

**Herstellung und Charakterisierung eines  
 $\beta$ -Cyclodextrin / Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt-Komplexes  
als Wirkkomponente einer halbfesten Arzneiform**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2002

vorgelegt von

Katharina Joanna Waleczek

Tag der mündlichen Prüfung:

24. Mai 2002

Dekan: Prof.

Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. P.C. Schmidt

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. S. Laufer

Die vorliegende Arbeit entstand unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. P. C. Schmidt

am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Meinem verehrten Lehrer und Doktorvater, Herrn Prof. Dr. P.C. Schmidt, danke ich für die Schaffung exzellenter Arbeitsbedingungen und seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Seine hervorragende Betreuung und Unterstützung war mir stets eine große Hilfe. Die Möglichkeit der Teilnahme an Weiterbildungsveranstaltungen zur Fachapothekerin für Pharmazeutische Technologie sowie an Kongressen und Seminaren haben die Entstehung dieser Arbeit sehr gefördert.

Bei der Firma Robugen GmbH, vornehmlich vertreten durch Herrn Dr. B. Hempel, bedanke ich mich sowohl für die finanzielle und materielle Unterstützung dieser Arbeit als auch für die gute Zusammenarbeit.

Frau Prof. Dr. Helena Maria Cabral Marques danke ich für die fachliche Unterstützung und die nette Zusammenarbeit bei der Erstellung von Phasen-Löslichkeits-Diagrammen.

Herrn Roland Walker danke ich für die Herstellung von Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt. Außerdem möchte ich mich bei ihm sowie bei Frau Renate Beer und Herrn Klaus Weyhing für ihre hilfsbereite und freundschaftliche Art bedanken, die mir bei der Bewältigung von kleinen und großen Problemen geholfen hat.

Herrn Dr. Karl G. Wagner danke ich für die Durchführung des Molecular-Modellings.

Herrn Geiger und seinem Werkstatt-Team gilt ein Dank für viele kleine Reparaturen, Anregungen und Hilfen bei gerätetechnischen Problemen. Den Herren Luz und Walker (Junior) in der Chemikalienausgabe danke ich für ihre unkomplizierte und schnelle Hilfe und die stets freundliche Art.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meinen ehemaligen und derzeitigen Kolleginnen und Kollegen für die nette Aufnahme im „Schwabenländle“, das hervorragende Arbeitsklima, den guten Austausch und die konstruktive Zusammenarbeit bedanken. Sie trugen stets dazu bei, dass die Arbeit mir Spaß und Freude bereitete. Es war mir

ein großes Vergnügen, mit den Damen Hélène Rey und Claudia Kaiser das Labor, wie auch mit Simone Schiermeier die Freuden und Sorgen teilen zu dürfen.

Bei Frau Claudia Kaiser, Frau Tanja Duda und Herrn Erik Schmidt-Wergifosse bedanke ich mich für das sorgfältige Korrekturlesen des Manuskripts, Herrn Harald Römpp für die sprachliche Unterstützung beim Erstellen der Publikationen.

Nicht zuletzt danke ich meinem lieben Freund Hans-Peter L ammle für seine Geduld und Unterstützung, die für das Gelingen dieser Arbeit sehr wichtig waren.

**Für meine Eltern**

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorgestellt beziehungsweise sind zur Publikation eingereicht:

- K. J. Waleczek, B. Hempel, P. C. Schmidt – “Inclusion compounds of (-)- $\alpha$ -bisabolol with  $\beta$ -cyclodextrin” – Poster, DPhG Jahrestagung, Frankfurt 1999; Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 331, Suppl. 2, 1-66 (1999)
- K. J. Waleczek, B. Hempel, P. C. Schmidt – “Inclusion of supercritical camomile-CO<sub>2</sub>-extract into  $\beta$ -cyclodextrin – quantitative aspects” – Poster, DPhG Doktorandentagung Frankfurt 2001, Arch. Pharm. Pharm Med. Chem. 333, Suppl. 2, 1-28 (2001)
- K. J. Waleczek, B. Hempel, P. C. Schmidt – “Preparation and stability of a camomile ointment containing a supercritical carbon dioxide camomile extract/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex” – S.T.P. Pharma Sci., eingereicht.
- K. J. Waleczek, H. M. Cabral Marques, B. Hempel, P. C. Schmidt – “Phase solubility studies of pure (-)- $\alpha$ -bisabolol and camomile essential oil with  $\beta$ -cyclodextrin” – Eur. J. Pharm. Biopharm., eingereicht.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	1
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b>	4
2.1	Charakterisierung und Anwendung der Cyclodextrine	4
2.2	Überkritischer Kamillen-CO <sub>2</sub> -Extrakt	11
<b>3</b>	<b>GC-Analytik der Kamilleninhaltsstoffe</b>	13
<b>4</b>	<b>Bestimmung der Stabilitätskonstanten von ausgewählten Kamillen- inhaltsstoffen mit <math>\beta</math>-Cyclodextrin</b>	20
4.1	Theorie und Literaturüberblick	20
4.2	Berechnung der Konstanten für Komplexe aus $\beta$ -Cyclodextrin und (-)- $\alpha$ - Bisabolol-Reinsubstanz bzw. $\beta$ -Cyclodextrin und Bestandteilen von Kamillenöl	28
4.3	Diskussion der Ergebnisse	33
<b>5</b>	<b>Herstellung und Charakterisierung der Komplexe</b>	34
5.1	Literaturüberblick	34
5.2	Herstellung und Analytik der Komplexe nach der Lösungsmethode	36
5.2.1	Einfluss der Zeit und der molaren Zusammensetzung auf die Bildung des Komplexes mit (-)- $\alpha$ -Bisabolol-Reinsubstanz	38
5.2.2	Bestimmung des freien und eingeschlossenen Anteils von ausge- wählten Inhaltsstoffe im $\beta$ -Cyclodextrin / Kamillenöl-Komplex	42
5.3	Herstellung und Analytik der Komplexe nach der Knetmethode	48
5.3.1	Versuche mit (-)- $\alpha$ -Bisabolol und Kamillenöl	49
5.3.2	Versuche mit Kamillen-CO <sub>2</sub> -Extrakt	53
5.4	Haltbarkeitsuntersuchungen des $\beta$ -Cyclodextrin / Kamillen-CO <sub>2</sub> -Extrakt- Komplexes	58
5.5	Diskussion der Ergebnisse	60

<b>6</b>	<b>Herstellung und Charakterisierung einer Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt – haltigen Creme</b>	<b>63</b>
6.1	Literaturüberblick	63
6.2	Auswahl der Grundlage	65
6.3	Herstellung und Analytik der Creme	70
6.4	Haltbarkeitsuntersuchungen	75
6.5	Diskussion der Ergebnisse	76
<b>7</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>78</b>
7.1	Materialien	78
7.1.1	Kamillenblüten	
7.1.2	β-Cyclodextrine	
7.1.3	Standardsubstanzen	
7.1.4	Lösungsmittel und Chemikalien	79
7.1.5	Sonstige Materialien	81
7.1.6	Geräte zur allgemeinen Verwendung	82
7.1.7	Datenverarbeitung	83
7.2	Analytik	83
7.2.1	Gaschromatographie	83
	7.2.1.1.1 Gehaltsbestimmung	88
	7.2.1.1.2 Wiederfindungsrate aus einer wässrigen Lösung	88
	7.2.1.1.3 Wiederfindungsrate aus einer Cyclodextrin-Lösung	89
7.2.2	Bestimmung der freien und eingeschlossenen Inhaltstoffe	89

7.2.2.1	Löslichkeitsmethode	89
7.2.2.2	Knetmethode	90
7.2.3	Bestimmung des Wassergehaltes nach Karl-Fischer	90
7.2.4	Messung der Oberflächenspannung	91
7.3	Extraktion der Kamillenblüten	92
7.3.1	Wasserdampfdestillation	92
7.3.2	CO <sub>2</sub> -Extraktion	92
7.4	Herstellung der Cyclodextrin-Einschlussverbindungen	93
7.4.1	Phasen-Löslichkeits-Diagramm	93
7.4.2	Löslichkeitsmethode	93
7.4.3	Knetmethode	94
7.5	Herstellung der Kamillencreme	94
7.5.1	Rezepturenentwicklung	94
7.6	Stabilitätsuntersuchungen	96
7.6.1	Einlagerung der Proben	96
7.6.2	Probennahme und Probenaufbereitung	96
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>97</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>102</b>
<b>10</b>	<b>Anhang</b>	<b>125</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Art.-Nr.	Artikelnummer
Auflg.	Auflage
bidest.	bidestilliert
$\beta$ -CD	$\beta$ -Cyclodextrin
bzw.	Beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
$c_0$	Anfangskonzentration
Ch.-B.	Chargenbezeichnung
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CTG-ase	Cycloglycosyltransferase
DAB	Deutsches Arzneibuch
D	Deutschland
DMSO	Dimethylsulfoxid
DM- $\beta$ -CD	Dimethyl- $\beta$ -Cyclodextrin
EG	Europäische Gemeinschaft
EID	En-In-Dicycloether
EMA	The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
et al.	et alii
Fa.	Firma
FAO	Food and Agriculture Organisation
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
HP- $\beta$ -CD	Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin
I.D.	Innendurchmesser
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
Kap.	Kapitel
Konz.	Konzentration

Me- $\beta$ -CD	Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin
min	Minuten
$M_r$	Relative Molekulmasse
p.a.	pro analysi
Ph. Eur.	Pharmacopoe Europea
r.F.	relative Feuchte
relsdv	relative Standardabweichung
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s.o.	siehe oben
sdv	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
USP	United States Pharmacopeia
V/V	Volumenteile
var	Varianz
Vers.	Version
WHO	World Health Organisation

**Besondere Hinweise:**

- Fehlerbalken in den Abbildungen geben den 95 % Vertrauensbereich des Mittelwerts an.
- Gesetzlich geschützte Warenzeichen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet.

## **Kapitel 1**

### **Einleitung und Zielsetzung**

Die echte Kamille (*Chamomilla recutita* (L.) RAUSCHERT) ist eine der gebräuchlichsten Arzneipflanzen. Die Inhaltsstoffe sind chemisch und pharmakologisch sehr gut charakterisiert (Carle und Isaac 1985, Hölzl 1989). Die Wirkung der Kamille ist nicht auf eine einzelne Substanz oder eine Substanzgruppe zurückzuführen. Vielmehr beruht die Gesamtwirkung der Kamille auf teilweise chemisch sehr unterschiedlichen Stoffen. Die vielfältige Heilwirkung der Kamille wird schon in der Antike beschrieben, und auch heute noch hat die Kamille in der Therapie verschiedenster Krankheitsbilder einen hohen Stellenwert.

Die Inhaltsstoffe der Kamille lassen sich in eine lipophile Gruppe, der hauptsächlich die antiphlogistischen Wirkungen zuzuordnen sind, und eine hydrophile Gruppe, darunter die spasmolytisch wirkenden Flavonoide, einteilen. Zu den lipophilen Inhaltsstoffen gehören die Hauptbestandteile des ätherischen Öls, also (-)- $\alpha$ -Bisabolol, die Bisabololoxide, die En-In-Dicycloether und das Matricin bzw. sein Zersetzungsprodukt, das Chamazulen. Einer der wichtigsten Inhaltsstoffe ist (-)- $\alpha$ -Bisabolol, dessen antiphlogistische Wirkung bereits 1954 von Janku und Zita beschrieben wurden.  $\beta$ -Farnesen zeigt ebenfalls antiphlogistische Eigenschaften, die jedoch weniger stark ausgeprägt sind. Wie Untersuchungen an Meerschweinchen ergeben haben, bewirkt (-)- $\alpha$ -Bisabolol eine stärkere Durchblutung, in Kombination mit  $\beta$ -Farnesen fördert es die Epithelisierung und Granulation. Außerdem zeigt (-)- $\alpha$ -Bisabolol eine antipyretische und ulkusprotektive bzw. -curative Wirkung. Die cis- und trans-En-In-Dicycloether (syn. Spiroether), zwei mehrfach ungesättigte Polyine, sind an der Zellgewebsregeneration und der Entzündungshemmung beteiligt (Schilcher 1987, Ammon et al. 1996).

Es ist verständlich, dass bei der Extraktion von Kamillenblüten je nach Polarität des Menstruums die Zusammensetzung und damit die Wirkung des Extraktes variiert. Ein wässriger Teeaufguss weist ein anderes Wirkstoffmuster auf als ein wässrig-

alkoholischer Extrakt. Die bisherigen Extraktionsmethoden reichen von der Wasserdampfdestillation zur Gewinnung des ätherischen Öles über die Extraktion mit lipophilen Lösungsmitteln bis zur Extraktion mit polaren Wasser/Ethanol-Gemischen. Ein neueres Verfahren ist die Extraktion mit überkritischen Gasen.

Bei den ätherischen Ölen handelt es sich allerdings nicht nur um eine wirksame, sondern auch um eine sehr empfindliche Substanzklasse. Problematisch ist vor allem ihre hohe Flüchtigkeit sowie ihre Instabilität gegenüber Licht, Sauerstoff und Wasser. So wandelt sich das genuin in Kamillenblüten vorkommende Matricin besonders in saurer, wässriger Lösung unter Blaufärbung in Chamazulen um, welches seinerseits bei niedrigen pH-Werten und unter Einfluss von Licht, Luft und erhöhten Temperaturen weiteren Abbauprozessen unterliegt (sog. „Vergrünungsreaktion“). (-)- $\alpha$ -Bisabolol ist oxidationsempfindlich und reagiert zu Bisabololoxiden. Zu den empfindlichen Substanzen im ätherischen Kamillenöl und in den Kamillenextrakten zählen die En-Indicycloether. Neben der Zersetzung zu bisher unbekanntem Produkten kann eine Isomerisierung von der mengenmäßig dominierenden cis- zur trans-Form stattfinden (Vogel 1992).

Es wurden viele Versuche zur Stabilisierung der Extrakte unternommen, so z. B. die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels, die Optimierung des pH-Wertes, der Zusatz von Stabilisatoren oder die Wahl einer geeigneten Verpackung. Eine Übersicht über Publikationen zu dieser Problematik gibt Soyke (1991).

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, die wertbestimmenden Bestandteile eines mit überkritischen Kohlendioxid hergestellten Kamillenextraktes durch den Einschluss in  $\beta$ -Cyclodextrin zu stabilisieren. Im Mittelpunkt steht die Herstellung eines stabilen, gut dosierbaren, geruchlosen Komplexes, seine Charakterisierung und die Untersuchung seiner Haltbarkeit. Die zwei wichtigsten Herstellungsmethoden, die Löslichkeits- und die Knetmethode, werden auf ihre Vor- und Nachteile bei der Bildung des Komplexes untersucht und miteinander verglichen. Am Beispiel der Leitsubstanz (-)- $\alpha$ -Bisabolol wird die Stabilitätskonstante des Komplexes mit  $\beta$ -Cyclodextrin berechnet.

Dieser Komplex wird in eine Creme eingearbeitet. Die entzündungshemmenden Eigenschaften der Creme können bei der Therapie von Neurodermitis genutzt werden. Erste Versuche am UV-Erythem des Menschen zeigten eine antiphlogistische Wirksamkeit gegenüber der Cremegrundlage (Robugen GmbH; unveröffentlichte Ergebnisse). Die Entwicklung und die Charakterisierung dieser Creme und Untersuchungen zu ihrer Haltbarkeit sind daher ein weiterer wichtiger Aspekt der vorliegenden Arbeit.

## Kapitel 2

### Literaturübersicht

#### 2.1 Charakterisierung und Anwendung der Cyclodextrine

In einer Übersicht aus dem Jahre 1998 (Szejtli 1998) beschreibt Szejtli die Meilensteine der Entdeckung und Entwicklung der Cyclodextrine wie folgt:

Cyclodextrine werden erstmals 1891 von Villiers als Abbauprodukte der Stärke isoliert, aber erst 1904 von Schardinger als cyclische Oligosaccharide charakterisiert. Er entdeckt  $\alpha$ - und  $\beta$ -Cyclodextrin sowie die Bildung von Jod/Cyclodextrin-Komplexen. Die Bildung der Komplexe und die unterschiedliche Färbung von Jod mit  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Cyclodextrin ermöglichen die Unterscheidung der Cyclodextrine. Freudenberg et al. beschreiben 1938 den Aufbau der Cyclodextrine aus  $\alpha$ -1, 4 verbundenen Glucoseeinheiten. Die Molekulargewichte, der am häufigsten vorkommenden  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD können jedoch erst viel später bestimmt werden. 1950 arbeiten French et al. und Cramer et al. an der enzymatischen Produktion der CD und an der Charakterisierung der chemischen und physikalischen Eigenschaften. Freudenberg, Cramer und Pliening patentieren 1953 die wichtigsten Anwendungen von CD in Arzneiformen. Sie zeigen u.a. die Verbesserung der Löslichkeit von Substanzen oder die Stabilisierung von flüchtigen Stoffen nach der Komplexbildung. French (1957), Thoma und Stewart (1965) und Cesar (1968) beschreiben die ersten Untersuchungen zur Toxizität von  $\beta$ -CD an Ratten und stellen ihre hohe Toxizität fest. Seit achtziger Jahre werden  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD immer preiswerter produziert und ständig neue CD-Derivate entwickelt.

