiert. Dafür wurden vergleichend drei Techniken eingesetzt: die Gefäß-Wasserbad-Methode, die Oszillierende Rheologie und die Benchtop-NMR. Bei allen angewendeten Methoden kamen nahezu identische Temperaturwerte für den jeweiligen Sol / Gel-Übergang der einzelnen MPI-Gele heraus: 15 % MPI pH 1,5 zwischen 57 °C und 74 °C, 15 % MPI pH 6,8 zwischen 69 °C und 71 °C und für 20 % MPI pH 6,8 zwischen 67 °C und 70 °C. Der große Temperaturbereich bei 15 % MPI pH 1,5 liegt in dem veränderten Gelierungsverhalten bei diesem niedrigen pH-Wert begründet. Die T_2 -Relaxationszeiten zeigen hier Mikroviskositäten auf, die für die übrigen beiden Messmethoden nicht detektierbar sind. In der Literatur sind bisher keine Sol / Gel-Übergangstemperaturangaben für MPI-Gele mit einem pH-Wert von pH 1,5 zu finden. Bei weitergehenden Untersuchungen sollte der Gelierungsprozess nicht nur temperatur- sondern auch zeitabhängig bestimmt werden. Hierfür eignet sich insbesondere die Analytik von T_2 -Relaxationszeiten mittels Benchtop-NMR¹⁷³. Bei der Verkapselung von Anthocyanen in MPI-Gele mit einem niedrigen pH-Wert ist die mikrobielle Stabilität der Gele bzw. der daraus generierten Mikropartikel sowie die chemische Stabilität der darin inkorporierten Anthocyane gewährleistet. Die generierten Gele wurden abschließend mit einem Texture Analyzer auf ihre Gelfestigkeit hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine hohe MPI-Konzentration gepaart mit einem nahezu neutralen pH-Wert (20 % MPI pH 6,8) die stabilsten und elastischsten Gele bildet.

Zusätzlich konnte das antioxidative Potential der Anthocyane des verwendeten HBE mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie aufgezeigt werden. Der bei unterschiedlichen pH-Werten gelöste HBE zeigte während der Inkubation mit der Spinsonde TEMPOL eine pH-Wert abhängige Änderung der Signalamplitude des TEMPOL-Signals. Je niedriger der pH-Wert der Anthocyanlösung war, desto kürzer war die Signalhalbwertszeit des TEMPOL-Signals. Begründet ist dies mit der Stabilität der Anthocyane bei niedrigen pH-Werten (Flavyliumkation). Daraus resultierend ist die Anthocyankonzentration bei den niedrigen pH-Werten im Vergleich zu höheren pH-Werten größer. Diese Tatsache begründet den konzentrationsabhängigen schnelleren Abfall der Signalhalbwertszeit bei dem resultierenden pH-Wert von pH 1,34. Durch dieses Ergebnis ist die Notwendigkeit des Verkapselns von Anthocyanen bei stark sauren pH-Werten von pH < 1,5 bestätigt.

Für die Einarbeitung der entwickelten Kapselsysteme in Lebensmitteln müssen diese weiter optimiert werden. Der bisherige Stand der Forschung zeigt jedoch deutlich, dass die Mikroverkapselung von Anthocyanen einen positiven Effekt auf deren Stabilität aufweist.

6. Literatur

- 1 Husmann, G., Kaatsch, P., Katalinic, A., Bertz, J., Kraywinkel, K., Haberland, J., Wolf, U. "Krebs in Deutschland 2005/2006 - Häufigkeiten und Trends" 7. Auflage, Robert Koch-Institut (2010), ISBN: 9783896062079
- 2 Glaeske, G. "Pharmakoökonomie in der Hämatologie und Onkologie" *Der Onkologe* (2010) 16; 972-980
- 3 Gensthaler, B. M., Gräfe, K. A., Siebenand, S., Morck, H. "Neue Arzneistoffe 2011" Supplement zur Pharmazeutischen Zeitung (2012) 157; 4-24
- 4 Gensthaler, B. M., Gräfe, K. A., Siebenand, S., Morck, H. "Neue Arzneistoffe 2010" Supplement zur Pharmazeutischen Zeitung (2011) 156; 4-23
- 5 Gensthaler, B. M., Gräfe, K. A., Siebenand, S., Morck, H. "Neue Arzneistoffe 2009" Supplement zur Pharmazeutischen Zeitung (2010) 155; 4-31
- 6 Key, T. J., Schatzkin, A., Willett, W. C., Allen, N. E., Spencer, E. A., Travis, R. C. "Diet, nutrition and the prevention of cancer" *Public Health Nutrition* (2004) 7; 187-200
- 7 Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer" *Chemico-Biological Interactions* (2006) 160; 1-40
- 8 Dreher, D., Junod, A. F. "Role of oxygen free radicals in cancer development" *European Journal of Cancer* (1996) 32A; 30-38
- 9 Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M. "The role of oxidative stress in carcinogenesis" *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (2004) 44; 239-267
- 10 Waris, G., Ahsan, H. "Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions" *Journal of Carcinogenesis* (2006) 5; 14-22
- 11 Matés, J. M., Sanchez-Jiménez, F. M. "Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy" *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (2000) 32; 157-170
- 12 Ehlenfeldt, M. K., Prior, R. L. "Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Phenolic and Anthocyanin Concentrations in Fruit and Leaf Tissues of Highbush Blueberry" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2001) 49; 2222-2227
- 13 Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., Mainland, C. M. "Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1998) 46; 2686-2693

