

3 Material und Methoden

3.1 HPLC- und CE-Methoden

HPLC-Methode 1

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

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

HPLC-Methode 2

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

Alle Proben wurden jeweils doppelt injiziert.

HPLC-MS-Methode 1

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

Alle Proben wurden jeweils doppelt injiziert.

CE-Methode 1

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

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

CE-Methode 2

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

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

CE-Methode 3

Zweck: Quantifizierung des Sauerstoffverbrauchs und der Entstehung von H₂O₂

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

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

Validierung der Methoden

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

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

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

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

3.2 Herstellung und Charakterisierung der Extrakte

Herstellung der Flüssigextrakte

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

Gefriertrocknung

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

Bestimmung Trockenrückstand

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

Quantifizierung von Fagopyrin

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

Gehalt phenolische Substanzen

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

Antioxidative Eigenschaften DPPH

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

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

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

Bestimmung der Grünfärbung

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

Gehaltsbestimmung der Drogen

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

3.3 Charakterisierung der UV-Absorptionsfähigkeit

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

- kritische Wellenlänge λ_c [57]

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

- UVA/UVB-Quotient R [57]

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

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

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

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

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

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

3.4 Untersuchungen zur Wirksamkeit

Verhinderung der Ketoprofen-induzierten Linolsäure-Peroxidation

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

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

3.5 Zellkultur

Kultivierung und Versuchsdurchführung

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

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

Kristallviolett-Assay

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

3.6 HET-CAM-Versuche

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

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

3.7 Photostabilität

Sauerstoffverbrauch

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

Photostabilität Festfilm

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

Photostabilität Lösung

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

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

3.8 Präformulierungsstudien

Untersuchung zur Hygroskopizität

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

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

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

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

Untersuchung zur Löslichkeit

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

Verteilungskoeffizient

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

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

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

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der verwendeten Mikroemulsionen

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

Untersuchungen an Mikroemulsionen

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

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

3.9 Stabilitätsuntersuchungen

Stabilität des Extraktes in Abhängigkeit von der relativen Feuchte

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

Stabilität des Extraktes in topischen Formulierungen

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

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

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

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

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

Stabilisierung mit Ascorbinsäure

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

3.10 Liberationsuntersuchungen am Mehrschichtmembranmodell

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

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

3.11 Penetrationsuntersuchungen an der Franz-Zelle

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

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

3.12 Statistische Auswertung

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

3.13 Verwendete Substanzen

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

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

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

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

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

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