#### *Struktur der Cyclodextrine*

Cyclodextrine sind cyclische Oligosaccharide, die durch enzymatischen Abbau von Stärke durch die Cycloglycosyltransferase (CTG-ase) von Bacillus-, Micrococcus-Arten und Klebsiella pneumonia entstehen.

Sie bestehen aus  $\alpha$ -D-Glucoseeinheiten, die über 1,4-glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Nach der Anzahl der an einem Ringaufbau beteiligten Glucose-Einheiten werden verschiedene CD-Homologe unterschieden. Die wichtigsten CD bestehen aus 6, 7 oder 8 Glucosemolekülen und werden als  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD bezeichnet, höhere Cyclooligomere haben bislang keine breite Verwendung gefunden. Der Hohlraum der CD hat entsprechend der Anzahl der verknüpften Glucosemoleküle einen Durchmesser von 0,6 nm, 0,75 nm bzw. 0,9 nm (Szejtli 1991).

Abb. 2.1 zeigt die molekulare Struktur von  $\beta$ -CD. Die Glucosemoleküle liegen in der  $C_1$ -Sesselkonfiguration vor. Das CD-Gerüst wird durch intramolekulare Wasserstoffbrücken zwischen den OH-Gruppen angrenzender Glucoseeinheiten stabilisiert (Frömming und Szejtli 1994, Szejtli 1998). Da keine freie Drehbarkeit um die  $\alpha$ -1,4-glycosidischen Veknüpungen der Glucopyranose-Einheiten besteht, weisen die CD eine konische Anordnung auf. Die engere Öffnung weist am C-Atom in Position 6 eine OH-Gruppe auf, während die weitere Öffnung von zwei OH-Gruppen an den Positionen 2 und 3 besetzt ist (Abb. 2.1) (Saenger 1980).

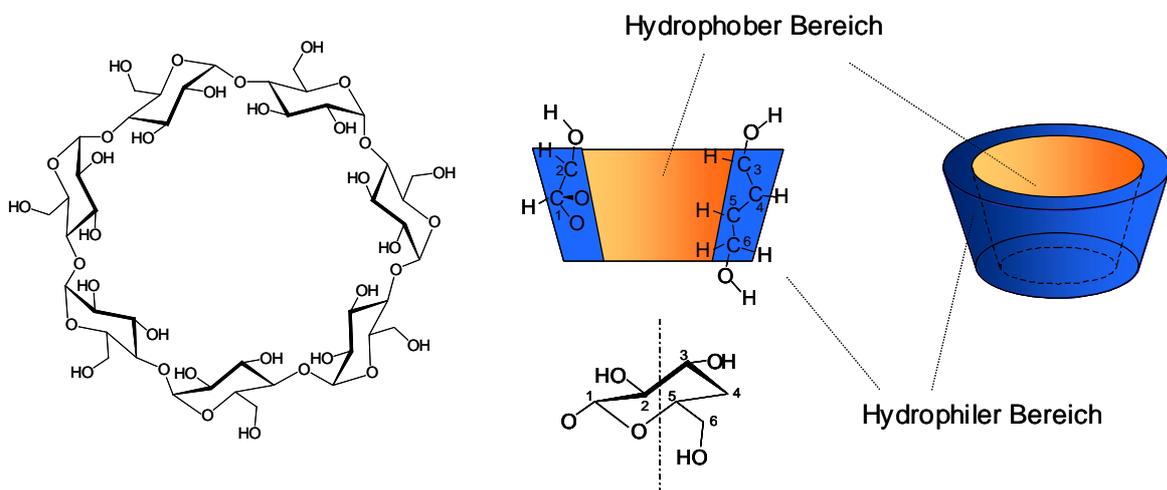


Abb. 2.1 Struktur von  $\beta$ -CD; molekulare Struktur und dreidimensionale Anordnung

Für die begrenzte Wasserlöslichkeit der CD sind die Hydroxylgruppen an der Außenseite verantwortlich. Bei Raumtemperatur wurden folgende Löslichkeitswerte ermittelt (Frömming und Szejtli 1994):

14,5 g  $\alpha$ -CD/100 ml Wasser, 1,85 g  $\beta$ -CD/100 ml und 23,2 g  $\gamma$ -CD/100 ml. Mit steigender Temperatur erhöht sich die Löslichkeit der CD. Sie beträgt z. B. bei 35 °C 20,4 g  $\alpha$ -CD/100 ml, 2,83 g  $\beta$ -CD/100 ml und 39,0 g  $\gamma$ -CD/100 ml. Bei 60 °C lösen sich bereits 7,5 g  $\beta$ -CD in 100 ml Wasser. Der innere Hohlraum der CD besteht dagegen nur aus C-C- und C-H-Bindungen sowie aus glycosidischen Sauerstoffbrücken, was dazu führt, dass der Hohlraum des CD-Moleküls durch eine hohe Elektronendichte und durch einen weitgehend hydrophoben Charakter gekennzeichnet ist.

Die Löslichkeit verschlechtert sich in den meisten organischen Lösungsmitteln, da die Lösungsmittel selbst relativ stabile Komplexe mit CD eingehen.  $\beta$ -CD ist in reinem Methanol, Ethanol, Isopropanol, Aceton und Chloroform unlöslich, in 50%igem Ethanol lösen sich 1,3 g/100 ml. Pyridin, Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid erweisen sich gleichermaßen geeignet, um  $\beta$ -CD zu lösen (ca. 35 g/100 ml) (Frömming und Szejtli 1994). Die wichtigsten physikalisch-chemischen Eigenschaften der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD sind in Tab. 2.1 zusammengefasst.

Tab. 2.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften der Cyclodextrine (Szejtli 1998, Cabral Marques 1994a)

	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
Anzahl der Glucose Moleküle	6	7	8
Molekulargewicht	972	1135	1297
Löslichkeit in Wasser bei 25 °C [g/100 ml]	14,5	1,85	23,2
Hohlraumdurchmesser [nm]	0,47 – 0,53	0,6 – 0,65	0,75 – 0,83
Höhe des Torus [nm]	0,79 $\pm$ 0,01	0,79 $\pm$ 0,01	0,79 $\pm$ 0,01
Äußerer Durchmesser [nm]	1,46 $\pm$ 0,04	1,54 $\pm$ 0,04	1,75 $\pm$ 0,04
Hohlraumvolumen von 1 mol CD [ml]	104	157	256
Kristallwasser [%] m/m	10,2	13,2 – 14,5	8,13 – 17,7
Schmelzpunkt [°C]	$\approx$ 275	$\approx$ 280	$\approx$ 275

### *Biochemische Eigenschaften und Toxizität*

Die biochemischen Eigenschaften der CD lassen sich durch Betrachtung der enzymatischen Spaltung beschreiben. CD sind weitgehend resistent gegen den Abbau von  $\beta$ -Amylasen, die lineare Polysaccharide vom Ende her abbauen (Gerloczy et al. 1986). Mit wenigen Ausnahmen kann man feststellen, dass CD weder fermentiert noch von Hefe verwertet werden. Oral gegebene CD werden überwiegend von den Mikroorganismen des Dickdarms metabolisiert, was den entscheidenden Unterschied zum Stärkeabbau, der im Dünndarm stattfindet, darstellt. 1963 finden Andersen et al. an Ratten heraus, dass  $\alpha$ - und  $\beta$ -CD ähnlich wie die Stärke in Gewebe und Organen gespeichert werden. Durch die radioaktive Markierung von C-Atomen in Stärke und CD konnte der Abbau der Substanzen im ausgeatmeten  $\text{CO}_2$  nachgewiesen werden (Szejtli 1987).

Die pharmazeutischen und nahrungsmittelchemischen Anwendungsmöglichkeiten für die süßlich schmeckenden Cyclodextrine hängen entscheidend von ihren Einwirkungen auf tierische Organismen ab. Die zunächst für Ratten festgestellte Toxizität von  $\beta$ -CD beruhte wahrscheinlich darauf, dass das eingesetzte  $\beta$ -CD verunreinigt war (Thomas und French 1957 – zitiert von Saenger 1980).

Tests zur akuten Toxizität von  $\beta$ -CD an Mäusen und Ratten ergeben so hohe  $\text{LD}_{50}$ -Werte, dass kaum von einer schädlichen Wirkung gesprochen werden kann. Bei Mäusen sind es mehr als 3 g/kg und bei Ratten 5 g/kg (Marques 1994b). Uekama und Otagiri (1987) berichten sogar von 10 g/kg. Ähnlich sind Langzeit-Tests zu deuten, die über 6 – 9 Monate an Ratten, Kaninchen und Beagle-Hunden durchgeführt wurden (Gergely et al. 1981). Bei einer Fütterung von 0,2, 0,4, und 0,6 g  $\beta$ -CD/kg Körpergewicht über einen Zeitraum von 6 Monaten können keine anatomischen Veränderungen an Ratten und Hunden festgestellt werden; embryotoxische oder teratogene Effekte sowie Mutationen sind bei Ratten nicht zu beobachten. Andere Untersuchungen an Ratten zeigen, dass bei täglicher subcutaner, intraperitonealer oder intravenösen Gabe von 0,45 g  $\beta$ -CD/kg Körpergewicht Nekrosen des Nierengewebes auftreten. Bei Dosen von 0,1 g/kg die 1-, 2-, 4- oder 7-mal täglich verabreicht werden, treten keine Schädigungen auf.

Nach Berichten der Food and agriculture organisation (FAO) werden CD als enzymatisch modifizierte Stärke betrachtet und gelten damit als toxikologisch unbedenklich.  $\beta$ -CD ist eine lebensmittelrechtlich zugelassen Substanz (EG-Richtlinie 1995 Anhang IV).

Auf den speziellen, für diese Arbeit relevanten Fall der Toxizität bei kutaner Anwendung wird in Kapitel 6 ausführlich eingegangen.

### *Anwendung der Cyclodextrine*

In den Einschlusskomplexen ist jedes Gastmolekül individuell von CD umschlossen und damit – mikroskopisch betrachtet – verkapselt. Da hierdurch die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Gastmoleküle vorteilhaft verändert werden können, wurden Versuche unternommen, die Einschlussverbindungen mit CD für Arznei-, Nahrungs- und Pflanzenschutzmittel sowie für Kosmetika zu nutzen. Folgende Effekte können im Hinblick auf einen pharmazeutischen Einsatz durch die Bildung der Einschlussverbindungen erreicht werden:

- Verbesserung der Stabilität
- Verbesserung der Löslichkeit und der Bioverfügbarkeit
- Überführung flüssiger Stoffe in feste Zubereitungen
- Fixierung von leichtflüchtigen Stoffen
- Überdeckung eines unangenehmen Geruchs und Geschmacks
- Vermeidung von Wechselwirkungen des eingeschlossenen Stoffes mit anderen Bestandteilen der Arzneiform; Reduzierung der Toxizität
- Herstellung cholesterinärmer Nahrung
- Trennung von Enantiomeren

Die Stabilisierung empfindlicher Substanzen ist das älteste Anwendungsgebiet der CD (Frömmling 1973). In einer großen Zahl von Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass empfindliche Substanzen nach CD-Einschluss weitgehend vor hydrolyti-

scher, oxidativer und photochemischer Zersetzung oder Dehydratisierung geschützt werden. Zum Beispiel verringert der Einschluss von Desmopressin in HP-( $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -CD) den Abbau durch ein im Darm vorhandenes Enzym  $\alpha$ -Chymotrypsin (Fredholt et al. 1999). Flüchtige Substanzen, wie z. B. ätherische Öle, werden durch den Einschluss geschützt (Szente und Szejtli 1988, Szente et al. 1988, Vincieri et al. 1988, Buschman et al. 1991). Zur inhalativen Therapie verwendeter Campher, Menthol, Eukalyptusöl und Chinin können als Komplexe mit  $\beta$ -CD stabilisiert werden (Gal-Fuzy et al. 1984). In Ungarn ist dieses Produkt unter den Namen Diapulmon® zugelassen. Die Flüchtigkeit von Salicylsäure (Frömming et al. 1972) oder Nitroglycerin (Yamaoka et al. 1981) kann nach Komplexierung ebenfalls verringert werden. Nitroglycerin verliert dadurch seinen explosiven Charakter und kann gefahrlos weiter verarbeitet werden (Saenger 1980).

Die recht empfindlichen Steroide werden nach Einschluss in HP- $\beta$ -CD gefriergetrocknet und können ohne weitere Zusätze zu Tabletten verpresst werden (Pitha und Pitha 1985).

Wie bereits erwähnt ist die Verbesserung der Löslichkeit und damit oft auch der Bioverfügbarkeit ein weiterer Vorteil von CD. Am Beispiel einiger Substanzen kann dies gezeigt werden. Durch den Einschluss von Miconazol und Econazol in HP- $\beta$ -CD kann die Dosierung reduziert und somit die Toxizität der Substanzen herabgesetzt werden (Jacobsen et al. 1999). Weitere Beispiele sind: Tricolosan/ $\beta$ -CD Komplex (Lofftson et al. 1999), Cotrimazol/DM- $\beta$ -CD (Ahmed et al. 1998); Ketoprofen/Me- $\beta$ -CD,  $\beta$ -CD (Mura et al. 2001), Amphotericin-B/ $\gamma$ -CD (Rajagopalan et al. 1985); Nimesulid/ $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD) (Roselli et al. 1999) und Acetohexamid/ $\beta$ -CD (Uekama et al. 1980). Dies stellt nur eine kleine Auswahl der zahlreichen Publikationen zu diesem Thema dar.

In der Kosmetikindustrie finden die CD ebenfalls breite Verwendung, z. B. in Form von Deodorant gegen Mund- oder Körpergeruch, als Shampoo gegen schnellfettende Haare oder als Makeup-Entferner, in Seifen, Zahnpasta und viele anderen Produkten. Duchene et al. (1991a) geben in einem Kapitel über „Cyclodextrine in der Kosmetik“ eine gute Übersicht über diese Produkte und ihre jeweiligen Patente. In Frankreich befinden sich zwei Shampoos von Laboratories Klorane (Pierre Fabre) auf dem Markt,

die CD enthalten. Haar-Farben können nach dem Einschluss in CD länger haltbar gemacht werden. Szente et al. (1998) berichten auch von dem positiven Effekt der Stabilisierung von natürlichen Farbstoffen, wie Curcumin und Carotinoiden in CD-Derivaten.

Die Textilindustrie nutzt die Eigenschaften der CD zum Fixieren von unangenehmen Gerüchen wie Zigaretten oder Schweißgeruch (Buschmann et al. 2001).

Seit 1995 ist die Anwendung der  $\beta$ -CD in der Lebensmittelindustrie erlaubt (USP25/NF20, EG-Richtlinie) und  $\beta$ -CD wird als E 459 deklariert. JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) und WHO erlauben 6 mg/kg Körpergewicht/Tag. Die Informationen sind auf der Homepage der Firma Cyclodex vorhanden. Z. B. patentierten Szejtli et al. bereits 1978 die Komplexierung von Allicin. Die antibakteriell, antifungizid, antisklerotisch wirkende, aber übelriechende Substanz aus Knoblauch wird nach dem Einschluss geruchsneutral. In USA, Deutschland und Ungarn sind Knoblauch/ $\beta$ -CD-haltige Produkte als Nahrungsergänzungsmittel auf dem Markt (Tedra, Xund, Allidex, Garlessence).

Die hohe Affinität des Cholesterol zu  $\beta$ -CD wird zur Herstellung cholesterinfreier Nahrung genutzt (Sidhu und Oakenfull 1992).

Weitere Anwendung ist die Trennung von Enantiomeren (Betts 1993, 1994).

Die Frankfurter Allgemeine Zeitung nennt die CD „einen wahren Tausendsassa“, das Magazin „Modern Times“ spricht von „intelligenten Stoffen“ mit unglaublichen Möglichkeiten (Bilow 2001, Lemme 2001). Die angeführten Beispiele und die große Zahl an Publikationen bestätigen diese Aussagen. In der Tab. 2.2 ist eine kleine Auswahl an pharmazeutischen Produkten, die auf dem deutschen und internationalen Markt erhältlich sind, zusammengestellt. Eine größere Auswahl ist bei Stella und Rajewski (1997) oder auf der Homepage der Firma Cyclodex zu finden.