6. Literatur

- 14 Schantz, M., Mohn, C., Baum, M., Richling, E. "Antioxidative efficiency of an anthocyanin rich bilberry extract in the human colon tumor cell lines Caco-2 and HT-29" *Journal of Berry Research* (2010) 1; 25-33
- 15 Wang, L.-S., Stoner, G. D. "Anthocyanins and their role in cancer prevention" *Cancer Lett.*(Shannon, Irel.) (2008) 269; 281-290
- 16 Hosseinian, F. S., Beta, T. "Saskatoon and wild blueberries have higher anthocyanin contents than other manitoba berries" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2007) 55; 10832-10838
- 17 Lätti, A. K., Riihinen, K. R., Kainulainen, P. S. "Analysis of anthocyanin variation in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in Finland" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2008) 56; 190-196
- 18 Nyman, N. A., Kumpulainen, J. T. "Determination of anthocyanidins in berries and red wine by high-performance liquid chromatography" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2001) 49; 4183-4187
- 19 Cooke, D., Schwarz, M., Boocock, D., Winterhalter, P., Steward, W. P., Gescher, A. J., Marczyklo, T. H. "Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the Apc^{Min} mouse model of intestinal carcinogenesis - relationship with tissue anthocyanin levels" *International Journal of Cancer* (2006) 119; 2213-2220
- 20 Bazzano, L. A. "The high cost of not consuming fruits and vegetables" *Journal of the American Dietetic Association* (2006) 106; 1364-1368
- 21 Lock, K., Pomerleau, J., Causer, L., Altmann, D. R., McKee, M. "The global burden of disease attributable to low consumption of fruit and vegetables: implications for the global strategy on diet" *Bulletin of the World Health Organization* (2005) 83; 100-108
- 22 Key, T. J., Allen, N. E., Spencer, E. A., Travis, R. u. C. "The effect of diet on risk of cancer" *Lancet* (2002) 360; 861-868
- 23 Kalra, E. K. "Nutraceutical - definition and introduction" *American Association of Pharmaceutical Scientists* (2003) 5; E25-
- 24 Zeisel, S. H. "Regulation of "nutraceuticals"" *Science* (1999) 285; 1853-1855
- 25 Thomasset, S., Berry, D. P., Cai, H., West, K., Marczyklo, T. H., Marsden, D., Brown, K., Dennison, A., Garcea, G., Miller, A., Hemingway, D., Steward, W. P., Gescher, A. J. "Pilot study of oral anthocyanins for colorectal cancer chemoprevention" *Cancer Prevention Research* (2009) 2; 625-633

6. Literatur

- 26 Häusser, V. "Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen - Zentrale Ergebnisse des gleichnamigen DFG / AiF - Clusterprojektes" 1. Auflage, Forschungskreis der Ernährungsindustrie (FEI) (2011), ISBN: 9783925032493
- 27 Jaakola, L., Määttä, K., Pirttilä, A. M., Törrönen, R., Kärenlampi, S., Hohtola, A. "Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development" *Plant Physiology* (2002) 130; 729-739
- 28 de Pascual-Teresa, S., Sanchez-Ballesta, M. T. "Anthocyanins: from plant to health" *Phytochemistry Reviews* (2008) 7; 281-299
- 29 Juadjur, A., Winterhalter, P. "Development of a novel adsorptive membrane chromatographic method for the fractionation of polyphenols from bilberry" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2012)
- 30 Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., Prior, R. L. "Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2006) 54; 4069-4075
- 31 Hiller, K., Melzig, M. F. "Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen" 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag (2003), ISBN: 3827414997
- 32 Cooney, J. M., Jensen, D. J., McGhie, T. K. "LC-MS identification of anthocyanins in boysenberry extract and anthocyanin metabolites in human urine following dosing" *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2004) 84; 237-245
- 33 Fleschhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G., Kulling, S. E. "Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins *in vitro*" *European Journal of Nutrition* (2006) 45; 7-18
- 34 Thomasset, S., Teller, N., Cai, H., Marko, D., Berry, D. P., Steward, W. P., Gescher, A. J. "Do anthocyanins and anthocyanidins, cancer chemopreventive pigments in the diet, merit development as potential drugs?" *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* (2009) 64; 201-211
- 35 Clifford, M. N. "Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden" *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2000) 80; 1063-1072
- 36 Hong, V., Wrolstad, R. E. "Characterization of anthocyanin-containing colorants and fruit juices by HPLC/photodiode array detection" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1990) 38; 698-708
- 37 Wu, X., Gu, L., Prior, R. L., McKay, S. "Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of ribes, aronia, and sambucus and their

- antioxidant capacity" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2004) 52; 7846-7856
- 38 Zhang, Z., Kou, X., Fugal, K., McLaughlin, J. "Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanins and anthocyanidins in bilberry extracts" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2004) 52; 688-691
- 39 Woodward, G. M., Kroon, P., Cassidy, A., Kay, C. "Anthocyanin stability and recovery: implications for the analysis of clinical and experimental samples" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2009) 57; 5271-5278
- 40 Vitaglione, P., Donnarumma, G., Napolitano, A., Galvano, F., Gallo, A., Scalfi, L., Fogliano, V. "Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides" *Journal of Nutrition* (2007) 137; 2043-2048
- 41 He, J., Giusti, M. M. "Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties" *Annual Reviews in Food Science and Technology* (2010) 1; 163-187
- 42 Weisel, T., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., Will, F., Stockis, J.-P., Kulling, S., Rüfer, C., Johannes, C., Janzowski, C. "An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands" *Journal of Biotechnology* (2006) 1; 388-397
- 43 Bae, J.-Y., Lim, S. S., Kim, S. J., Choi, J.-S., Park, J., Ju, S. M., Han, S. J., Kang, I.-J., Kang, Y.-H. "Bog blueberry anthocyanins alleviate photoaging in ultraviolet-B irradiation-induced human dermal fibroblasts" *Molecular Nutrition & Food Research* (2009) 53; 726-738
- 44 Wang, B. C., He, R., Li, Z. M. "The stability and antioxidant activity of anthocyanins from blueberry" *Food Technol. Biotechnol.* (2010) 48; 42-49
- 45 Jing, P., Bomser, J. A., Schwartz, S. J., He, J., Magnuson, B. A., Giusti, M. M. "Structure-function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2008) 56; 9391-9398
- 46 Olsson, M. E., Gustavsson, K.-E., Andersson, S., Nilsson, Å., Duan, R.-D. "Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2004) 52; 7264-7271
- 47 Marko, D., Puppel, N., Tjaden, Z., Jakobs, S., Pahlke, G. "The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation" *Molecular Nutrition & Food Research* (2004) 48; 318-325
- 48 Hafeez, B. B., Siddiqui, I. A., Asim, M., Malik, A., Afaq, F., Adhami, V. M., Saleem, M., Din, M., Mukhtar, H. "A dietary anthocyanidin delphinidin induces apoptosis of