Tab. 2.2 Übersicht über Fertigarzneimittel mit  $\beta$ -Cyclodextrin

Komponente /Wirkstoff	Darreichungsform	Handelsnahme/Firma/Land
Trockenextrakt aus Thymian	Pastillen	Bronchipret R Thymian Pastillen / Bionorica / Deutschland (D)
Omeprazol	Kapseln	Omebeta R20/-20 PH / betapharm/ D
Omeprazol	Kapseln, Tabletten (Tbl.)	Omeprazol STADA R / STADA/ D
Itraconazol	Lösung	Sempra R Liquid / Janssen-Cilag / D
Prostaglandin E	Sublinguale Tbl.	Prostarmon E / Ono / Japan
Dexamethason	Creme	Glyteer / Fujinaga / Japan
Nitroglycerin	Sublinguale Tbl.	Nitropen / Nippon Kayaku / Japan
Chloramphenicol	Augentropfen	Clorocil / Oftalader / Portugal
Nicotin	Kaugummi	Nicorette microtab / Pharmazia-Upjohn / Frankreich

## 2.2 Herstellung eines Kamillenextraktes mittels überkritischem CO<sub>2</sub>

Bereits aus den ersten Arbeiten von Stahl und Schütz (1978) geht hervor, dass der CO<sub>2</sub>-Extrakt aufgrund des unpolaren Charakters von Kohlendioxid in seiner Zusammensetzung einem Extrakt, welcher mit lipophilen Lösungsmitteln gewonnen wird oder dem ätherischen Öl ähnelt. Jedoch unterliegt er weder der thermischen Belastung einer Wasserdampfdestillation, noch müssen Lösungsmittelreste entfernt oder deklariert werden. Weitere Vorteile der Extraktion mit überkritischem CO<sub>2</sub> sind (Kaiser et al. 2001):

- lösemittelfrei, einfache Abtrennung des Extraktionsgases,
- rückstandsfrei, damit im lebensmittelrechtlichen Sinne völlig unbedenklich,
- umweltfreundlich,

- kostensenkend (u. a. keine aufwendige Rückgewinnung von Lösungsmitteln),
- breite Variabilität der Eigenschaften des Extraktionsgases,
- fraktionierte Extraktion und Abscheidung ermöglichen hohe Selektivität.

Auch in weiteren Publikationen wird die CO<sub>2</sub>-Extraktion immer als eine Methode beschrieben, die es ermöglicht, ätherisches Öl schonend für die Inhaltsstoffe und auf eine umweltverträgliche Weise zu gewinnen (Vuorela et al. 1990, Reverchon 1994, Pekic 1995, 1997, Scalia 1999).

Reverchon (1994) extrahiert Kamillenblüten bei einem Druck von 90 bar und einer Temperatur 40 °C. Vuorela et al. (1990) wählen andere Bedingungen (200 bar und 40 °C), die eine geringere Selektivität für Kamilleninhaltsstoffe aufweisen. Grünhagen (1994) vergleicht in ihrer Dissertation verschiedene Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakte untereinander sowie mit wässrig-alkoholischen Extrakten. Die überkritischen Kamillenauszüge weisen ein dem auf herkömmliche Art gewonnenen Kamillenöl vergleichbares Muster an Inhaltsstoffen auf. Auffällig ist die Anwesenheit von vier Kohlenwasserstoffen in Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakten. Diese ungeradzahligen n-Alkane (C<sub>25</sub> bis C<sub>31</sub>) sind aufgrund ihrer fehlenden Flüchtigkeit im ätherischen Öl nicht vorhanden. Grünhagen (1994) findet in einem Gramm des Extraktes ca. 97 mg β-Farnesen, 43 mg (-)-α-Bisabolol, 145 mg cis-EID und 52 mg trans-EID. Reverchon (1994) erhält einen Extrakt mit wenig (-)-α-Bisabolol (0,3 %) und hohen Bisabololoxid-Anteilen, was auf andere Zuchtsorten der Kamille zurückzuführen ist. Der Anteil der Spiroether beträgt ca. 13 %.

Die Wirkung des Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extraktes wird von Sabieraj (1993) untersucht und bestätigt. Die Variation des Extraktionsverfahrens hat somit keinen negativen Einfluss auf das Wirkungsspektrum der Kamille und weist die bereits erwähnten Vorteile auf.

Da die von Reverchon (1994) vorgestellten Bedingungen, niedriger Druck und moderate Temperatur, die höchste Selektivität aufweisen, werden sie auch bei der Herstellung des in der eigenen Arbeit verwendeten Extraktes gewählt.

## Kapitel 3

### GC-Analytik der Kamilleninhaltsstoffe

Die erste gaschromatographische Methode zur Bestimmung von (-)- $\alpha$ -Bisabolol wurde von Isaac et al. (1968) entwickelt. Die Auftrennung von (-)- $\alpha$ -Bisabolol, Bisabololoxiden und Chamazulen gelingt Glasl und Wagner (1976). Zahlreiche weitere GC-Verfahren wurden seither publiziert. Eine gute Übersicht findet man bei Schilcher (1978), Vogel (1992) und Ness (1995). Die in dieser Arbeit angewandte Methode entstammt der Dissertation von Ness (1995). Die, von ihr benutzte Kapillar-Säule wird durch eine vergleichbare, ebenfalls mittelpolare und auf der Basis von Polysiloxan hergestellte OPTIMA  $\delta$ -3 Säule ersetzt. Diese Säule zeigt eine Temperaturstabilität bis 360 °C. Dies ist wichtig, weil bei der Trennung der Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakte hohe Temperaturen erforderlich sind, um die enthaltenen höheren n-Alkane C<sub>25</sub> – C<sub>31</sub> aufzutrennen. Die relevanten Inhaltsstoffe eluieren in einem kurzen Zeitraum mit Retentionszeiten von 8 und 11 Minuten von der Säule. Nach 7 Minuten wird die Aufheizrate von 7 °C/min auf 3 °C/min verringert, um eine bessere Auflösung der relevanten Peaks zu erzielen. Die Gesamtzeit für eine (-)- $\alpha$ -Bisabolol- oder Kamillenöl-Analyse beträgt 30 min, bei einem Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt verlängert sie sich auf 45 min, da mit einer abschließenden Heizrate von 5 °C/min bis auf 300 °C aufgeheizt wird. Eine höhere Aufheizrate würde zwar die Retentionszeiten beschleunigen, aber auch die Auflösung der Spiroether verschlechtern.

Durch den Einsatz eines internen Standards in der Gaschromatographie können gerätebedingte Fehler bei der quantitativen Messung reduziert werden. Das Verhältnis von Analyt zu internem Standard wird für die Auswertung herangezogen. Ein interner Standard sollte folgende Voraussetzungen erfüllen: er darf mit keiner der im Substanzgemisch anwesenden Komponenten identisch sein, und sein Peak darf mit den Peaks der Probe nicht überlappen. Die Retentionszeit sowie die Konzentration sollen ähnlich der Leitsubstanz sein (Wollrab 1983). Zur Berechnung des Gehaltes der eingesetzten Probenlösungen wird zunächst eine Standardlösung mit bekanntem Gehalt an

relevanten Inhaltsstoffen und n-Hexadecan analysiert. Aus den daraus resultierenden Flächenwerten lässt sich ein Responsefaktor  $f$  errechnen, der der weiteren Auswertung zugrunde gelegt wird (Wollrab 1983):

$$f = \frac{m_{Kam} * A_{Hex}}{A_{Kam} * m_{Hex}}$$

$m_{Kamille}$	eingesetzte Menge an einem Kamilleninhaltsstoff [mg/100 ml]
$m_{Hexadecan}$	eingesetzte Menge an n-Hexadecan (interner Standard) [mg/100 ml]
$A_{Kam}$	Flächeneinheiten des Kamilleninhaltsstoffes
$A_{Hex}$	Flächeneinheiten des internen Standards n-Hexadecan

$$m_x = f * A_x * \frac{m_{Hex}}{A_{Hex}}$$

$m_x$	Mengen der zu bestimmenden Substanz x [mg/100 ml]
$f$	Responsefaktor
$A_x$	Flächeneinheiten der zu bestimmenden Substanz x
$A_{Hex}$	Flächeneinheiten n-Hexadecan

Für den internen Standard muss eine Kalibrierung mit Ermittlung der Verfahrenskenn-daten durchgeführt werden (Funk et al. 1987). Der Kalibrierbereich des internen Stan-dards ist klein zu wählen, da die einzusetzende Konzentration normalerweise konstant bleibt. Die Kalibriergerade schließt fünf verschiedene Konzentrationen ein, und die Güte der Kalibrierung wird anhand des Residuenplots beurteilt. Aus den statistischen Verteilungen der Residuen um den Nullwert über die durch die Regressionsgerade ge-schätzten Werte kann jeweils auf Linearität und Varianzhomogenität geschlossen wer-den. Ein Trend wird nicht beobachtet (Abb. 3.1).

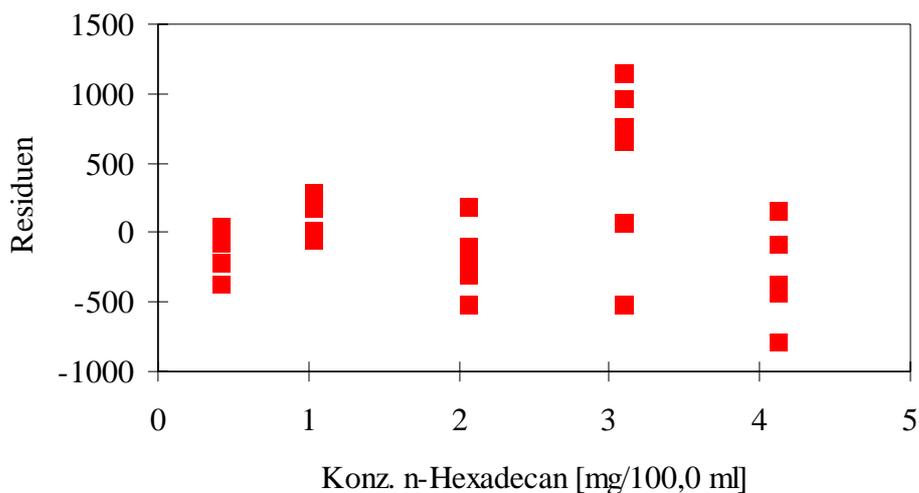


Abb. 3.1 Residuenplot des internen Standards n-Hexadecan; (■) Residuen

Für die Erstellung der Kalibriergeraden von (-)- $\alpha$ -Bisabolol wird der Flächenquotient aus der zu bestimmenden Substanz und dem internen Standard aufgetragen (Abb. 3.2). Durch die berechneten Punkte wird eine Regressionsgerade gelegt. Jeder Punkt ist durch eine vierfache Wiederholungsmessung bestimmt. Der 95%- Vertrauensbereich ist ebenfalls dargestellt, zur optischen Verdeutlichung wird er um den Faktor 10 aufgeweitet. Er gibt die Unsicherheit des Datenschwerpunktes in y-Richtung sowie die Unsicherheit der Steigung der Geraden wieder. Die Daten werden mit einem Statistikprogramm zur Kalibrierung und Validierung von G. Kraus berechnet und mit den Ergebnissen der statischen Auswertung des Programms „Excel“ verglichen. Durch den Einsatz zweier verschiedener Rechenverfahren wird die Berechnung der Kalibriergeraden validiert. Die Daten der Kalibriergeraden für den internen Standard und (-)- $\alpha$ -Bisabolol sind in Tab. 3.1 angegeben.

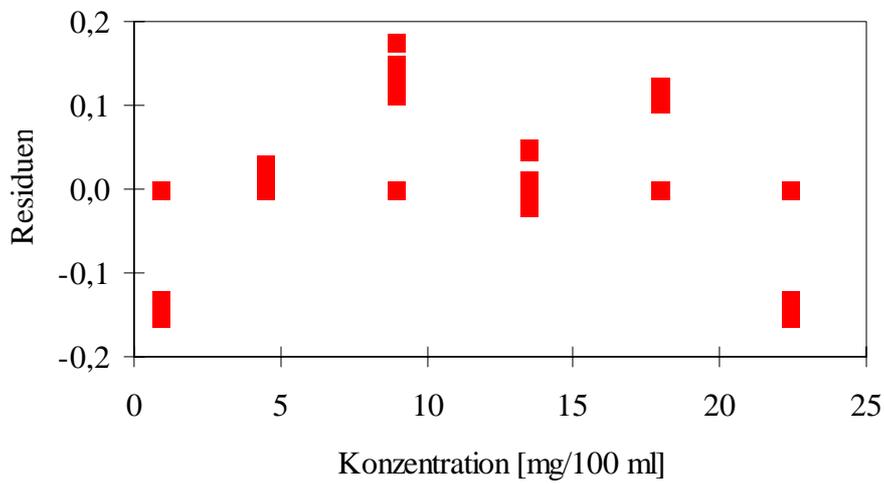
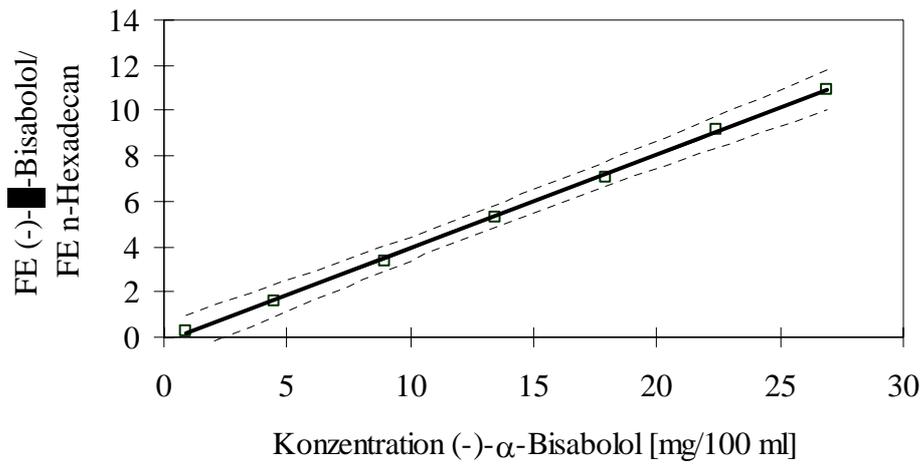


Abb. 3.2 Kalibriergerade für (-)-α-Bisabolol und zugehöriger Residuenplot; berechneter Gehalt (□) aus dem Flächenquotienten (-)-α-Bisabolol/n-Hexadecan bzw. Residuen (■), (—) Regressionsgerade, (- - -) 10facher Vertrauensbereich

### 3 GC-Analytik der Kamilleninhaltsstoffe

Tab. 3.1 Daten der Kalibrierung der GC-Methode für (-)- $\alpha$ -Bisabolol und n-Hexadecan

Parameter	(-)- $\alpha$ -Bisabolol	n-Hexadecan
Messbereich [mg/100 ml]	0,916 – 26,88	0,41 – 4,12
Anzahl der Messpunkte	28	30
Datenschwerpunkt	$E(x_c) = 13,57 \text{ mg/100 ml}$	$E(x_c) = 2,14 \text{ mg/100 ml}$
	$E(y_c) = 5,39$	$E(y_c) = 43254,06$
Korrelationskoeffizient	0,9996	0,9999
Geradengleichung (-)- $\alpha$ -Bisabolol	$f(x) = 0,414(x - 13,568) + 5,395$	
Geradengleichung n-Hexadecan <sup>1)</sup>	$f(x) = 20248,393(x - 2,144) + 43254,067$	

<sup>1)</sup>Angabe nach Ebel (1983)

Im Rahmen der Validierung der Analysemethoden, welche die Selektivität, die Systempräzision, die Methodenpräzision, die Richtigkeit und die Robustheit des Verfahrens überprüft, kann die Eignung der Methoden festgestellt werden. Genaue Definitionen und Erläuterungen zu den einzelnen Begriffen sind in USP 25 enthalten. Die Durchführung der Validierung ist Kapitel 7.2.1.3 zu entnehmen, die statistischen Daten sind in Tab. 3.2 dargestellt.

Die Selektivität wird durch die Verwendung von Standardsubstanzen und den Vergleich der Retentionszeiten nachgewiesen. Tauchen bei der Analyse derselben Probe keine zusätzlichen Peaks in den verschiedenen Chromatogrammen auf, so kann davon ausgegangen werden, dass die Peaks sauber getrennt und rein sind. Um sicher zu stellen, dass bei der Aufarbeitung der Proben keine Verluste entstehen, wird die Wiederfindungsrate bestimmt. Diese ist in der Tab. 3.2 dargestellt. Die genaue Vorgehensweise zur Aufarbeitung der Proben ist den Kapiteln 7.2.1.2 und 7.2.2.1 zu entnehmen.

Tab. 3.2 Validierung der GC-Methode von relevanten Inhaltsstoffen der Kamille

Parameter	Systempräzision		Methodenpräzision						
	Kamillenöl		β-CD/(-)-α-Bisabolol-Komplex (n=4)		β-CD/Kamillen-CO <sub>2</sub> -Extrakt-Komplex (n=6)		Kamillencreme	Bestimmungs-grenze	Erfas-sungs-grenze
(-)-α-Bisabolol [mg/1000 mg] realsdv [%]	169,46	0,61	19,0	4,01	120,4	4,11	123,48	2,55	0,0573 (n=4)
	128,20	1,97	Wiederfindung: 97 %		Wiederfindung: 100,2 %		Wiederfindung: 102,9 %		
β-Farnesen [mg/1000 mg] realsdv [%]	82,76	3,00	—		60,73	2,31	57,84	2,76	—
	60,37	0,83	—		Wiederfindung: 96,4 %		Wiederfindung: 96,4 %		
cis-EID [mg/1000 mg] realsdv [%]	69,64	2,45	—		118,36	3,28	112,94	19,50	—
	124,53	3,13	—		Wiederfindung: 97,9 %		Wiederfindung: 91,0 %		
trans-EID [mg/1000 mg] realsdv [%]	7,73	1,62	—		24,8	4,14	29,84	12,78	—
	28,20	1,05	—		Wiederfindung: 101,5 %		Wiederfindung: 106,5 %		

Als Reinsubstanz wird (-)- $\alpha$ -Bisabolol, gewonnen aus *Vanillusmopsis erythropha* (Firma Robugen) gewählt, für das eine Gehaltsbestimmung gegen einen Referenzstandard (Firma Roth) durchgeführt wird (Abb. 3.3). Sie wird bei der Herstellung der Komplexe und der Phasen-Löslichkeit-Studie verwendet. Aus neuen Bestimmungen im Bereich 8,2 – 32,64 mg/100 ml ergibt sich ein mittlerer Gehalt von 96,5 %. Dieser Gehalt wird in allen folgenden Berechnungen berücksichtigt und die Einwaagen an (-)- $\alpha$ -Bisabolol auf 100 % zurückgerechnet. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,999. Die Bestimmungsgrenze liegt bei 0,265 mg/100 ml.

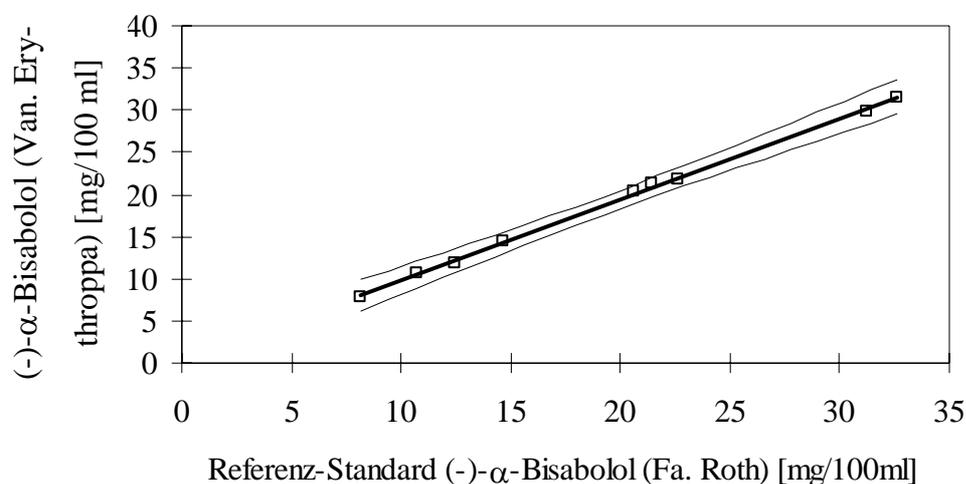


Abb. 3.3 Kalibriergerade für (-)- $\alpha$ -Bisabolol der Firma Robugen gegen einen (-)- $\alpha$ -Bisabolol-Standard; ( $\square$ ) berechneter Gehalt, (—) Regressionsgerade, (- - -) 10facher Vertrauensbereich

## Kapitel 4

### Bestimmung der Stabilitätskonstanten von ausgewählten Kamilleninhaltsstoffen mit $\beta$ -Cyclodextrin

#### 4.1 Theorie und Literaturüberblick

Nach Frömring (1973) wurde der Name „Einschlussverbindung“ im Jahre 1950 von W. Schlenk geprägt, während der Typ dieser Verbindung schon früher bekannt war. Schon zu Beginn des vorigen Jahrhunderts kannte man die Blaufärbung von Stärke mit elementarem Jod, ihre Struktur wurde aber erst in den Jahren 1939 bis 1951 von Freudenberg und Cramer genau beschrieben. Mit einer Patentanmeldung 1941 durch die IG Farbenindustrie beginnt das Interesse für Einschlussverbindungen zu wachsen. Damals bemerkte man, dass Harnstoff imstande ist, sich mit Paraffinkohlenwasserstoffen und einigen sauerstoffhaltigen aliphatischen Verbindungsklassen zu kristallinen Additionsverbindungen zu vereinigen.

Im Jahre 1954 stellt Cramer folgende Definition für Einschlussverbindungen auf:

„Bei den Einschlussverbindungen handelt es sich um eine rein räumliche Verbindungsbildung zwischen den Partnern. Es werden hier keine Haupt- oder Nebenvalenzen hergestellt, sondern das eine Molekül schließt das andere räumlich ein. Das eingeschlossene Molekül ist dann in seinem Hohlraum vollständig „vergattert“ und kann nicht mehr heraus, obwohl es nicht direkt an das andere, einschließende Molekül gebunden ist. Der notwendige Hohlraum kann sich entweder in einem einzelnen Molekül befinden, was relativ große Moleküle erfordert, oder er kann sich durch Zusammenbauen mehrerer kleiner Moleküle in einem hohlraumhaltigen Gitter ausbilden.“

Je nach Ausbildung der Hohlräume lassen sich die Addukte in Kanal-, Käfig- und Schicht-Einschlussverbindungen einteilen (Frömring 1973). Sowohl die etwas ältere Definition wie auch neuere Untersuchungen postulieren den Einfluss der zwischenmolekularen Wechselwirkungen auf die Komplexbildung (Saenger 1980). Die Abhängig-

#### 4 Bestimmung der Stabilitätskonstanten von ausgewählten Kamilleninhaltsstoffen mit $\beta$ -Cyclodextrin

---

keit der Stabilitätskonstante von der Polarisierbarkeit des Substrats deutet darauf hin, dass allgemein van-der-Waals-Kräfte vorherrschen; die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen Gast und OH-Gruppe an der engeren Öffnung des Cyclodextrins konnte direkt gezeigt werden (Bergeron et al. 1977). Daneben sind hydrophobe Wechselwirkungen beteiligt, denn das Gast-Molekül muss bei Einschluss in den CD-Hohlraum die dort befindlichen Wassermoleküle ausstoßen und seine eigene Hydrathülle abstreifen. Die freigewordenen Wassermoleküle werden vom umgebenden Wasser aufgenommen, und durch die Entropiezunahme tragen sie zur Stabilität der Komplexe bei (Komiyama und Bender 1978).

Einschlussverbindungen können sowohl in Lösung als auch in festem Zustand ausgebildet werden. Einschlussverbindungen in festem Zustand werden im Kapitel 5 genauer untersucht und beschrieben. In gelöstem Zustand beträgt das Verhältnis zwischen CD und eingeschlossener Gastkomponente gewöhnlich 1:1. In Lösung liegt die Einschlussverbindung immer im Gleichgewicht mit den freien Einzelkomponenten vor, dessen Lage durch die Gleichgewichts- bzw. Stabilitätskonstante beschrieben wird. Higuchi und Connors (1965) beschreiben die Bestimmung der Stabilitätskonstanten wie folgt: ein Überschuss an Gast-Molekül wird zu CD-Lösungen steigender Konzentration gegeben und bei konstanter Temperatur bis zur Gleichgewichtseinstellung geschüttelt. Die Konzentration des Gastmoleküls in der Lösung wird bestimmt. Im Phasen-Diagramm wird die Konzentration an gelöstem Gastmolekül in Abhängigkeit von der molaren CD-Konzentration aufgetragen. Das Diagramm liefert zwei Typen von Kurven, die zusätzlich innerhalb ihres Types variieren können. In Abb. 4.1 repräsentiert  $S_t$  die gesamte Konzentration an gelöstem Gastmoleküle (Substrat). Auf der Abszisse sind steigende Konzentrationen an Cyclodextrin aufgetragen. Mit der Bildung eines löslichen Komplexes in Gegenwart des Cyclodextrins steigt die Löslichkeit des Gast-Moleküls, beginnend mit der Grundlöslichkeit  $S_0$  in Abwesenheit von Cyclodextrin. Eine lineare Zunahme der Löslichkeit der einzuschließenden Substanz ist beim Diagramm vom Typ  $A_L$  zu verzeichnen, in diesem Fall werden 1:1 Komplexe gebildet. Beim Typ  $A_P$  können auch höhere Komplexe gebildet werden,  $A_N$  wird selten beschrieben und ist als eher unwahrscheinlich zu bezeichnen. Typ A ist im Allgemei-

#### 4 Bestimmung der Stabilitätskonstanten von ausgewählten Kamilleninhaltsstoffen mit $\beta$ -Cyclodextrin

---

nen dadurch charakterisiert, dass nur lösliche Komplexe entstehen. Im Gegensatz dazu bilden Substanzen mit einer begrenzten Löslichkeit in Gegenwart des Cyclodextrins Komplexe vom Typ B. Die Kurve kann anhand bestimmter Abschnitte beschrieben werden. Infolge der Bildung eines löslichen Komplexes steigt die Löslichkeit der einzuschließenden Substanz zwischen  $S_0$  und A. Im Punkt A erreicht die Löslichkeit des Komplexes ihr Maximum und ab diesem Moment fällt fester Komplex aus. Solange noch ein Überschuss an Substrat vorliegt, kann löslicher Komplex nachgebildet werden und damit die Menge an festem Komplex ersetzen, der als Niederschlag ausgefallen ist. Aufgrund dieses Gleichgewichtes bleibt die Konzentration ( $S_t$ ) zwischen den Punkten A und B konstant. Ab dem Punkt B ist der Überschuss an Substrat aufgebraucht, somit kann kein neuer löslicher Komplex nachgebildet werden. Durch die weiterhin steigende Cyclodextrin-Konzentration fällt ständig fester Komplex aus, bis der lösliche Komplex vollständig verbraucht ist. Der Anstieg zu Beginn von  $S_0$  zum Punkt A entspricht genau dem Abfall vom Punkt B zu  $S_C$ , wenn für beide Kurvenabschnitte ein Komplex derselben Ordnung verantwortlich ist. Diese Anforderung wird selten erfüllt, weil mit höheren Cyclodextrin-Konzentrationen auch höhere Komplexe entstehen, die ein anderes Verhalten als die initial gebildeten 1:1 Komplexe aufweisen (Hirayama und Uekama 1987). Der beschriebene Kurvenverlauf entspricht dem Untertyp  $B_s$ ; Substanzen, die dem  $B_I$ -Typ folgen, unterscheiden sich dadurch, dass gleichzeitig löslicher und fester Komplex gebildet werden, der  $S_0 - A$ -Abschnitt entfällt.

4 Bestimmung der Stabilitätskonstanten von ausgewählten  
Kamilleninhaltsstoffen mit  $\beta$ -Cyclodextrin

---

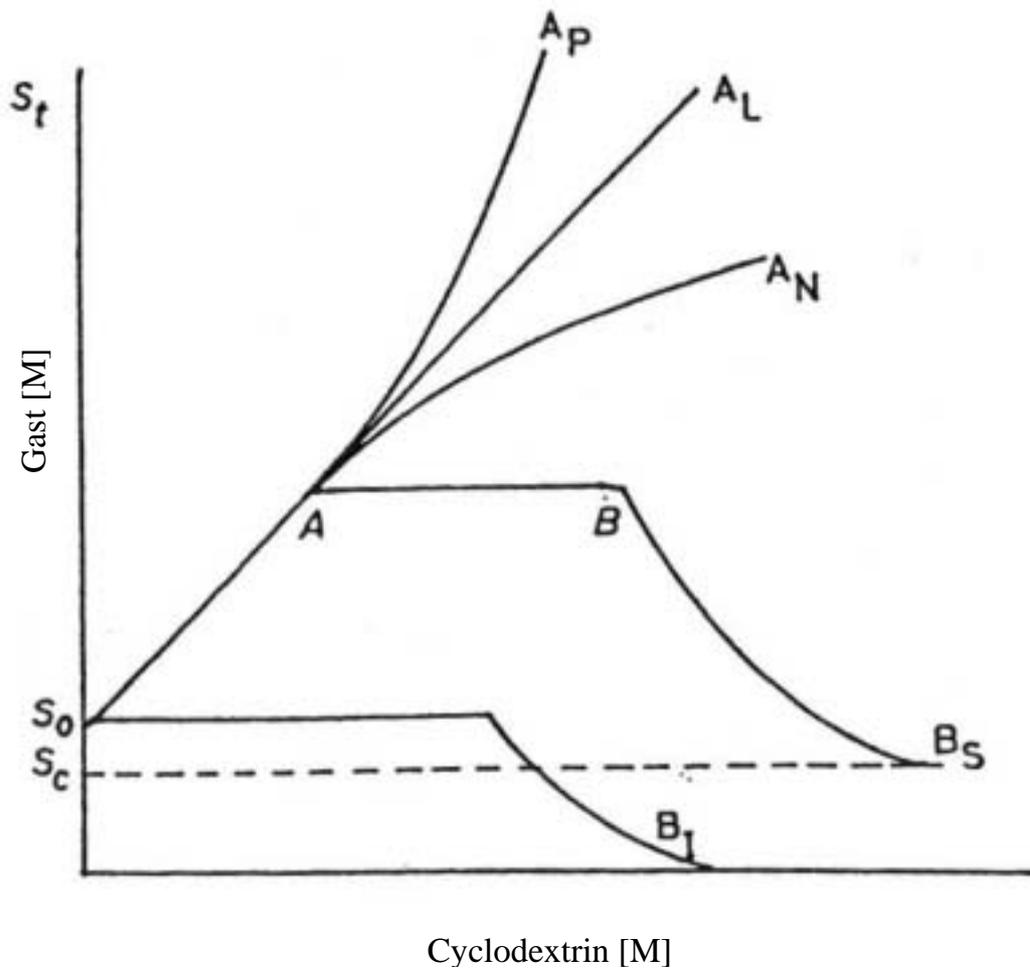


Abb. 4.1 Phasen-Löslichkeit-Diagramm des Gastmoleküls ( $S_t$ ) in Cyclodextrin-Lösung;  $S_0$  Grundlöslichkeit,  $S_c$  Löslichkeitsgrenze des Komplexes;  $A_L$ ,  $A_N$ ,  $A_P$  unbegrenzt lösliche Komplexe;  $B_S$ ,  $B_L$  begrenzt lösliche Komplexe

#### 4 Bestimmung der Stabilitätskonstanten von ausgewählten Kamilleninhaltsstoffen mit $\beta$ -Cyclodextrin

---

Die Stabilitätskonstante ermittelt man aus der Steigung und dem Achsenabschnitt des initialen Anstieges gemäß der folgenden Gleichung (James 1986):

$$K_S = \frac{[CD]^* [G]}{[CD]^* [G]} [M^{-1}]$$

$$K_S = \frac{(S_t - S_o)}{S_o \{ [CD]_t - (S_t - S_o) \}} = \frac{\tan \alpha}{S_o (1 - \tan \alpha)} = \frac{\text{Steigung}}{S_o (1 - \text{Steigung})}$$

$K_S$  = Stabilitätskonstante

CD =  $\beta$ -Cyclodextrin

G = Konzentration an Gastmolekül

$S_o$  = Grundlöslichkeit des Gastmoleküls in Abwesenheit von Cyclodextrin

$S_t$  = Konzentration des Gastmoleküls in Gegenwart von Cyclodextrin

In Tab. 4.1 ist eine Übersicht von Stabilitätskonstanten unterschiedlicher Substanzen mit  $\beta$ -CD dargestellt. Dabei soll keine vollständige Übersicht über alle Arbeiten auf dem Gebiet gegeben, sondern die große Variation der Ergebnisse verdeutlicht werden. Die entscheidende Voraussetzung für die Bildung einer CD-Einschlussverbindung ist die richtige Größe des Gast-Moleküls. Diese muss in den Hohlraum hineinpassen oder über ein in den Hohlraum passendes Strukturelement verfügen. Uekama et al. (1978) untersuchen Einschlussverbindungen von verschiedenen Barbituraten und Sulfonamiden mit CD. Barbiturate mit einem cyclischen oder sperrigen Rest zeigen beim Einschluss in  $\alpha$ -CD deutlich kleinere Stabilitätskonstanten im Vergleich zu Barbituraten mit einem aliphatischen Rest. Diese Tendenz ist ebenfalls, wenn auch weniger offensichtlich, bei den Einschlussverbindungen mit  $\beta$ -CD zu erkennen. Der Grund liegt darin, dass  $\alpha$ -CD einen kleineren Hohlraum hat und sich damit die Größe des Moleküls als noch ausschlaggebender erweist. Sulfonamide mit einem Cyclohexylrest zeigen wiederum in dieser Reihe die höchste Stabilitätskonstante. In einer wässrigen Umgebung spielt ein weiteres Kriterium, die Lipophilie der Substanzen, eine besondere Rolle (Hirayama und Uekama 1987). Aus diesem Grund zeigen Cholesterol und Spironolacton, d.h. stark lipophile Substanzen, deutlich höhere Stabilitätskonstanten als andere Substanzen, deren Affinität zur hydrophoben  $\beta$ -CD-Kavität weniger ausgeprägt ist (Tab. 4.1).