- human prostate cancer PC3 cells *in vitro* and *in vivo*: involvement of nuclear factor-kB signaling" *Cancer Research* (2008) 68; 8564-8572
- 49 Katsube, N., Iwashita, K., Tsushida, T., Yamaki, K., Kobori, M. "Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2003) 51; 68-75
- 50 Bobe, G., Wang, B., Seeram, N. P., Nair, M. G., Bourquin, L. D. "Dietary anthocyanin-rich tart cherry extract inhibits intestinal tumorigenesis in APC^{Min} mice fed suboptimal levels of sulindac" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2006) 54; 9322-9328
- 51 Wang, H., Cao, G., Prior, R. L. "Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1997) 45; 304-309
- 52 Böhm, H., Boeing, H., Hempel, J., Raab, B., Kroke, A. "Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen" *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* (1998) 147-163
- 53 Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C. "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies" *The American Journal of Clinical Nutrition* (2005) 81; 230S-242S
- 54 Hallagan, J. B., Allen, D. C., Borzelleca, J. F. "The safety and regulatory status of food, drug and cosmetics color additives exempt from certification" *Food and Chemical Toxicology* (1995) 33; 515-528
- 55 Schantz, M. "Biologische Wirksamkeit eines Heidelbeerextrakts (HBE) (*Vaccinium myrtillus* L.) im Vergleich zu verkapselten Präparaten: Antioxidative Wirksamkeit und Modulation der intestinalen Verfügbarkeit der Anthocyane" (2011), Technische Universität Kaiserslautern (Dissertation)
- 56 Kay, C. D. "Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans" *Nutrition Research Reviews* (2006) 19; 137-146
- 57 Han, S. J., Ryu, S. N., Trinh, H. T., Joh, E. H., Jang, S. Y., Han, M. J., Kim, D. H. "Metabolism of cyanidin-3-O-beta-D-glucoside isolated from black colored rice and its antiscratching behavioral effect in mice" *Journal of Food Science* (2009) 74; H253-H258
- 58 González-Barrio, R., Borges, G., Mullen, W., Crozier, A. "Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2010) 58; 3933-3939

6. Literatur

- 59 Kalt, W., Hanneken, A., Milbury, P., Tremblay, F. "Recent research on polyphenolics in vision and eye health" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2010) 58; 4001-4007
- 60 Ghosh, D., Konishi, T. "Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function" *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* (2007) 16; 200-208
- 61 "Fachinformation Difrarel[®] 100", sigma-tau Arzneimittel GmbH (2006)
- 62 "Fachinformation Myrtaven[®]", IBSA Institut Biochimique SA (1996)
- 63 Lochmann, A. "Development and characterization of controlled delivery systems for rhBMP-2" (2011), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Dissertation)
- 64 Beck-Broichsitter, M., Kamm, W., Schöttle, I.A., Kissel, T. "Parenterale Depotarzneiformen - Mikropartikel" in: *Innovative Arzneiformen*, 1. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH (2010), ISBN: 9783804724556; 235-262
- 65 Freitas, S., Merkle, H. P., Gander, B. "Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology" *Journal of Controlled Release* (2005) 102; 313-332
- 66 Varde, N. K., Pack, D. W. "Microspheres for controlled release drug delivery" *Expert Opinion on Biological Therapy* (2004) 4; 35-51
- 67 Fang, Z., Bhandari, B. "Encapsulation of polyphenols - a review" *Trends Food Sci. Technol.* (2010) 21; 510-523
- 68 Cavalcanti, R. N., Santos, D. T., Meireles, M. A. "Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems - an overview" *Food Research International* (2011) 44; 499-509
- 69 Oehme, A., Valotis, A., Krammer, G., Zimmermann, I., Schreier, P. "Preparation and characterization of shellac-coated anthocyanin pectin beads as dietary colonic delivery system" *Molecular Nutrition & Food Research* (2011) 55; S75-S85
- 70 "European Pharmacopoeia 6.8", EDQM - European Directorate for the quality of medicines (2009)
- 71 Kraus, M., Kahle, K., Ridder, F., Schantz, M., Scheppach, W., Schreier, P., Richling, E. "Colonic availability of bilberry anthocyanins in humans" in: *Flavor and health benefits of small fruits*, 1. Auflage, American Chemical Society (2010), ISBN: 9780841225497; 159-176
- 72 Atyabi, F., Majzoob, S., Iman, M., Salehi, M., Dorkoosh, F. "In vitro evaluation and modification of pectinate gel beads containing trimethyl chitosan, as a multi-

- particulate system for delivery of water-soluble macromolecules to colon" *Carbohydrate Polymers* (4-7-2005) 61; 39-51
- 73 El-Gibaly, I. "Oral delayed-release system based on Zn-pectinate gel (ZPG) microparticles as an alternative carrier to calcium pectinate beads for colonic drug delivery" *Int J Pharm* (31-1-2002) 232; 199-211
- 74 Chai, Y., Mei, L.-H., Wu, G.-L., Lin, D.-Q., Yao, S.-J. "Gelation conditions and transport properties of hollow calcium alginate capsules" *Biotechnology and Bioengineering* (2004) 87; 228-233
- 75 Leick, S., Kott, M., Degen, P., Henning, S., Päsler, T., Suter, D., Rehage, H. "Mechanical properties of liquid-filled shellac composite capsules" *Physical Chemistry Chemical Physics* (2010) 13; 2765-2773
- 76 Sriamornsak, P., Nunthanid, J. "Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery: I. Preparation and in vitro release studies" *International Journal of Pharmaceutics* (1998) 160; 207-212
- 77 Blandino, A., Macias, M., Cantero, D. "Formation of calcium alginate gel capsules: influence of sodium alginate and CaCl₂ concentration on gelation kinetics" *Journal of Bioscience and Bioengineering* (1999) 88; 686-689
- 78 Leick, S., Henning, S., Degen, P., Suter, D., Rehage, H. "Deformation of liquid-filled calcium alginate capsules in a spinning drop apparatus" *Physical Chemistry Chemical Physics* (2010) 12; 2950-2958
- 79 Knoth, A., Scherze, I., Fechner, A. "Emulgatoren zur Bildung von multiplen Emulsionen" in: *Multiple Emulsionen - Herstellung und Eigenschaften*, 1. Auflage, Behr's Verlag (2007), ISBN: 3899473396; 71-135
- 80 Flügel, S. "Casein-dextran conjugate. A natural high molecular mass surfactant-function for dispersed food systems" (2003), University of Leeds und Friedrich-Schiller-Universität Jena (Diplomarbeit)
- 81 Töpel, A. "Chemie und Physik der Milch: Naturstoff - Rohstoff - Lebensmittel" 3. Auflage, Behr's Verlag (2004), ISBN: 3899471318
- 82 Surh, J., Vladisavljevi, G. T., Mun, S., McClements, D. J. "Preparation and characterization of water/oil and water/oil/water emulsions containing biopolymer-gelled water droplets" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2007) 55; 175-184
- 83 Dickinson, E. "Double Emulsions Stabilized by Food Biopolymers" *Food Biophysics* (2011) 6; 1-11