4 Bestimmung der Stabilitätskonstanten von ausgewählten  
Kamilleninhaltsstoffen mit  $\beta$ -Cyclodextrin

Tab. 4.1 Stabilitätskonstanten von Einschlussverbindungen mit  $\beta$ -Cyclodextrin

Gast / Substanz	Typ	$K_{1:1}$ [ $M^{-1}$ ]	Anmerkung	Autor
5-ASA	B <sub>S</sub>	285	—	Zerrouk et al. 1998
Bendrofluazid	A <sub>L</sub>	80,5	—	Corrigan und Stanley 1982
Chlorthiazid	A <sub>L</sub>	13,8	—	Corrigan und Stanley 1982
Cholesterol	B <sub>S</sub>	17000, 34000	pH-abhängige Untersuchung pH 6,4; pH 10,8	Frijlink et al. 1991
1,8-Cineol	B <sub>I</sub>	193	K <sub>S</sub> mit HP- $\beta$ -CD (33 $M^{-1}$ )	Williams et al. 1998
Cortison	B <sub>S</sub>	5,1	Höhere K <sub>S</sub> bei 1:2 (Gast : CD) (2763 $M^{-1}$ ) (2-cyano-3-(1,4-dihydro-1-phenyl-(1)-benzothiopy-ran-(4,3-C)-pyrazol-3-yl)-3-oxo-N-phenyl-propanamid	Liu et al. 1990
FCE 24578	A <sub>L</sub>	690		DePonti et al. 1991
Griseofulvin	A <sub>L</sub>	7	K <sub>S</sub> mit HP- $\beta$ -CD 12 $M^{-1}$	Veiga et al. 1998

4 Bestimmung der Stabilitätskonstanten von ausgewählten  
Kamilleninhaltsstoffen mit  $\beta$ -Cyclodextrin

Tab. 4.1 (Fortsetzung)

Gast / Substanz	Typ	$K_{1:1}$ [ $M^{-1}$ ]	Anmerkung	Autor
Hydrochlorthiazid	$A_L$	58,5	—	Corrigan und Stanley 1982
Hydrocortison	$B_S$	2,6	Höhere $K_S$ bei 1:2 (Gast : CD) ( $697 M^{-1}$ )	Liu et al. 1990
Hydroflumethiazid	$A_L$	32,4	—	Corrigan und Stanley 1982
Ibuprofen	$A_L$	10,6; 10,2	10,5; Temperaturabhängige Untersuchung $25, 37, 45$ °C	Mura et al. 1998
Ketoprofen	$B_S$	0,8; 0,77; 0,7	Temperaturabhängige Untersuchung $25, 37, 45$ °C	Mura et al. 1998
D-Limonen	$B_S$	270	$K_S$ mit HP- $\beta$ -CD $1341 M^{-1}$	Williams et al. 1998
Methoxybutropat	$B_S$	4350	Höhere $K_S$ als mit HP- $\beta$ -CD ( $2370 M^{-1}$ )	Palmieri et al. 1997
Methsuximid	$B_S$	390,8	Höhere $K_S$ als mit $\alpha$ -CD ( $11,2 M^{-1}$ )	Ismail 1991
Metronidazol	$B_S$	1300	—	Andersen und Bundgaard 1983

Tab. 4.1 (Fortsetzung)

Gast / Substanz	Typ	$K_{1:1}$ [ $M^{-1}$ ]	Anmerkung	Autor
Naproxen	$A_L$	1379 - 24	pH 1, 3, 5,7 und Temperatur 25, 35, 45 °C variieren; mit steigenden Temp. und pH nimmt $K_S$ ab	Otero-Espinar <sup>1</sup> et al. 1992
Ofloxacin	$B_S$	152	—	Koester et al. 2001
Phenacetin	$A_L$	182	Untersuchung in Kombination mit je zwei verschiedenen Substanzen – $K_S$ 186 od. 185 $M^{-1}$	Ono et al. 2001
Phensuximid	$B_S$	82,6	Höhere $K_S$ als mit $\alpha$ -CD (37,38 $M^{-1}$ )	Ismail 1992
Progesteron	$B_S$	24,7	Höhere $K_S$ bei 1:2 (Gast : CD) (686 $M^{-1}$ )	Liu et al. 1990
Salbutamol	$A_L$	68,9; 66,4	Temperaturabhängige Untersuchung 37, 25, 20 °C Vergleich mit $\alpha$ -CD, $\gamma$ -CD und Me- $\beta$ -CD	Cabral Marques et al. 1990
Spironolacton	$B_S$	24800	Vergleich zu HP- $\beta$ -CD (15700 $M^{-1}$ ); $\gamma$ -CD (9920 $M^{-1}$ ), HP- $\gamma$ -CD (7000 $M^{-1}$ )	Soliman et al. 1997
Testosteron	$B_S$	2,7	Höheren $K_S$ bei 1:2 (Gast : CD) 140 $M^{-1}$	Liu et al. 1990
Tolbutamid	$B_S$	195,7; 50,2	$K_S$ in Wasser, pH 2 und pH 7 Puffer	Veiga et al. 2001

#### 4.2 Berechnung der Konstanten für Komplexe aus $\beta$ -Cyclodextrin und (-)- $\alpha$ -Bisabolol-Reinsubstanz bzw. $\beta$ -Cyclodextrin und Bestandteilen von Kamillenöl

Die Berechnungen der Stabilitätskonstanten basieren auf der Methode nach Higuchi und Connors (1965). Als Lösungsmittel wird ein Ethanol/Wasser-Gemisch (25/75 V/V) verwendet, das die Löslichkeit von (-)- $\alpha$ -Bisabolol bzw. ätherischem Kamillenöl erhöht. Da der Komplex später in eine Creme eingearbeitet wird, werden die Proben zur Simulation der Hauttemperatur bei 32 °C equilibriert. In Abb. 4.2 ist der Ablauf der Probenvorbereitung dargestellt.

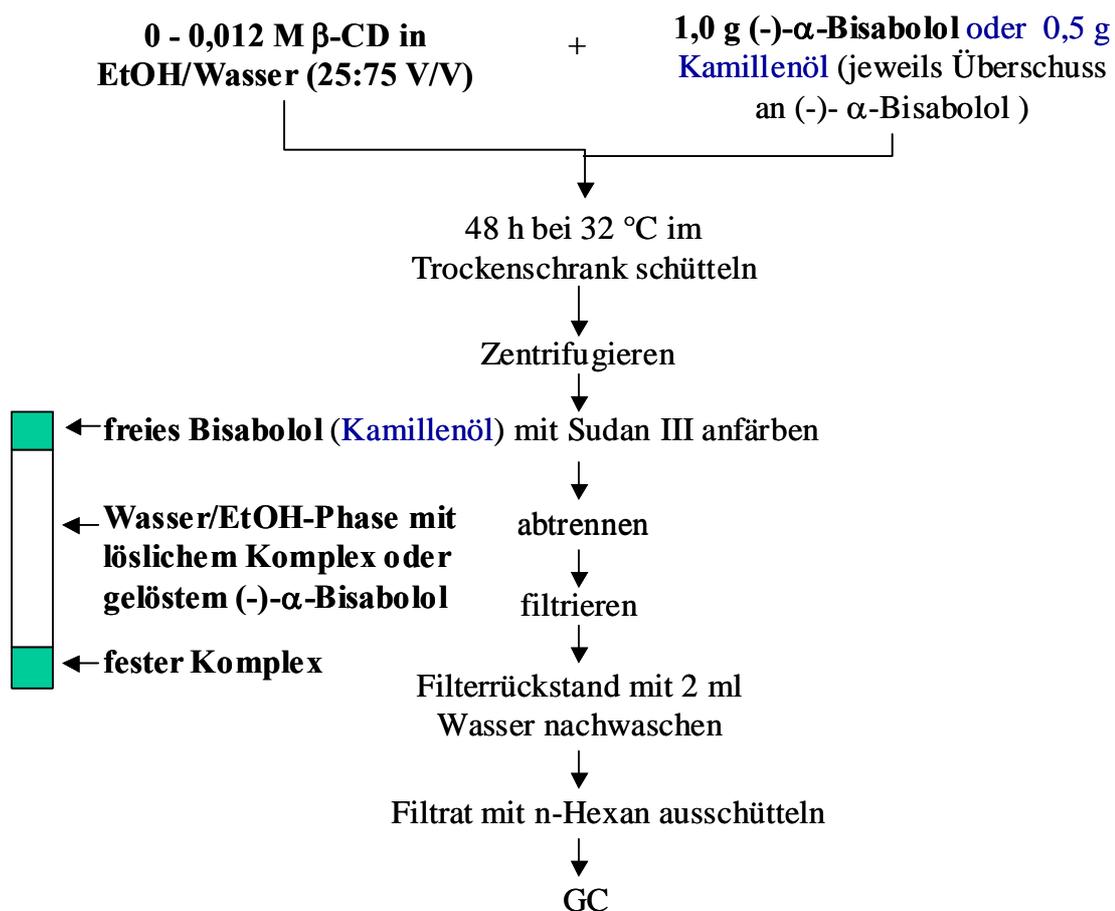


Abb. 4.2 Probenvorbereitung zur Erstellung der Phasen-Löslichkeits-Diagramme.

## 4 Bestimmung der Stabilitätskonstanten von ausgewählten Kamilleninhaltsstoffen mit $\beta$ -Cyclodextrin

Das Phasen-Löslichkeit-Diagramm wird für die Leitsubstanz (-)- $\alpha$ -Bisabolol-Reinsubstanz im Vergleich zu (-)- $\alpha$ -Bisabolol als Bestandteil des ätherischen Öls erstellt (Abb. 4.3). Weiter wird das Löslichkeitsverhalten von anderen relevanten Inhaltsstoffen aus dem Kamillenöl in Gegenwart von  $\beta$ -CD betrachtet (Abb. 4.4). Für alle Substanzen resultieren Kurven nach dem B<sub>S</sub>-Typ.

Wie man aus der Abb. 4.3 ersehen kann, ist der Verlauf der beiden Kurven vergleichbar, sie sind lediglich durch die unterschiedlichen Grundlöslichkeiten parallel verschoben. Das reine (-)- $\alpha$ -Bisabolol ( $4,76 \cdot 10^{-4}$  M) ist im Vergleich zu (-)- $\alpha$ -Bisabolol in Gegenwart anderer Komponenten des ätherischen Öles ( $1,82 \cdot 10^{-4}$  M) besser löslich. Auf diese Problematik wird später in diesem Kapitel näher eingegangen.

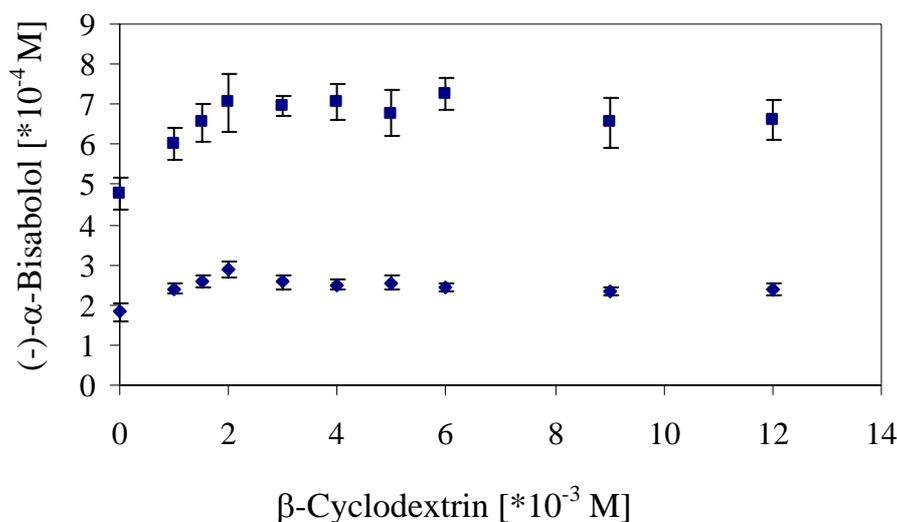


Abb. 4.3 Phasen-Löslichkeit-Diagramm von ■ (-)- $\alpha$ -Bisabolol-Reinsubstanz und ◆ (-)- $\alpha$ -Bisabolol aus Kamillenöl mit  $\beta$ -CD in Wasser/Ethanol-Gemisch (75/25 V/V) bei 32 °C

Von den relevanten Kamilleninhaltsstoffen werden außer (-)- $\alpha$ -Bisabolol noch die Spiroether eingeschlossen.  $\beta$ -Farnesen wird nicht als löslicher Komplex detektiert und somit kann dafür keine Stabilitätskonstante bestimmt werden. Diese unpolare Substanz ist in der Ethanol/Wasser-Mischung praktisch unlöslich und bildet mit  $\beta$ -CD direkt

#### 4 Bestimmung der Stabilitätskonstanten von ausgewählten Kamilleninhaltsstoffen mit $\beta$ -Cyclodextrin

festen Komplexe, d.h. ein löslicher Komplex kann nicht nachgewiesen werden, da der komplexierte Anteil direkt als Niederschlag ausfällt. Im Kapitel 5 wird die Bildung eines festen  $\beta$ -CD/ $\beta$ -Farnesen-Komplexes diskutiert.

Das Phasen-Löslichkeit-Diagramm von cis- und trans-EID ist dem Kurvenverlauf von (-)- $\alpha$ -Bisabolol ähnlich (Abb. 4.4). Die Grundlöslichkeit von cis-EID liegt bei  $1,63 \cdot 10^{-4}$  M und von trans-EID bei  $5,48 \cdot 10^{-5}$  M. Die hohe Streuung von cis-EID kommt durch partielle Isomerisierung zu trans-EID zustande. Eine Berechnung der Stabilitätskonstanten für cis-EID erscheint aus diesem Grund nicht sinnvoll.

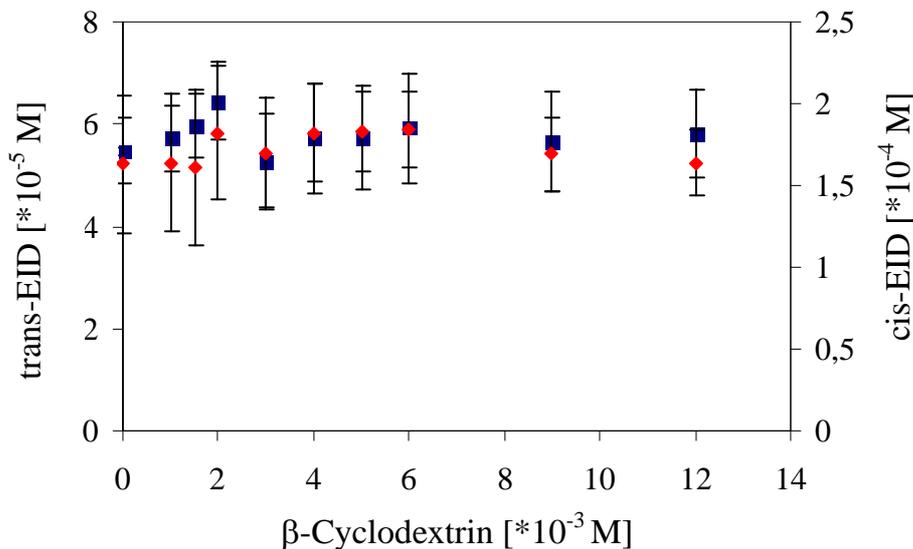


Abb. 4.4 Phasen-Löslichkeit-Diagramm von ■ trans-EID (linke Ordinate) und ◆ cis-EID (rechte Ordinate) mit  $\beta$ -CD in Wasser/Ethanol-Gemisch (75/25 V/V) bei 32 °C

#### 4 Bestimmung der Stabilitätskonstanten von ausgewählten Kamilleninhaltsstoffen mit $\beta$ -Cyclodextrin

In Tab. 4.2 sind die Daten zur Berechnung der Stabilitätskonstante zusammengestellt.

Tab. 4.2 Bestimmung der Stabilitätskonstanten von reinem (-)- $\alpha$ -Bisabolol, als Bestandteil des ätherischen Öls und trans-EID

Substanzen	Löslichkeit $S_O$ [M] $\cdot 10^{-4}$	Steigung	$R^2$ <sup>1)</sup>	$K_S$ [M <sup>-1</sup> ]
(-)- $\alpha$ -Bisabolol Reinsubstanz	4,76	0,115	0,996	273
(-)- $\alpha$ -Bisabolol im Kamillenöl	1,82	0,0524	0,994	304
cis-En-In- Dicycloether (EID)	1,64	0,0075	0,415	—
trans-EID	0,548	0,0046	0,899	84

<sup>1)</sup> Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden zur Ermittlung der Steigung

Das Plateau erreichen alle Substanzen ab einer  $\beta$ -CD Konzentration von  $2 \cdot 10^{-3}$  M, die (-)- $\alpha$ -Bisabolol-Reinsubstanz weist allerdings die höchste Steigung auf, wodurch es die deutlichste Verbesserung der Löslichkeit erfährt. Durch die im aufsteigenden Bereich gemessenen Punkte, wird eine Regressionsgerade gelegt. Die Güte der Regression ist durch den Korrelationskoeffizienten gegeben. Die Stabilitätskonstanten für reines (-)- $\alpha$ -Bisabolol oder in Gegenwart weiterer Bestandteile des ätherischen Öls sind nahezu gleich ( $273 \text{ M}^{-1}$  und  $304 \text{ M}^{-1}$ ). Ono et al. (2001) untersuchen ein binäres und ternäres System und stellen fest, dass die Konstanten ebenfalls unverändert bleiben. Die unterschiedlichen Grundlöslichkeiten von (-)- $\alpha$ -Bisabolol haben keinen Einfluss auf die Stabilität des Komplexes. Williams et al. (1998) beschreiben eine Phasen-Löslichkeit-Studie über lipophile pflanzliche Komponenten wie Limonen und 1,8-Cineol. Die von ihnen ermittelten Stabilitätskonstanten betragen für D-Limonen bzw.

#### 4 Bestimmung der Stabilitätskonstanten von ausgewählten Kamilleninhaltsstoffen mit $\beta$ -Cyclodextrin

1,8-Cineol mit  $\beta$ -CD 272 und 193  $M^{-1}$ . Dieses Ergebnis stimmt in seiner Dimension mit den Ergebnissen dieser Arbeit gut überein.

Die Anwesenheit von anderen Komponenten im ätherischen Öl hat zwar keinen Einfluss auf die Bildung des Komplexes mit (-)- $\alpha$ -Bisabolol und  $\beta$ -CD, aber vermutlich auf die unterschiedliche Löslichkeit der Substanz. Deshalb wird die Oberflächenspannung eines Ethanol/Wasser Gemisches und einer gesättigten (-)- $\alpha$ -Bisabolol- bzw. Kamillenöl-Lösung in diesem Gemisch gemessen und miteinander verglichen (Abb. 4.5).

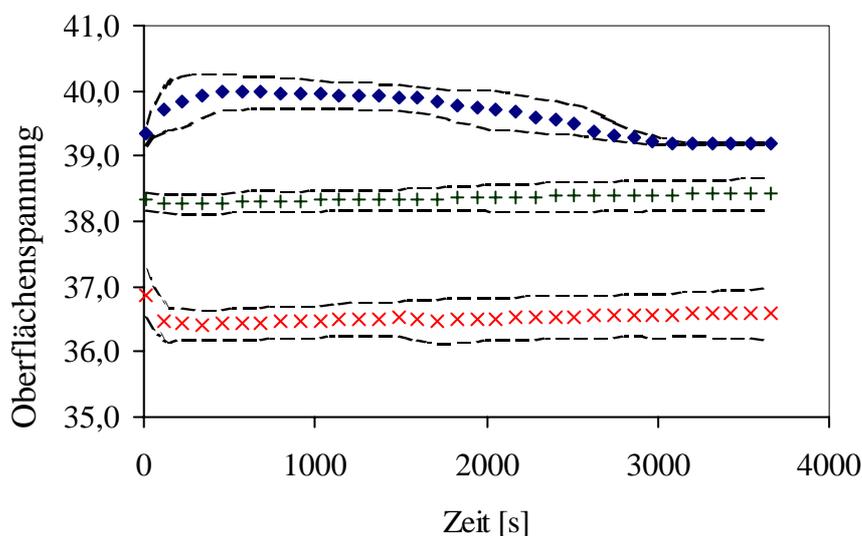


Abb. 4.5 Oberflächenspannungsmessung von:  $\blacklozenge$  Ethanol/Wasser Gemisch (25/75 V/V),  $++$  gesättigte Kamillenöl-Ethanol/Wasser-Lösung,  $\times \times$  gesättigte (-)- $\alpha$ -Bisabolol-Reinsubstanz Ethanol/Wasser-Lösung

Die Oberflächenspannungs/Zeit-Kurve des Ethanol/Wasser (25/75 V/V)-Gemisches liegt in einer Spanne von 39,3 bis 40 mN/m. Die gesättigte Kamillenöl Ethanol/Wasser Lösung zeigt einen konstanten Wert von 38,5 mN/m, wohingegen die (-)- $\alpha$ -Bisabolol-Ethanol/Wasser-Lösung nach einem kleinen initialen Abfall einen Wert von 36,5 mN/m erreicht. Dies zeigt eine geringfügig höhere Oberflächenaktivität von reinem

## 4 Bestimmung der Stabilitätskonstanten von ausgewählten Kamilleninhaltsstoffen mit $\beta$ -Cyclodextrin

---

(-)- $\alpha$ -Bisabolol verglichen mit dem ätherischen Öl, was der höheren Grundlöslichkeit von (-)- $\alpha$ -Bisabolol zugeschrieben werden kann. Daraus folgt, dass die Oberflächenspannungsmessungen die Löslichkeitsuntersuchungen bestätigen. Der Versatz der beiden Kurven von (-)- $\alpha$ -Bisabolol im Phasen-Löslichkeit-Diagramm kommt durch die veränderte Grundlöslichkeit als Folge der unterschiedlichen Oberflächenaktivitäten der beiden Lösungen zustande.

### 4.3 Diskussion der Ergebnisse

Das Phasen-Löslichkeit-Diagramm von (-)- $\alpha$ -Bisabolol-Reinsubstanz und der Komponenten (-)- $\alpha$ -Bisabolol, cis- und trans-EID des ätherischen Kamillenöls entspricht einem  $B_S$ -Typ nach Higuchi und Connors (1965). Das bedeutet, dass durch die Komplexbildung die Löslichkeit dieser Substanzen verbessert wird.

Die Stabilitätskonstante wird für den 1:1 Komplex aus dem linearen Anstiegsbereich berechnet und beträgt für das reine (-)- $\alpha$ -Bisabolol  $273 \text{ M}^{-1}$ , für (-)- $\alpha$ -Bisabolol als Bestandteil des ätherischen Öls  $304 \text{ M}^{-1}$  und für trans-EID  $84 \text{ M}^{-1}$ . Für cis-EID wird die Konstante wegen einer zu großen Streuung der Werte nicht berechnet,  $\beta$ -Farnesen ist im Ethanol/Wasser Gemisch unlöslich und bildet keine löslichen Komplexe mit  $\beta$ -CD. Vergleicht man (-)- $\alpha$ -Bisabolol, eine lipophile Substanz mit  $M_r = 220$  mit anderen ähnlichen Substanzen, wie z. B. D-Limonen oder 1,8-Cineol, so stellt man fest, dass die Stabilitätskonstanten in ähnlichen Bereichen liegen. Diesen Vergleich kann man auf weitere in Tab. 4.1 vorgestellte Substanzen ausweiten. Es bestätigt sich somit die Theorie, dass die Größe der Moleküle und deren Lipophilie entscheidend für die Bildung und die Stabilität der Komplexe sind.

(-)- $\alpha$ -Bisabolol-Reinsubstanz und (-)- $\alpha$ -Bisabolol als Bestandteil des ätherischen Öles unterscheiden sich durch verschiedene Grundlöslichkeiten. Eine Lösung von Bisabolol-Reinsubstanz in einem Ethanol/Wasser-Gemisch ist durch eine höhere Oberflächenaktivität gekennzeichnet als eine Lösung von Kamillenöl im selben Lösungsmittel; das erklärt die bessere Löslichkeit von reinem (-)- $\alpha$ -Bisabolol.

## Kapitel 5

### Herstellung und Charakterisierung der Komplexe

#### 5.1 Literaturüberblick

Die Methoden zur Herstellung von Einschlussverbindungen richten sich nach den Eigenschaften des Gastmoleküls, des eingesetzten CD und nach dem Produktionsmaßstab. Die Komplexierung kann in einer Lösung, einer Suspension, unter Druck, durch einfaches Mischen der Komponenten oder durch Schmelzen erfolgen. Bilden CD und Arzneistoff lösliche Komplexe, lassen sich feste Einschlussverbindungen durch Sprüh- oder Gefriertrocknung erhalten. Auf diese Weise werden Komplexe mit  $\beta$ -CD und Bendrofluazid, Chlorthiazid, Hydrochlorthiazid und Hydroflumethiazid (Corrigan and Stanley 1982) oder Spironolactone (Soliman et al. 1997) hergestellt. Einige Arzneistoffkomplexe mit z. B. Naproxen (Espinar et al. 1992), Tolbutamid (Veiga 1996, 2001) und/oder Methoxybutropat (Palmieri et al. 1997), werden neben der Lyophilisation und Sprühtrocknung zum Vergleich mittels der Knet- und Löslichkeitsmethode hergestellt. Die Auswahl der Herstellungsmethode ist vom jeweiligen Stoff abhängig.

Bei stark flüchtigen Verbindungen, wie den ätherischen Ölen, muss man mit erheblichen Verlusten rechnen und bevorzugt deshalb die Löslichkeits- ( $\cong$  Kopräzipitation) und die Knetmethode. Eine Voraussetzung für das Kopräzipitationsverfahren ist, dass das Phasen-Löslichkeits-Diagramm nach Higuchi und Connors (1965) dem  $B_s$ -Typ folgt, d.h. ein fester Komplex ausfällt. Die Kopräzipitation kann in wässrigem Milieu erfolgen, wenn das Gastmolekül ausreichend wasserlöslich ist oder sich in Gegenwart von CD oder Alkohol in den gelösten Zustand überführen lässt. Wegen der schlechten Löslichkeit von  $\beta$ -CD kann die Lösung auf 60 °C erwärmt werden (Hedges 1998). Nach Zugabe des Gastmoleküls wird die Lösung abgekühlt und bis zur Bildung des Komplexes geschüttelt. Aus rein wässrigen Systemen werden z. B. die  $\beta$ -CD-Einschlussverbindungen mit Fichtennadelöl (Sevastyanova et al. 1993), Cholesterol (Fridrich et al. 1990) und Ofloxacin (Koester et al. 2001) hergestellt. Die Bildung fes-

ter  $\beta$ -CD-Einschlussverbindungen aus wässrig-ethanolischen Lösungen gelingt mit ätherischen Ölen (Szente et al. 1982, Toss et al. 1994), Phensuximid (Ismail 1992) und Paracetamol (Kralova et al. 1983). Diese am häufigsten beschriebene Methode ist vor allem im Labormaßstab gebräuchlich. Die großen Wassermengen sowie die daraus resultierenden Abwässer sind für eine Produktion ungünstig.

Bei der Herstellung soll auf den Zusatz von organischen Lösungsmitteln verzichtet werden, da sie in den Hohlraum eingeschlossen werden und das Gastmolekül verdrängen können (Loftsson et al. 1999, Tokuoka et al. 1980, Schuette et al. 1993, Hirayama et al. 1994). Beim Abkühlen hochkonzentrierter  $\beta$ -CD-Lösungen ist ebenfalls Vorsicht geboten, da neben der Einschlussverbindung auch reines CD ausfallen kann (Toß 1990).

Zur industriellen Herstellung bietet sich das Knetverfahren an, bei dem zu einer konzentrierten Suspension aus CD und einem kleinem Teil Wasser oder Alkohol die gelöste oder suspendierte Komponente gegeben wird. Beim Verrühren nimmt die Viskosität zu und es entsteht eine Paste, die sich trocknen, pulverisieren und waschen lässt (Hirayama und Uekama 1987, Hedges 1998 und Saenger 1980). Besonders das Trocknen ist ein entscheidender Verfahrensschritt. Schon kleine Mengen Wasser können dazu führen, dass geringe Anteile des Komplexes in Lösung gehen, was eine De-komplexierung begünstigt (Hedges 1998).

Ein Vorteil der Knetmethode ist die optimale Ausbeute. Dieses Verfahren wird u. a. zur Komplexierung von Methoxybutropat (Palmieri et al. 1997), 5-Aminosalicylsäure (Zerrouk et al. 1998) und Acetaminophen (Gazzaniga et al. 1994 und Giordano et al. 1996) angewendet.

Die in dieser Arbeit untersuchten Einschlussverbindungen werden nach der Löslichkeits- und Knetmethode angefertigt. Die bereits angesprochenen Vorteile und Schwierigkeiten finden sich teilweise im Verlauf der Arbeit wieder und werden in den folgenden Kapiteln diskutiert.

### 5.2 Herstellung und Analytik der Komplexe nach der Lösungsmethode

Die Herstellung der Komplexe erfolgt in Anlehnung an die Phasen-Löslichkeits-Untersuchungen nach Higuchi und Connors (1965). Zu einer wässrigen Lösung wird bei Raumtemperatur (-)- $\alpha$ -Bisabolol oder ein Kamillenöl hinzugegeben. Nach einiger Zeit fällt ein feiner homogener Niederschlag aus. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand dekantiert und der feuchte Komplex weiter untersucht. Auf das Trocknen des Komplexes verzichtet man wegen der zu hohen Verluste sowohl beim Trocknen über Blaugel als auch bei der Lyophilisation. Sie betragen bei Trocknung im Exsiccator für Bisabolol 10 - 20 %, für die Bisabololoxide und Chamazulen 30 - 40 % und für die Spiroether bis zu 80 %; bei der Gefriertrocknung ( $-25\text{ °C}$  bis  $-5\text{ °C}$  bei  $3,5 \cdot 10^{-2}$  hPa über 12 h; Nachtrocknung bei  $20\text{ °C}$  über 4 h bei  $2,0 \cdot 10^{-1}$  hPa) sind es bei  $\beta$ -Farnesen bis zu 60 %, bei den restlichen Komponenten bis ca. 50 %. Die Herstellung des Komplexes ist in Abb. 5.1 schematisch dargestellt.

Hedges (1998) weist darauf hin, dass beim Trocknen der Komplexe mit flüchtigen Komponenten die Temperatur eine wichtige Rolle spielt: Zu hohe Temperaturen begünstigen die Verflüchtigung der Gastmoleküle; bei zu niedriger Temperatur und damit verlangsamtem Trocknungsprozess sind Gleichgewichtsverschiebungen in Anwesenheit von Wasser die Ursache für Verluste. Auf die Problematik des Wassers wird bei der Bestimmung der freien und eingeschlossenen Anteile ausgewählter Inhaltsstoffe im Komplex unter Punkt 5.2.2 näher eingegangen.

Vor einer gaschromatographischen Analyse müssen die Komponenten des ätherischen Öls aus der CD-Einschlussverbindung herausgelöst werden. Da die Cyclodextrine nicht flüchtig sind, würden sie im Einspritzblock oder am Anfang der Säule ausfallen und zur Verunreinigung des Gaschromatographen führen. Bei der Extraktion muss die Empfindlichkeit des ätherischen Öls berücksichtigt werden. Harangi und Nanasi (1984) extrahieren die ätherischen Öle aus der Einschlussverbindung bei  $60\text{ °C}$  in einem verschlossenen Gefäß mit Hilfe von Chloroform und Wasser im Verhältnis 1:25. Thoß et al. (1993) lösen den Komplex in einem DMSO/Wasser-Gemisch auf und extrahieren die Inhaltsstoffe mit n-Hexan. Diese Methode wird in einer leicht abgewandelten Form auch in dieser Arbeit verwendet. Auf das Wasser wird verzichtet, da die

## 5 Herstellung und Charakterisierung der Komplexe

Komplexe noch feucht sind, DMSO ist notwendig, weil  $\beta$ -CD darin gut löslich ist. Das ätherische Öl weist eine hohe Affinität zu n-Hexan auf und wird dadurch quantitativ beim Ausschütteln im n-Hexan angereichert. Die Wiederfindungsrate nach der Extraktion aus dem Komplex oder dem ätherischen Öl selbst beträgt für alle Inhaltsstoffe nahezu 100 %.