6. Literatur

- 84 Hubbermann, E. M., Heins, A., Stöckmann, H., Schwarz, K. "Influence of acids, salt, sugars and hydrocolloids on the colour stability of anthocyanin rich black currant and elderberry concentrates" *European Food Research and Technology* (2006) 223; 83-90
- 85 Hubbermann, E. M. "Functional properties of anthocyanin concentrates and the influence of physicochemical parameters and food additives on the color and stability of isolated anthocyanins in food" (2005), Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, Christian-Albrecht-Universität zu Kiel (Dissertation)
- 86 Belitz, H.-D., Grosch, W. "Food chemistry" 2. Auflage, Springer (1999), ISBN: 3540646922
- 87 Frank, K., Schuchmann, H.P. "Mikrostrukturierte, multidisperse Hüllkapseln als Träger bioaktiver Substanzen: Untersuchungen zum Einfluss von molekularen Wechselwirkungen und Diffusionsbarrieren auf die Stabilität und Freisetzung von Inhaltsstoffen aus der Heidelbeere (AiF 15612 N)" in: *Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen - Zentrale Ergebnisse des gleichnamigen DFG/AiF-Clusterprojektes*, 1. Auflage, Forschungskreis der Ernährungsindustrie (FEI) (2011), ISBN: 9783925032493
- 88 Frank, K., Köhler, K., Schuchmann, H. P. "Formulation of labile hydrophilic ingredients in multiple emulsions: Influence of the formulation's composition on the emulsion's stability and on the stability of entrapped bioactives" *Journal of dispersion science and technology* (2011) 32; 1753-1758
- 89 Jores, K., Mehnert, W., Mäder, K. "Physicochemical investigations on solid lipid nanoparticles and on oil-loaded solid lipid nanoparticles: a nuclear magnetic resonance and electron spin resonance study" *Pharmaceutical Research* (2003) 20; 1274-1283
- 90 Giusti, M. M., Wrolstad, R. E. "Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy" *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (2001) F1.2.1-F1.2.13
- 91 "Produktinformation SpeedMixer™", Hauschild & Co KG (2011)
- 92 Massing, U., Cicko, S., Ziroli, V. "Dual asymmetric centrifugation (DAC) - A new technique for liposome preparation" *Journal of Controlled Release* (4-1-2008) 125; 16-24
- 93 Kuntsche, J., Klaus, K., Steiniger, F. "Size determinations of colloidal fat emulsions: a comparative study" *Journal of Biomedical Nanotechnology* (2009) 5; 384-395

6. Literatur

- 94 Abdalla, A., Klein, S., Mäder, K. "A new self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for poorly soluble drugs: Characterization, dissolution, in vitro digestion and incorporation into solid pellets" *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2008) 35; 457-464
- 95 Porter, C. J. H., Trevaskis, N. L., Charman, W. N. "Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs" *Nature Reviews Drug Discovery* (2007) 6; 231-248
- 96 MacDougall, D., Crummett, W. B. "Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry" *Analytical Chemistry* (1980) 52; 2242-2249
- 97 Rübe, A., Klein, S., Mäder, K. "Monitoring of in vitro fat digestion by electron paramagnetic resonance spectroscopy" *Pharmaceutical Research* (2006) 23; 2024-2029
- 98 Betz, M., Kulozik, U. "Whey protein gels for the entrapment of bioactive anthocyanins from bilberry extract" *International Dairy Journal* (2011) 21; 703-710
- 99 Osorio, C., Carriazo, J. s. G., Almanza, O. "Antioxidant activity of corozo (*Bactris guineensis*) fruit by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy" *European Food Research and Technology* (2011) 233; 103-108
- 100 Lied, J. "Das antioxidative Potential von Kakaosamen-Extrakten" (2002), Universität Hamburg (Diplomarbeit)
- 101 Betz, M., Steiner, B., Schantz, M., Oidtmann, J., Mäder, K., Richling, E., Kulozik, U. "Antioxidant capacity of bilberry extract microencapsulated in whey protein hydrogels" *Food Research International* (2012) 47; 51-57
- 102 Sharma, O. P., Bhat, T. K. "DPPH antioxidant assay revisited" *Food Chemistry* (2009) 113; 1202-1205
- 103 Butkovic, V. "Nitroxide mediated degradation of anthocyanidins" *Croatica Chemica Acta* (2009) 82; 707-713
- 104 Garcia-Alonso, M., Rimbach, G., Sasai, M., Nakahara, M., Matsugo, S., Uchida, Y., Rivas-Gonzalo, J. C., de Pascual-Teresa, S. "Electron spin resonance spectroscopy studies on the free radical scavenging activity of wine anthocyanins and pyranoanthocyanins" *Molecular Nutrition & Food Research* (2005) 49; 1112-1119
- 105 Kempe, S., Metz, H., Mäder, K. "Application of Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy and imaging in drug delivery research - chances and challenges" *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2010) 74; 55-66