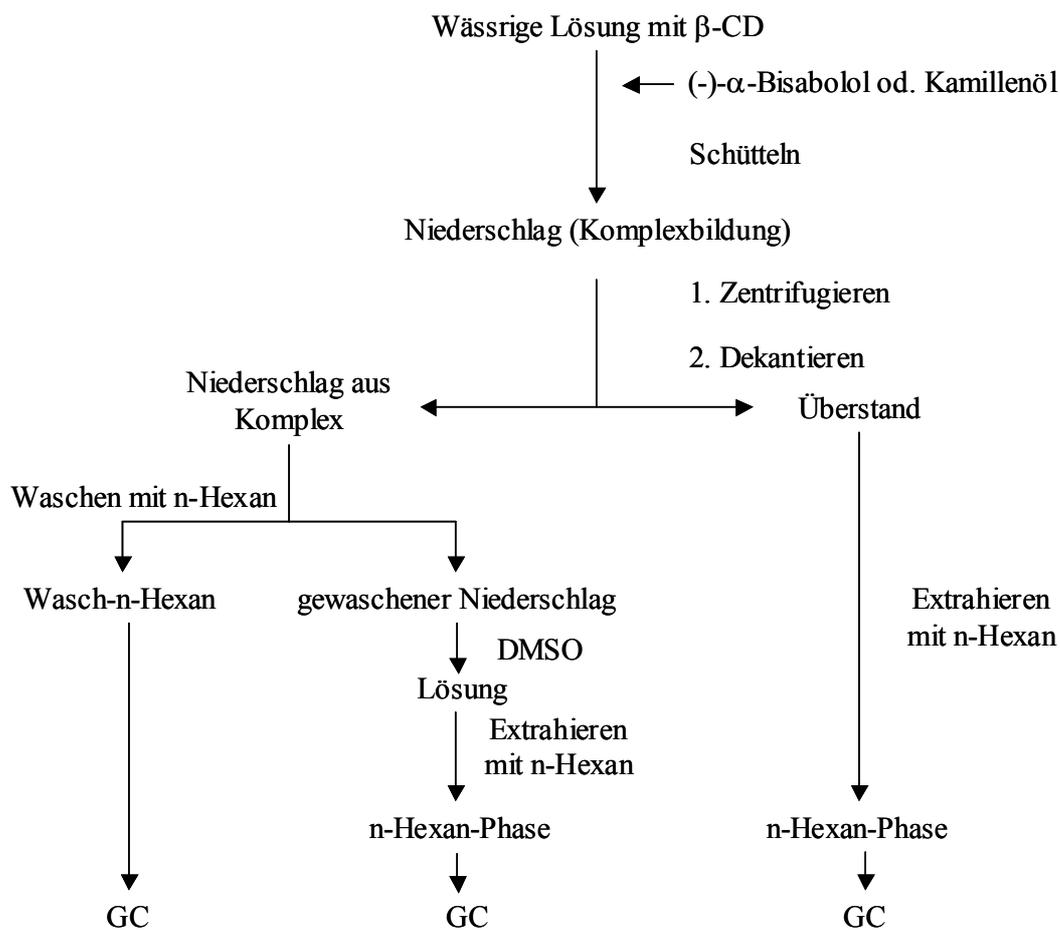


Abb. 5.1 Herstellung nach der Löslichkeitsmethode und Analytik eines  $\beta$ -CD/(-)- $\alpha$ -Bisabolol (od. Kamillenöl)-Komplexes mittels Gaschromatographie (GC)

### 5.2.1 Einfluss der Zeit und der molaren Zusammensetzung auf die Bildung des Komplexes mit (-)- $\alpha$ -Bisabolol-Reinsubstanz

Die Bestimmung der Einschussrate von (-)- $\alpha$ -Bisabolol in  $\beta$ -CD ist vor allem von zwei Faktoren abhängig:

- der Zeit, die (-)- $\alpha$ -Bisabolol benötigt, um eingeschlossen zu werden und
- der Zusammensetzung des Komplexes.

Die Zeit, die benötigt wird, um einen Komplex zu bilden, ist von der Substanz und der Methode abhängig. Dies gilt auch für die Stöchiometrie eines Komplexes. In der Literatur werden Equilibrierzeiten zwischen einigen Stunden und Wochen angegeben. Um die richtige Zeit und das molare Verhältnis zu ermitteln, werden die Proben nach 24, 48 Stunden und 4 Wochen geschüttelt und alle bei der Herstellung angefallenen Phasen untersucht (s. Abb. 5.1), d.h. der Überstand und das Wasch-Hexan, welche den nicht komplexierten Teil repräsentieren, sowie der Komplex mit dem eingeschlossenen (-)- $\alpha$ -Bisabolol. Nach 24 Stunden Equilibrierzeit wird für den  $\beta$ -CD/(-)- $\alpha$ -Bisabololkomplex im Verhältnis 2:1 mit 92,5 % die höchste Einschussrate gefunden. Die Ergebnisse sind in Tab. 5.1 dargestellt

Durch die Verdopplung der Equilibrierzeit auf 48 Stunden erhöht sich die Einschussrate nur im 2:1 Komplex. Sie beträgt hier 97 %. Nach vier Wochen steigt die Wiederfindungsrate für (-)- $\alpha$ -Bisabolol bei allen drei Zusammensetzungen; für den 1:2 Komplex beträgt sie 76 %, für den 1:1 Komplex 84 % und für den 2:1 Komplex 98 %.

## 5 Herstellung und Charakterisierung der Komplexe

Tab. 5.1 Bestimmung der Einschussrate von (-)- $\alpha$ -Bisabolol in  $\beta$ -CD in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis der Komponenten und der Equilibrierzeit.

(-)- $\alpha$ -Bisabolol [%] bezogen auf die Einsatzmenge			
$\beta$ -CD : (-)- $\alpha$ -Bisabolol	1:2	1:1	2:1
<b>Equilibrierzeit 24 h</b>			
Komplex	50,0	74,0	92,5
Überstand	21,5	9,0	0,0
Wasch-Hexan	35,0	16,0	5,0
<b>Equilibrierzeit 48 h</b>			
Komplex	46,7	73,0	97,0
Überstand	22,3	8,0	3,9
Wasch-Hexan	30,5	18,9	3,0
<b>Equilibrierzeit 4 Wo. *</b>			
Komplex	76,5	84,0	98,4
Überstand	16,4	13,0	0,0

\* kein (-)- $\alpha$ -Bisabolol im Wasch-Hexan detektiert

Eine Verbindung aus zwei Mol  $\beta$ -CD und einem Mol (-)- $\alpha$ -Bisabolol bildet schon nach 48 Stunden Equilibrierung stabile Einschlussverbindungen.

Anhand von Abb. 5.2 kann die genaue stöchiometrische Zusammensetzung ermittelt werden. Zu einer Lösung mit steigender molarer  $\beta$ -CD-Konzentration wird eine konstante (0,75 Mol) (-)- $\alpha$ -Bisabolol zugegeben.

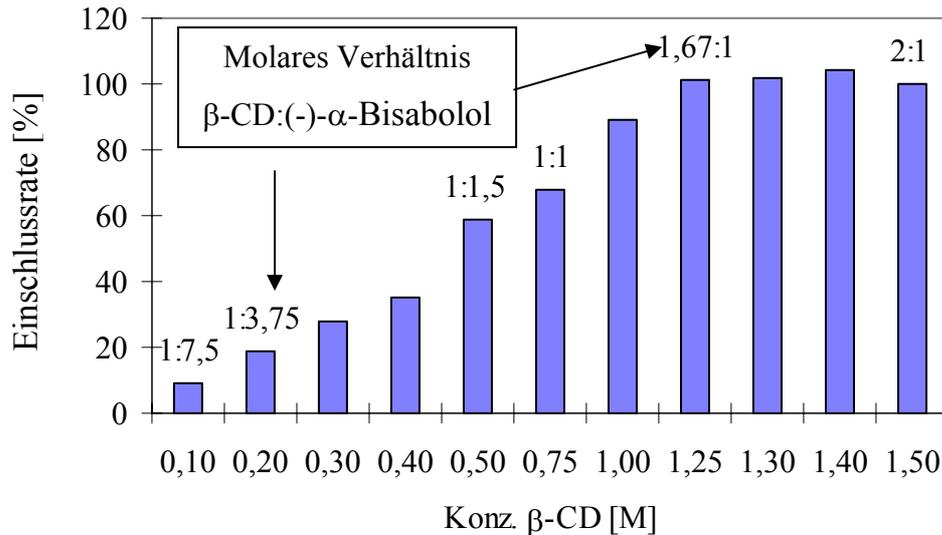


Abb. 5.2 Bestimmung der Einschussrate von (-)- $\alpha$ -Bisabolol in  $\beta$ -CD-Komplexe in Abhängigkeit von der molaren Zusammensetzung

Mit steigender Konzentration an  $\beta$ -CD steigt die Einschussrate von (-)- $\alpha$ -Bisabolol im Komplex, das Optimum wird bei einem Verhältnis von 1,67 Mol  $\beta$ -CD zu einem Mol (-)- $\alpha$ -Bisabolol erreicht. Das bedeutet, dass der Komplex gegenüber dem Waschvorgang mit n-Hexan stabil bleibt und kein (-)- $\alpha$ -Bisabolol herausgewaschen wird.

Um die Komplexzusammensetzung zu visualisieren, wird mittels einer Computersimulation ein Molecular Modelling durchgeführt. In Abb. 5.3 ist ein (-)- $\alpha$ -Bisabolol /  $\beta$ -CD- Komplex (1:1) dargestellt. Zu erkennen ist, dass zwar ein Komplex entsteht, jedoch ein Mol (-)- $\alpha$ -Bisabolol nicht vollständig von einem Mol  $\beta$ -CD eingeschlossen werden kann. Diese Darstellung repräsentiert die energiegünstigste Form des Einschusses.

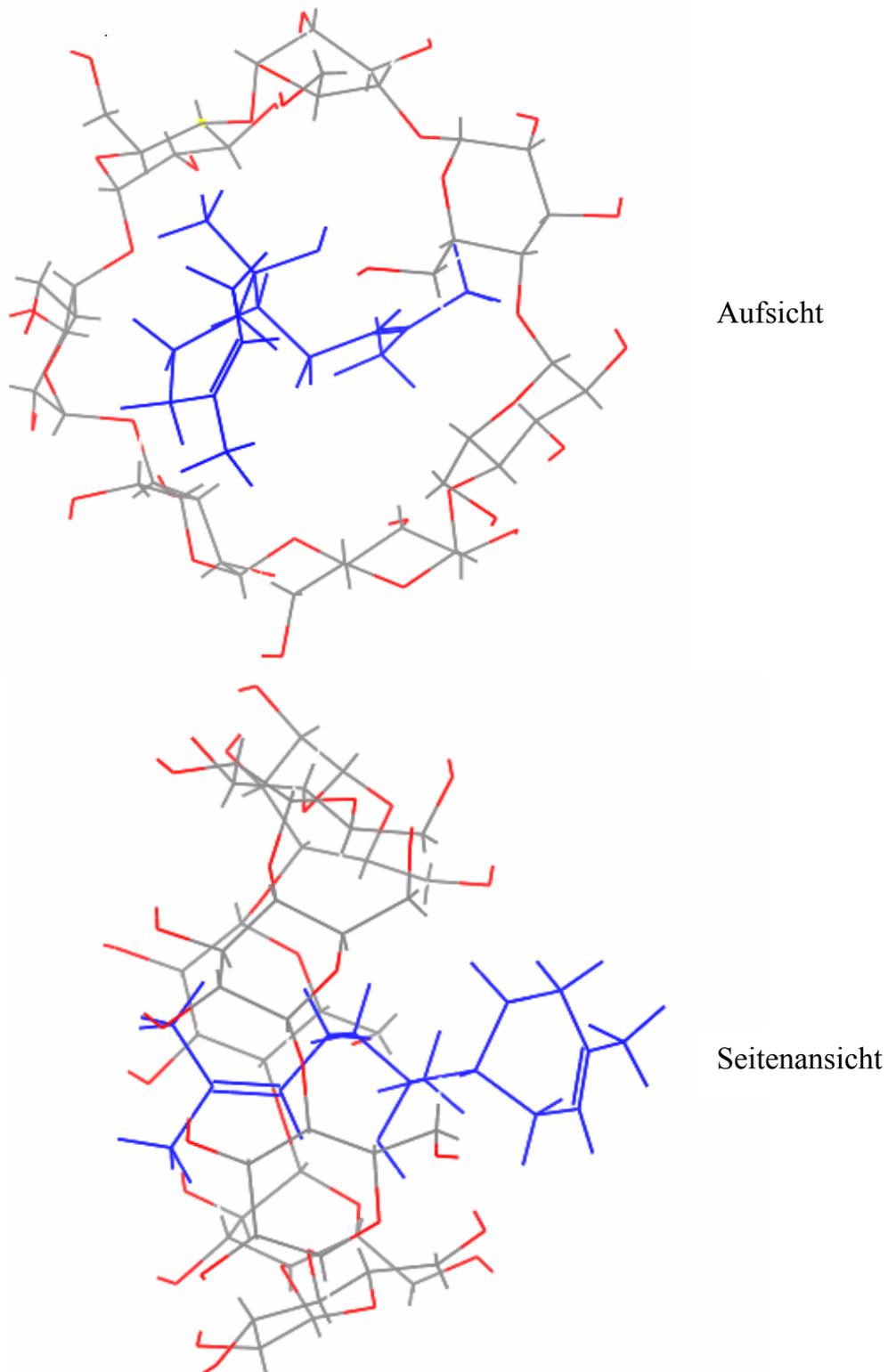


Abb. 5.3 Molecular Modelling mit Visualizer Modul von Material Studio 2.0 Software (Accelrys Inc. San Diego, CA, USA). Energie-Minimierung für (-)- $\alpha$ -Bisabolol mittels Compass Kraftfeld des Discover Moduls. Energie minimierte Darstellung des 1:1 (-)- $\alpha$ -Bisabolol/ $\beta$ -CD- Komplexes.

### **5.2.2 Bestimmung des freien und eingeschlossenen Anteils von ausgewählten Inhaltsstoffen von Kamillenöl in $\beta$ -Cyclodextrin / Kamillenöl-Komplex**

Das Kamillenöl wird gemäß dem Deutschen Arzneibuch durch Wasserdampfdestillation aus getrockneten Blütenköpfchen gewonnen (DAB 2001). Der Gehalt an wertbestimmenden Bestandteilen pro 1000 mg ätherischem Öl wird gaschromatographisch bestimmt:  $\beta$ -Farnesen 89 mg, Bisabololoxid B 4,5 mg, (-)- $\alpha$ -Bisabolol 220 mg, Bisabololoxid A 2,7 mg, Chamazulen 91 mg, cis-En-In-Dicycloether (EID) 140 mg und trans-EID 18 mg. Das Arzneibuch schreibt vor, dass die folgenden Substanzen innerhalb der angegebenen prozentualen Grenzen liegen müssen:  $\beta$ -Farnesen 13 – 45 %, Bisabololoxid A, B und Bisabolonoxid zusammen max. 45 %, Levomenol (Synonym (-)- $\alpha$ -Bisabolol) 10 – 30 % und Chamazulen 3 – 7 %. Bis auf  $\beta$ -Farnesen und Chamazulen entspricht das Öl diesen Anforderungen und wird in den folgenden Versuchen eingesetzt.

Gemäß den mit (-)- $\alpha$ -Bisabolol durchgeführten Versuchen, werden zwei Komplexe mit der molaren Zusammensetzung 1:1 - bezogen auf das (-)- $\alpha$ -Bisabolol im ätherischen Öl – und 2:1 ( $\beta$ -CD: (-)- $\alpha$ -Bisabolol) hergestellt und charakterisiert. Die zweite Variable ist die Equilibrierzeit; da sich bei einer Komplexierung von (-)- $\alpha$ -Bisabolol mit  $\beta$ -CD 48 Stunden als ausreichend erweisen, wird sie als Minimum beibehalten und durch eine Untersuchung nach 7-tägiger Equilibrierung ergänzt. Die Abb. 5.4 a, b und Abb. 5.5 a, b stellen die Ergebnisse dar.