6. Literatur

- 106 Lurie, D. J., Mäder, K. "Monitoring drug delivery processes by EPR and related techniques-principles and applications" *Advanced Drug Delivery Reviews* (2005) 57; 1171-1190
- 107 Mäder, K. "Pharmaceutical application of electron spin resonance spectroscopy (ESR)" *PZ Prisma* (1998) 5; 202-212
- 108 Bastrop, M. "Physico-chemical characterization of a novel class of bolaamphiphilic hydrogelators" (2011), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Dissertation)
- 109 Kempe, S., Metz, H., Bastrop, M., Hvilsorn, A., Contri, R. V., Mäder, K. "Characterization of thermosensitive chitosan-based hydrogels by rheology and electron paramagnetic resonance spectroscopy" *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2008) 68; 26-33
- 110 Kempe, S., Metz, H., Pereira, P. G. C., Mäder, K. "Non-invasive in vivo evaluation of in situ forming PLGA implants by benchtop magnetic resonance imaging (BT-MRI) and EPR spectroscopy" *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2010) 74; 102-108
- 111 Oidtmann, J. "Entwicklung nanoskaliger Systeme für die ESR basierten Messungen von Sauerstoffpartialdrücken und pH-Werten" (2008), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Diplomarbeit)
- 112 Eisenächer, F., Schädlich, A., Mäder, K. "Monitoring of internal pH gradients within multi-layer tablets by optical methods and EPR imaging" *International Journal of Pharmaceutics* (2011) 417; 204-215
- 113 Terao, J. "Dietary Flavonoids as Antioxidants" *Food Factors for Health Promotion* (2009) 61; 87-94
- 114 Matsumoto, S., Ueda, Y., Kita, Y., Yonezawa, D. "Preparation of water-in-olive oil-in-water multiple-phase emulsions in an eatable form" *Agric.Biol.Chem.* (1978) 42; 739-743
- 115 Youan, B.-B. C., Hussain, A., Nguyen, N. T. "Evaluation of sucrose esters as alternative surfactants in microencapsulation of proteins by the solvent evaporation method" *American Association of Pharmaceutical Scientists* (2003) 5;
- 116 "Ryoto[®] sugar esters technical information", Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation (2004)
- 117 Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. "Zusatzstoffe" in: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 6. Auflage, Springer (2007), ISBN: 3540732012; 440-480

6. Literatur

- 118 Kegel, C., Klein, S., Mäder, K. "Multifunktionale Hilfsstoffe und ihre Besonderheiten" in: Innovative Arzneiformen, 1. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH (2010), ISBN: 9783804724556; 13-35
- 119 Ullrich, S., Metz, H., Mäder, K. "Sucrose ester nanodispersions: Microviscosity and viscoelastic properties" European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics (2008) 70; 550-555
- 120 Tian, W., Schulze, S., Brandl, M., Winter, G. "Vesicular phospholipid gel-based depot formulations for pharmaceutical proteins: Development and in vitro evaluation" Journal of Controlled Release (2010) 142; 319-325
- 121 Etzler, F. M., Deanne, R. "Particle size analysis: A comparison of various methods II" Particle & Particle Systems Characterization (1997) 14; 278-282
- 122 Drabent, R., Pliszka, B., Olszewska, T. "Fluorescence properties of plant anthocyanin pigments. I. Fluorescence of anthocyanins in *Brassica oleracea* L. extracts" Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology (1999) 50; 53-58
- 123 Pryce-Jones, R. H., Eccleston, G. M., Abu-Bakar, B. B. "Aminophylline suppository decomposition: an investigation using differential scanning calorimetry" International Journal of Pharmaceutics (1992) 86; 231-237
- 124 Bunjes, H., Unruh, T. "Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering" Advanced Drug Delivery Reviews (2007) 59; 379-402
- 125 Abdelbary, G., Fahmy, R. H. "Diazepam-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Design and Characterization" American Association of Pharmaceutical Scientists (2009) 10; 211-219
- 126 McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., Stewart, D. "Anthocyanins from red cabbage - stability to simulated gastrointestinal digestion" Phytochemistry (2007) 68; 1285-1294
- 127 Bermúdez-Soto, M. J., Tomás-Barberán, F. A., García-Conesa, M. T. "Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion" Food Chemistry (2007) 102; 865-874
- 128 Penning, M. "Schellack - ein nachwachsender Rohstoff mit interessanten Eigenschaften und Anwendungen" Seifen, Oele, Fette, Wachse (1990) 116; 221-224
- 129 Buch, K., Penning, M., Wächtersbach, E., Maskos, M., Langguth, P. "Investigation of various shellac grades: additional analysis for identity" Drug Development and Industrial Pharmacy (2009) 35; 694-703

6. Literatur

- 130 Farag, Y., Leopold, C. S. "Development of shellac-coated sustained release pellet formulations" *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2011) 42; 400-405
- 131 Tzika, M., Alexandridou, S., Kiparissides, C. "Evaluation of the morphological and release characteristics of coated fertilizer granules produced in a wurster fluidized bed" *Powder Technology* (2003) 132; 16-24
- 132 Pearnchob, N., Siepmann, J., Bodmeier, R. "Pharmaceutical applications of shellac: moisture-protective and taste-masking coatings and extended-release matrix tablets" *Drug Development and Industrial Pharmacy* (2003) 29; 925-938
- 133 Farag, Y., Leopold, C. S. "Investigation of drug release from pellets coated with different shellac types" *Drug Development and Industrial Pharmacy* (2011) 37; 193-200
- 134 Golding, M., Wooster, T. J. "The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion" *Current Opinion in Colloid & Interface Science* (2010) 15; 90-101
- 135 McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., Stewart, D. "Anthocyanins from red wine - Their stability under simulated gastrointestinal digestion" *Phytochemistry* (2005) 66; 2540-2548
- 136 Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., Saenz, C. "Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying" *International Journal of Food Science & Technology* (2010) 45; 1386-1394
- 137 Leuenberger, H. "Kinetik der Diffusion, Verteilung, Auflösung und Freigabe" in: Martin, *Physikalische Pharmazie*, 4. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH (2002), ISBN: 3804717225; 355-398
- 138 Betz, M., Hörmansperger, J., Fuchs, T., Kulozik, U. "Swelling behaviour, charge and mesh size of thermal protein hydrogels as influenced by pH during gelation" *Soft Matter* (2012) 2477-2458
- 139 Jing, P., Giusti, M. M. "Characterization of anthocyanin-rich waste from purple corncobs (*Zea mays* L.) and its application to color milk" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2005) 53; 8775-8781
- 140 Murkovic, M., Adam, U., Pfannhauser, W. "Analysis of anthocyanine glycosides in human serum" *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* (2000) 366; 379-381
- 141 Viljanen, K., Kylli, P., Hubbermann, E. M., Schwarz, K., Heinonen, M. "Anthocyanin antioxidant activity and partition behavior in whey protein emulsion" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2005) 53; 2022-2027

6. Literatur

- 142 Schuchmann, H. P., Danner, T. "Emulgieren: Mehr als nur zerkleinern" *Chemie Ingenieur Technik* (2004) 76; 364-375
- 143 Schubert, H. "Emulgiertechnik" 1. Auflage, Behr's Verlag (2005), ISBN: 3899470869
- 144 Mao, L., Xu, D., Yang, J., Yuan, F., Gao, Y., Zhao, J. "Effects of small and large molecule emulsifiers on the characteristics of b-carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization" *Food Technology and Biotechnology* (2009) 47; 336-342
- 145 Zangenberg, N. H., Müllertz, A., Kristensen, H. G., Hovgaard, L. "A dynamic *in vitro* lipolysis model I: Controlling the rate of lipolysis by continuous addition of calcium" *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2001) 14; 115-122
- 146 Small, D. M. "The effects of glyceride structure on absorption and metabolism" *Annual Review of Nutrition* (1991) 11; 413-434
- 147 Bermúdez, B., Pacheco, Y. M., López, S., Abia, R., Muriana, F. J. G. "Digestion and absorption of olive oil" *Grasas y Aceites* (2004) 55; 1-10
- 148 Compton, D. L., Vermillion, K. E., Laszlo, J. A. "Acyl migration kinetics of 2-monoacylglycerols from soybean oil via ¹H NMR" *Journal of the American Oil Chemists' Society* (2007) 84; 343-348
- 149 Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. "Hydrolasen für Triacylglyceride" in: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 6. Auflage, Springer (2007), ISBN: 3540732012; 191-192
- 150 Di Maio, S., Carrier, R. L. "Gastrointestinal contents in fasted state and post-lipid ingestion: In vivo measurements and in vitro models for studying oral drug delivery" *Journal of Controlled Release* (2011) 151; 110-122
- 151 Mun, S., Decker, E. A., McClements, D. J. "Influence of emulsifier type on *in vitro* digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase" *Food Research International* (2007) 40; 770-781
- 152 Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E., Miller, R. "Lipases at interfaces: a review" *Advances in Colloid and Interface Science* (2009) 147-148; 237-250
- 153 Armand, M., Pasquier, B., André, M., Borel, P., Senft, M., Peyrot, J., Salducci, J., Portugal, H., Jaussan, V., Lairon, D. "Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract" *American Journal of Clinical Nutrition* (1999) 70; 1096-1106
- 154 Torcello-Gómez, A., Maldonado-Valderrama, J., Martín-Rodríguez, A., McClements, D. J. "Physicochemical properties and digestibility of emulsified lipids in simulated

- intestinal fluids: influence of interfacial characteristics" *Soft Matter* (2011) 7; 6167-6177
- 155 Sek, L., Porter, C. J. H., Charman, W. N. "Characterisation and quantification of medium chain and long chain triglycerides and their in vitro digestion products, by HPTLC coupled with in situ densitometric analysis" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2001) 25; 651-661
- 156 Sava, N., Van der Plancken, I., Claeys, W., Hendrickx, M. "The kinetics of heat-induced structural changes of beta -lactoglobulin" *Journal of Dairy Science* (2005) 88; 1646-1653
- 157 Donato, L., Schmitt, C., Bovetto, L., Rouvet, M. "Mechanism of formation of stable heat-induced beta-lactoglobulin microgels" *International Dairy Journal* (2009) 19; 295-306
- 158 Moitzi, C., Donato, L., Schmitt, C., Bovetto, L., Gillies, G., Stradner, A. "Structure of beta-lactoglobulin microgels formed during heating as revealed by small-angle X-ray scattering and light scattering" *Food Hydrocolloids* (2011) 25; 1766-1774
- 159 Livney, Y. D., Corredig, M., Dalgleish, D. G. "Influence of thermal processing on the properties of dairy colloids" *Current Opinion in Colloid & Interface Science* (2003) 8; 359-364
- 160 Belloque, J., Smith, G. M. "Thermal denaturation of β -lactoglobulin. A ^1H NMR study" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1998) 46; 1805-1813
- 161 de la Fuente, M. A., Singh, H., Hemar, Y. "Recent advances in the characterisation of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins" *Trends in Food Science & Technology* (2002) 13; 262-274
- 162 Purwanti, N., Smiddy, M., van der Goot, A. J., de Vries, R., Alting, A., Boom, R. "Modulation of rheological properties by heat-induced aggregation of whey protein solution" *Food Hydrocolloids* (2011) 25; 1482-1489
- 163 Zhao, Q. S., Cheng, X. J., Ji, Q. X., Kang, C. Z., Chen, X. G. "Effect of organic and inorganic acids on chitosan/glycerolphosphate termosensitive hydrogel" *Journal of Sol-Gel Science and Technology* (2009) 50; 111-118
- 164 Prabakaran, S., Damodaran, S. "Thermal unfolding of b-lactoglobulin: Characterization of initial unfolding events responsible for heat-induced aggregation" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1997) 45; 4303-4308
- 165 Liu, T. X., Relkin, P., Launay, B. "Thermal denaturation and heat-induced gelation properties of b-lactoglobulin. Effects of some chemical parameters" *Thermochimica Acta* (1994) 246; 387-403

- 166 Mezger, T. G. "The rheology handbook: for users of rotational and oscillatory rheometers" 2. Auflage, Vincentz Network Gmbh & Co. KG (2006), ISBN: 3878701748
- 167 Cho, J., Heuzey, M.-C., Bégin, A., Carreau, P. J. "Chitosan and glycerophosphate concentration dependence of solution behaviour and gel point using small amplitude oscillatory rheometry" *Food Hydrocolloids* (2006) 20; 936-945
- 168 Kavanagh, G. M., Clark, A. H., Ross-Murphy, S. B. "Heat-induced gelation of globular proteins: 4. Gelation kinetics of low pH b-lactoglobulin gels" *Langmuir* (2000) 16; 9584-9594
- 169 Dang, Q. F., Yan, J. Q., Li, J. J., Cheng, X. J., Liu, C. S., Chen, X. G. "Controlled gelation temperature, pore diameter and degradation of a highly porous chitosan-based hydrogel" *Carbohydrate Polymers* (2011) 83; 171-178
- 170 Cho, J., Heuzey, M. C., Bégin, A., Carreau, P. J. "Effect of urea on solution behavior and heat-induced gelation of chitosan-b-glycerophosphate" *Carbohydrate Polymers* (2006) 63; 507-518
- 171 Kempe, S. "Non-invasive characterization of *in situ* forming implants" (2012), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Dissertation)
- 172 Bastrop, M., Meister, A., Metz, H., Drescher, S., Dobner, B., Mäder, K., Blume, A. "Water dynamics in bolaamphiphile hydrogels investigated by ¹H NMR relaxometry and diffusometry" *Journal of Physical Chemistry B* (2011) 115; 14-22
- 173 Goetz, J., Koehler, P. "Study of the thermal denaturation of selected proteins of whey and egg by low resolution NMR" *LWT - Food Science and Technology* (2005) 38; 501-512
- 174 Indrawati, L., Stroshine, R. L., Narsimhan, G. "Low-field NMR: A tool for studying protein aggregation" *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2007) 87; 2207-2216
- 175 Watanabe, T., Murase, N., Staemmler, M., Gersonde, K. "Multiexponential proton relaxation processes of compartmentalized water in gels" *Magnetic Resonance in Medicine* (1992) 27; 118-134
- 176 Li, R., Kerr, W. L., Toledo, R. T., Carpenter, J. A. "¹H NMR studies of water in chicken breast marinated with different phosphates" *Journal of Food Science* (2000) 65; 575-580
- 177 Metz, H., Mäder, K. "Benchtop-NMR and MRI-A new analytical tool in drug delivery research" *International Journal of Pharmaceutics* (2008) 364; 170-175

6. Literatur

- 178 Shimada, K., Cheftel, J. C. "Texture characteristics, protein solubility, and sulfhydryl group/disulfide bond contents of heat-induced gels of whey protein isolate" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1988) 36; 1018-1025
- 179 Döring, R. "Hysterese" *Forschung auf dem Gebiete des Ingenieurwesens* (1943) 14; 148-158
- 180 Alting, A. C., Hamer, R. J., de Kruif, C. G., Visschers, R. W. "Formation of disulfide bonds in acid-induced gels of preheated whey protein isolate" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2000) 48; 5001-5007
- 181 Hansen, L. T., Allan-Wojtas, P. M., Jin, Y.-L., Paulson, A. T. "Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions" *Food Microbiology* (2002) 19; 35-45

7. Publikationsliste

7.1 Artikel

Oidtmann, J., Schantz, M., Mäder, K., Baum, M., Berg, S., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., Schwarz, K., Richling, E. "Preparation and comparative release characteristics of three anthocyanin encapsulation systems" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2012) 60; 844-851

Noack, A., **Oidtmann, J.**, Kutza, J., Mäder, K. "*In vitro* digestion of curcuminoid-loaded lipid nanoparticles" *Journal of Nanoparticle Research* (2012) 14
(DOI: 10.1007/s11051-012-1113-0)

Betz, M., Steiner, B., Schantz, M., **Oidtmann, J.**, Mäder, K., Richling, E., Kulozik, U. "Antioxidant capacity of bilberry extract microencapsulated in whey protein hydrogels" *Food Research International* (2012) 47; 51-57

7.2 Vorträge

Oidtmann, J., Mäder, K. „Nichtinvasive *in vitro* Charakterisierung von Multikapselsystemen“ Abschluss-symposium des AiF / DFG Clusters „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen, Karlsruhe (2011)

Schantz, M., **Oidtmann, J.**, Baum, M., Mäder, K., Berg, S., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., Schwarz, K., Richling, E. „Studien zur kontrollierten Freisetzung und Stabilität von verkapselten Anthocyanen im simulierten Gastrointestinaltrakt“ Lebensmittelchemische Gesellschaft; Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Regionalverbände Nord & Süd-West, Kassel (2011)

Oidtmann, J., Mäder, K. "Analytik von Anthocyanhaltigen mikropartikulären Systemen" 5. Treffen des Projektbegleitenden Ausschusses des AiF / DFG Clusters „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen, Bonn (2011)

Oidtmann, J., Mäder, K. „Anthocyanfreisetzung aus mikropartikulären Systemen“ 5. Doktorandentreffen des AiF / DFG Clusters „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen, Halle (Saale) (2010)

Oidtmann, J., Mäder, K. „Freisetzung von Anthocyanen aus $W_1/O/W_2$ -Doppелеmulsionen

und Molkenproteinmikropartikeln“ 4. Doktorandentreffen des AiF / DFG Clusters „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen, Wien (Österreich) (2010)

Oidtmann, J., Mäder, K. „Analyse von $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsionen mittels Pankreatinassay“ 4. Treffen des Projektbegleitenden Ausschusses des AiF / DFG Clusters „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen, Bonn (2010)

Oidtmann, J., Mäder, K. „Auflösungsuntersuchungen von Molkenproteinmikropartikeln nach Europäischen Arzneibuch“ 3. Doktorandentreffen des AiF / DFG Clusters „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen, Dortmund (2009)

Oidtmann, J., Mäder, K. „Überziehen von festen Arzneiformen unter besonderer Berücksichtigung von Schellack“ 3. Treffen des Projektbegleitenden Ausschusses des AiF / DFG Clusters „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen, Bonn (2009)

Oidtmann, J., Mäder, K. „Charakterisierung von Schellack gecoateten Arzneistoffträgersystemen“ 2. Doktorandentreffen des AiF / DFG Clusters „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen, Berlin (2009)

Oidtmann, J., Mäder, K. „Prüfmethoden der Wirkstofffreisetzung in der Pharmazie“ 2. Treffen des Projektbegleitenden Ausschusses des AiF / DFG Clusters „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen, Göttingen (2009)

Oidtmann, J., Mäder, K. „Untersuchungen an Molkenproteinen als Trägersystem für Mikrokapseln“ 1. Doktorandentreffen des AiF / DFG Clusters „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen, Braunschweig (2008)

7.3 Poster

Schantz, M., **Oidtmann, J.**, Baum, M., Mäder, K., Berg, S., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., Schwarz, K., Richling, E. „Does encapsulation of anthocyanins improve their antioxidative capacity and bioavailability?“ 40. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Halle (Saale) (2011)

Schantz, M., **Oidtmann, J.**, Baum, M., Mäder, K., Berg, S., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S.,

Rehage, H., Schwarz, K., Richling, E. "Encapsulation of bilberry anthocyanins-modulation of gastrointestinal release and antioxidative efficiency" ILSI Europe International Symposium on Health Benefits of Foods, Prag (Tschechien) (2011)

Schantz, M., **Oidtmann, J.**, Baum, M., Mäder, K., Berg, S., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., Schwarz, K., Richling, E. "Antioxidative efficiency and gastrointestinal release of an anthocyanin rich bilberry extract (BE) in comparison to different BE encapsulation systems" 5th International Conference on Polyphenols and Health, Barcelona (Spanien) (2011)

Oidtmann, J., Gedrich, S., Syrowatka, F., Mäder, K. "Development and characterisation of lipid shell anthocyanin microcapsules" Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft Jahrestagung 2010, Braunschweig (2010)

Oidtmann, J., Metz, H., Mäder, K. "Whey Proteins as interesting excipient – a non invasive Benchtop-NMR study" 7th World Meeting on Pharmaceutics and Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Valetta (Malta) (2010)

Oidtmann, J., Metz, H., Reichert, A., Mäder, K. "Non-Invasive Benchtop-NMR Monitoring of Heat Induced Gelation from Whey-Protein-Isolate and Isolated beta-Lactoglobulin" 36th Controlled Release Society Annual Meeting, Kopenhagen (Dänemark) (2009)

Oidtmann, J., Metz, H., Reichert, A., Mäder, K. "Non-Invasive Benchtop-NMR – A Versatile Tool for Monitoring Sol-Gel-Transitions" Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting, Halle (Saale) (2009)

7.4 Berichte

Oidtmann, J., Mäder, K. „Teilprojekt 6: Nichtinvasive *in vitro* und *in vivo* Charakterisierung von Multikapselsystemen“ in: Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen - Zentrale Ergebnisse des gleichnamigen DFG / AiF-Clusterprojektes, 1. Auflage, Forschungskreis der Ernährungsindustrie (FEI) (2011), ISBN: 9783925032493; 73-90

Oidtmann, J., Gedrich, S., Syrowatka, F., Mäder, K. „Charakterisierung von anthocyanhaltigen Lipid-Mikropartikeln“ IZM Jahresbericht 2010 (2011)

8. Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Karsten Mäder für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des Themas, die fachlichen Diskussionen und Anregungen und die vielen Dinge, die ich in meiner Zeit als Doktorand in seiner Arbeitsgruppe lernen durfte.

Mein weiterer Dank gilt:

- Herrn Dr. rer. nat. Hendrik Metz für die fachlichen Diskussionen, die Unterstützung bei zahlreichen experimentellen Fragestellungen bezüglich der Benchtop-NMR und der ESR sowie für die zahlreichen gemeinsamen Reisen zu Projekttreffen des Clusters.
- der gesamten Arbeitsgruppe „Pharmazeutische Technologie“, die nicht nur Kollegen sondern auch Freunde waren und sind. Hierbei gilt mein Dank insbesondere
 - Frau Susanne Gedrich für die Hilfe bei der Entwicklung der Lipidmikrokapseln,
 - Frau Sandra Klein für die Einarbeitung in das Gebiet des Pankreatintests,
 - Herrn Andreas Schädlich für die Hilfe bei Fragestellungen am Computer,
 - Herrn Stefan Hoffmann für die Unterstützung bei der Erstellung der Konfokalmikroskopischen Aufnahmen,
 - Frau Kerstin Schwarz für die DSC Messungen,
 - Frau Ute Mentzel für die Unterstützung bei diversen Freisetzungsexperimenten,
 - Frau Dr. rer. nat. Sandra Strübing und Frau Dr. rer. nat. Sabine Kempe für das kritische Lesen des Manuskriptes.
- Frau Sarah Ruth Brownlee und Frau Cintia Maruiama bei der Unterstützung im Labor.
- Frau Anke Hinder für die Einarbeitung in die HPTLC-Analytik.
- Herrn Dr. rer. nat. Michael Hacker für die Unterstützung bei den rheologischen Messungen am Texture Analyzer und am Rotationsviskosimeter.
- den Mitgliedern DFG / AIF Clusterprojekt "Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen" für die gewinnbringende Zusammenarbeit und den guten Austausch. Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Markus Schantz für die reibungslose Zusammenarbeit bei der HPLC-Analytik der Freisetzungsversuche sowie bei der Erstellung der gemeinsamen Veröffentlichung in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. rer. nat. habil. Elke Richling.
- der AG Biopharmazie für die Zusammenarbeit auch außerhalb der Laborroutine.
- den Pharmaziestudenten, mit denen ich stets viel Freude im Labor hatte.

Ich bedanke mich bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben, die mir vieles ermöglicht haben und immer für mich da sind. Ich danke meiner Frau, die mit ihrer Liebe, ihrem Verständnis und ihrer Hilfe zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

9. Lebenslauf

Name: Oidtman
Vorname: Johannes Martin
geboren am: 30. August 1982
Geburtsort: Berlin (Wilmerdorf)

Schulbildung

August 1988 – Juni 1994 Ruppin Grundschule, Berlin (Schöneberg)
August 1994 – Juni 2001 Rheingau Gymnasium, Berlin (Schöneberg)
Juni 2001 Abitur

Zivildienst

September 2001 – Juli 2002 Apotheke des Universitätsklinikums Benjamin Franklin
FU Berlin, Berlin

Berufsausbildung

Oktober 2002 – September 2006 Studium der Pharmazie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
März 2005 1. Staatsexamen
September 2006 2. Staatsexamen
Oktober 2006 – März 2007 Diplomarbeit (Dipl.-Pharm.)
„Entwicklung nanoskaliger Systeme für die ESR
basierten Messungen von Sauerstoffpartialdrücken und
pH-Werten“ AG Prof. Dr. Karsten Mäder
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
April 2007 – September 2007 Pharmaziepraktikant
Ratsapotheke, Wismar
November 2007 3. Staatsexamen
Dezember 2007 Approbation als Apotheker
Juli 2008 akademischer Grad: Diplompharmazeut (Dipl.-Pharm.)

Berufstätigkeit

August 2002 – September 2002 Aushilfskraft
Apotheke des Universitätsklinikums Benjamin Franklin
FU Berlin, Berlin
Januar 2008 – November 2011 wissenschaftlicher Mitarbeiter (Promotion zum Dr. rer
nat.)
„Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten
Multikapselsystemen“
AG Prof. Dr. Karsten Mäder
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
April 2008 – November 2011 Nebentätigkeit als Apotheker (Chefvertretung)
Apotheke im Magistralen-Carré, Halle (Saale)
seit Dezember 2011 Apotheker
HELIOS Klinikum Sangerhausen

10. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich gemäß § 5 der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultäten I - III und des Zentrums für Ingenieurwissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg an Eides statt, dass ich die vorgelegte Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Ich habe noch keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen. Die vorliegende Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle (Saale), den 06. November 2012

Johannes Oidtmann