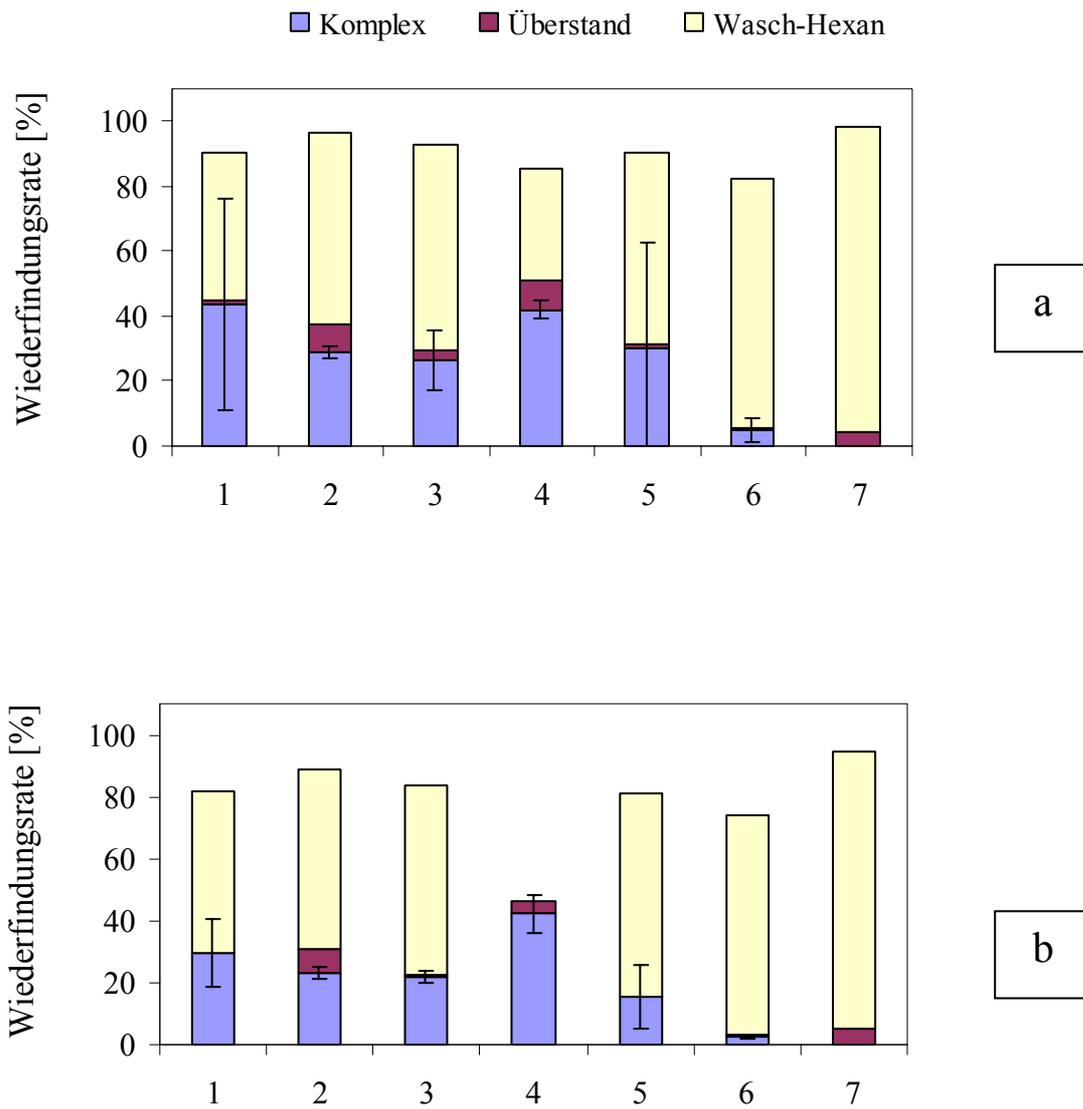


Abb. 5.4 Bestimmung der freien (Wasch-Hexan und Überstand) und eingeschlossenen (Komplex) Inhaltstoffe einer  $\beta$ -CD/Kamillenöl-Einschlussverbindung mit einer molaren Zusammensetzung  $\beta$ -CD:(-)- $\alpha$ -Bisabolol 1:1.  **$\beta$ -Farnesen (1), Bisabololoxid B (2), (-)- $\alpha$ -Bisabolol (3), Bisabololoxid A (4), Chamazulen (5), cis-En-In-Dicycloether (EID) (6), trans-EID (7)**; a) Equilibrierzeit 48 Stunden, b) 7 Tage; Bisabololoxid A im Washhexan nicht detektierbar

Die Wiederfindungsrate in der 1:1 Verbindung liegt mit Ausnahme von Bisabololoxid A und cis-En-In-Dicycloether (EID) für die untersuchten Inhaltsstoffe des Kamillenöls nach 48 Stunden Equilibrierung bei  $\geq 90\%$ . Der größte Teil muss dem freien Anteil

zugeschrieben werden, im Überstand findet man 50 - 70 % der Inhaltsstoffe wieder, bei den Spiroethern liegt der Anteil bei ca. 90 %; sie lagern sich an der Oberfläche des  $\beta$ -CD an und können aufgrund des mangelnden Einschlusses mit n-Hexan abgewaschen werden. Ein ähnliches Bild ergibt sich nach 7 Tagen Equilibrierung. Die Wiederfindungsrate sinkt um ca. 10 % und eine Erhöhung des komplexierten Anteils ist nicht zu verzeichnen (Abb. 5.4 b). Die geringere Wiederfindungsrate kann dadurch zustande kommen, dass ein Teil der Inhaltsstoffe bereits im Wasser abgebaut wird. (-)- $\alpha$ -Bisabolol wird bei Temperaturen über 50 °C und feuchter Lagerung zu den Bisabololoxiden umgewandelt (Schilcher 1987), Spiroether zeigen in Gegenwart von Wasser eine schnelle Zersetzung (Vogel 1992).

Die Abb. 5.5 a und Abb. 5.5 b zeigen die Ergebnisse für einen  $\beta$ -CD/(-)- $\alpha$ -Bisabololkomplex im Verhältnis 2:1. Wie man aus Abb. 5.5 a und b ersehen kann, beträgt die Einschussrate nach 48 Stunden für  $\beta$ -Farnesen, (-)- $\alpha$ -Bisabolol und die Bisabololoxide ca. 70 %, nach sieben Tagen steigt sie um 5 - 10 % an. Die Spiroether zeigen auch hier nach 48 Stunden Equilibrierung die niedrigste Einschussrate von ca. 30 bis 40 %, allerdings bringt die steigende Equilibrierdauer (7 Tage) für cis-EID eine Verbesserung auf ca. 70 %, wohingegen trans-EID unverändert bleibt. Der eingeschlossene Anteil ist durch ein größeres Angebot an  $\beta$ -CD deutlich höher geworden.

Für (-)- $\alpha$ -Bisabolol ist die Zusammensetzung 2:1 ( $\beta$ -CD: (-)- $\alpha$ -Bisabolol) bestätigt worden. Sowohl das reine (-)- $\alpha$ -Bisabolol, wie auch in Gegenwart von anderen Inhaltsstoffen des Kamillenöls wird bei diesem molaren Verhältnis die höchste Einschussrate erzielt. Beide Komplexe sind durch die gleiche Stabilitätskonstante charakterisiert. Chamazulen und die Spiroether, vor allem trans-EID, werden nur unzureichend eingeschlossen.

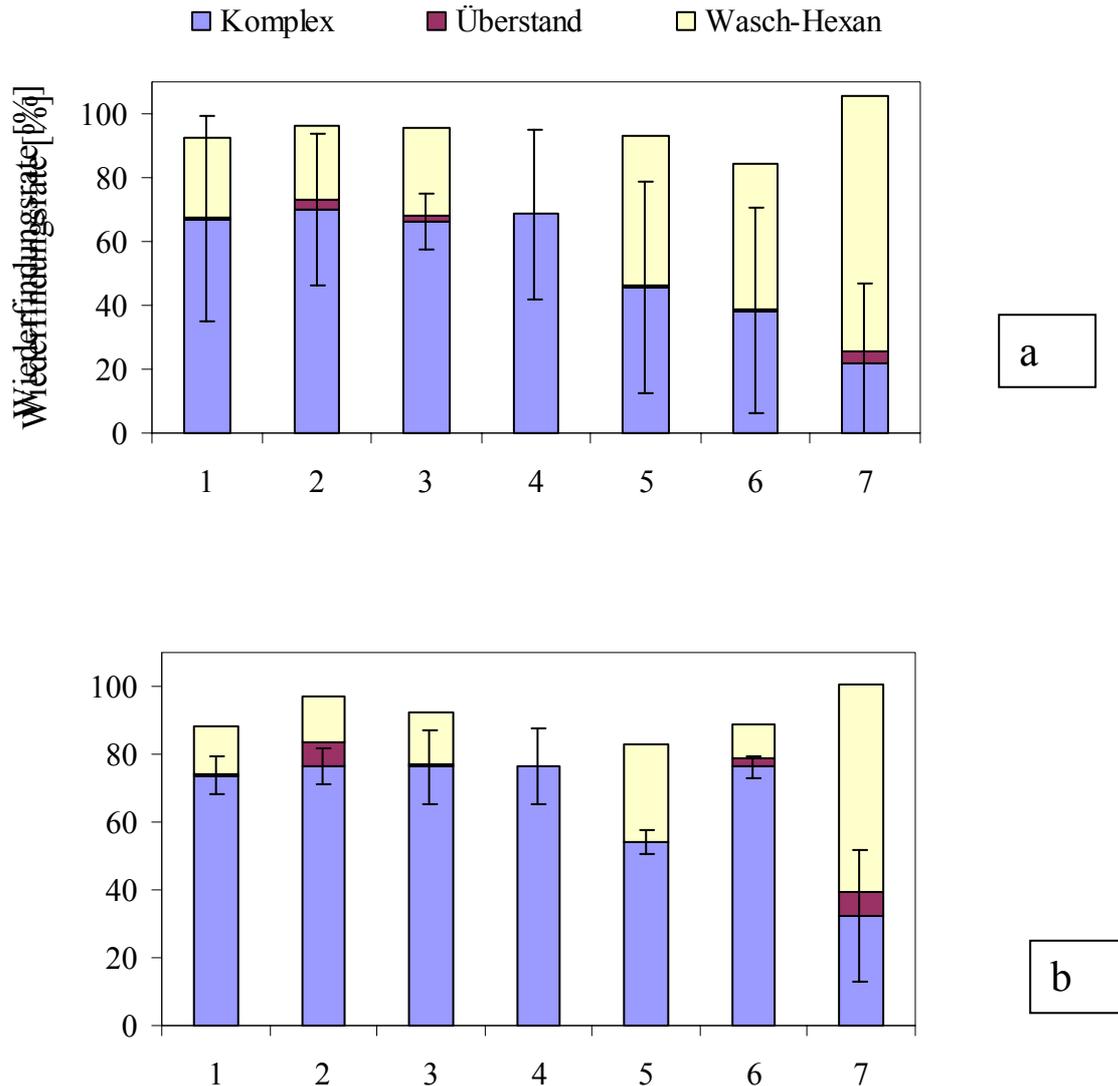


Abb. 5.5 Bestimmung der freien (Wasch-Hexan und Überstand) und eingeschlossen (Komplex) Inhaltstoffe einer  $\beta$ -CD/Kamillenöl-Einschlussverbindung mit einer molaren Zusammensetzung  $\beta$ -CD:(-)- $\alpha$ -Bisabolol 2:1.  **$\beta$ -Farnesen (1), Bisabololoxid B (2), (-)- $\alpha$ -Bisabolol (3), Bisabololoxid A (4), Chamazulen (5), cis-En-In-Dicycloether (EID) (6), trans-EID (7)**; **a**) Equilibrierzeit 48 Stunden, **b**) 7 Tage; Bisabololoxid A im Waschhexan nicht detektierbar.

Im nächsten Schritt soll der Einfluss eines Überangebotes an  $\beta$ -CD näher betrachtet werden (Abb. 5.6). Die Einschussrate von relevanten Kamillenöl-Inhaltsstoffen wird in einer  $\beta$ -CD-Lösung mit einem molaren Verhältnis 10:1 bezogen auf (-)- $\alpha$ -Bisabolol untersucht. Um im Bereich detektierbarer Mengen der Kamillenölbestandteile zu lie-

gen, muss bei einem 10:1 Komplex zunächst die  $\beta$ -CD-Menge erhöht werden, was aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit auch eine Erhöhung der Lösungsmittelmenge mit sich bringt.

Betrachtet man die Spiroether, so sieht man kaum eine Verbesserung in der Einschussrate, lediglich cis-EID steigt um ca. 10 % an. Auffällig ist, dass trans-EID vollständig im Überstand zu finden ist. Dieses Verhalten ist schwer zu erklären. Der Unterschied zu den vorherigen Versuchen ist die größere Lösungsmittelmenge, die möglicherweise das Gleichgewicht zugunsten des freien trans-EID verschieben könnte. (-)- $\alpha$ -Bisabolol und  $\beta$ -Farnesen werden bis zu 90 % in  $\beta$ -CD eingeschlossen. Die deutlich höhere Menge  $\beta$ -CD bringt allerdings nicht den erwarteten Erfolg.

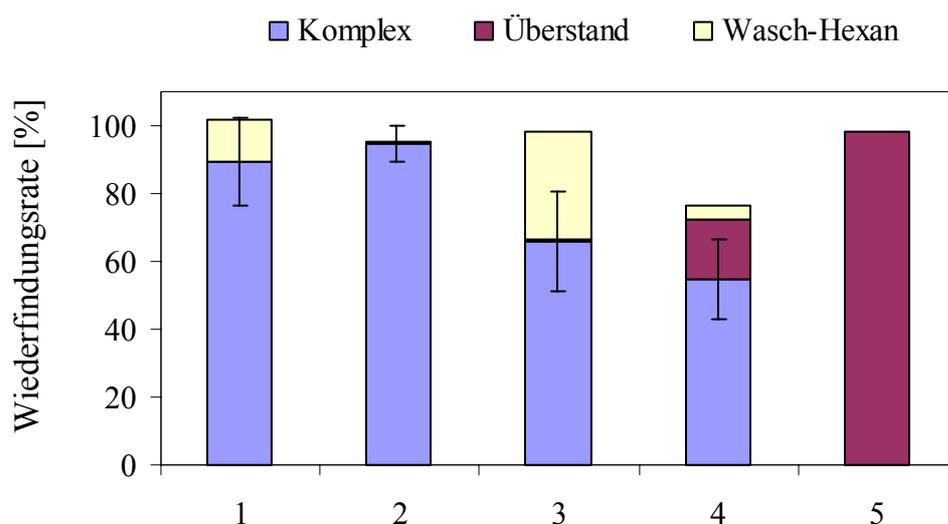


Abb. 5.6 Bestimmung der freien (Wasch-Hexan und Überstand) und eingeschlossen (Komplex) Inhaltstoffe in  $\beta$ -CD/Kamillenöl-Einschlussverbindungen mit einer molaren Zusammensetzung  $\beta$ -CD:(-)- $\alpha$ -Bisabolol 10:1.  **$\beta$ -Farnesen (1)**, **((-)- $\alpha$ -Bisabolol (2)**, **Chamazulen (3)**, **cis-En-In-Dicycloether (EID) (4)**, **trans-EID (5)**; Equilibrierzeit beträgt 48 Stunden.

In den Abbildungen entspricht die Reihenfolge der Substanzen ihrer zeitlichen Abfolge im Gaschromatogramm.  $\beta$ -Farnesen wird zuerst, die Spiroether zuletzt eluiert. Die

Einschlussraten weisen in genau dieser Reihenfolge eine abnehmende Tendenz auf (Abb. 5.5 a, b und Abb. 5.6), was den Schluss nahe legt, dass sie mit der Molekülgröße und –flüchtigkeit korrelieren. Je sperriger das Molekül, umso schwieriger der Einschluss: während beim Chamazulen die sehr starren aromatischen Ringe den Einschluss erschweren, ist bei den Spiroethern die langgezogene Struktur dafür verantwortlich (Abb. 5.10 d). Die Autoren Szente et al. (1982), Fornasier et al. (1986) und Thoß (1990) untersuchen die Wechselwirkung von Chamazulen bzw. Azulen mit  $\beta$ -CD und stellen u. a. fest, dass die Einschlussverbindungen während der Lagerung Entfärbungen zeigen, was daraufhin weist, dass Chamazulen nicht oder nur teilweise in CD eingeschlossen wird.

Die Diagramme, vor allem Abb. 5.4 a zeigen eine große Streuung, die Reproduzierbarkeit ist z.T. sehr schlecht. Der Grund dafür kann das Restwasser im Komplex sein. Die Einschlussverbindungen werden im feuchten Zustand analysiert. Das Gleichgewicht zwischen gelöstem und komplexiertem Teil kann sich in Gegenwart von Wasser verschieben und dadurch zu einer schlechten Reproduzierbarkeit führen. Das Auswaschen der Kamillenöl-Komponenten durch n-Hexan wird somit begünstigt. Auf dieses Problem, vor allem bei flüchtigen Komponenten, weisen auch Hedges (1998) und Frömming und Szejtli (1994) in ihren Arbeiten hin.

5.3 Herstellung und Analytik der Komplexe nach der Knetmethode

Die Komplexe werden entsprechend der Abb. 5.7 hergestellt und analysiert.

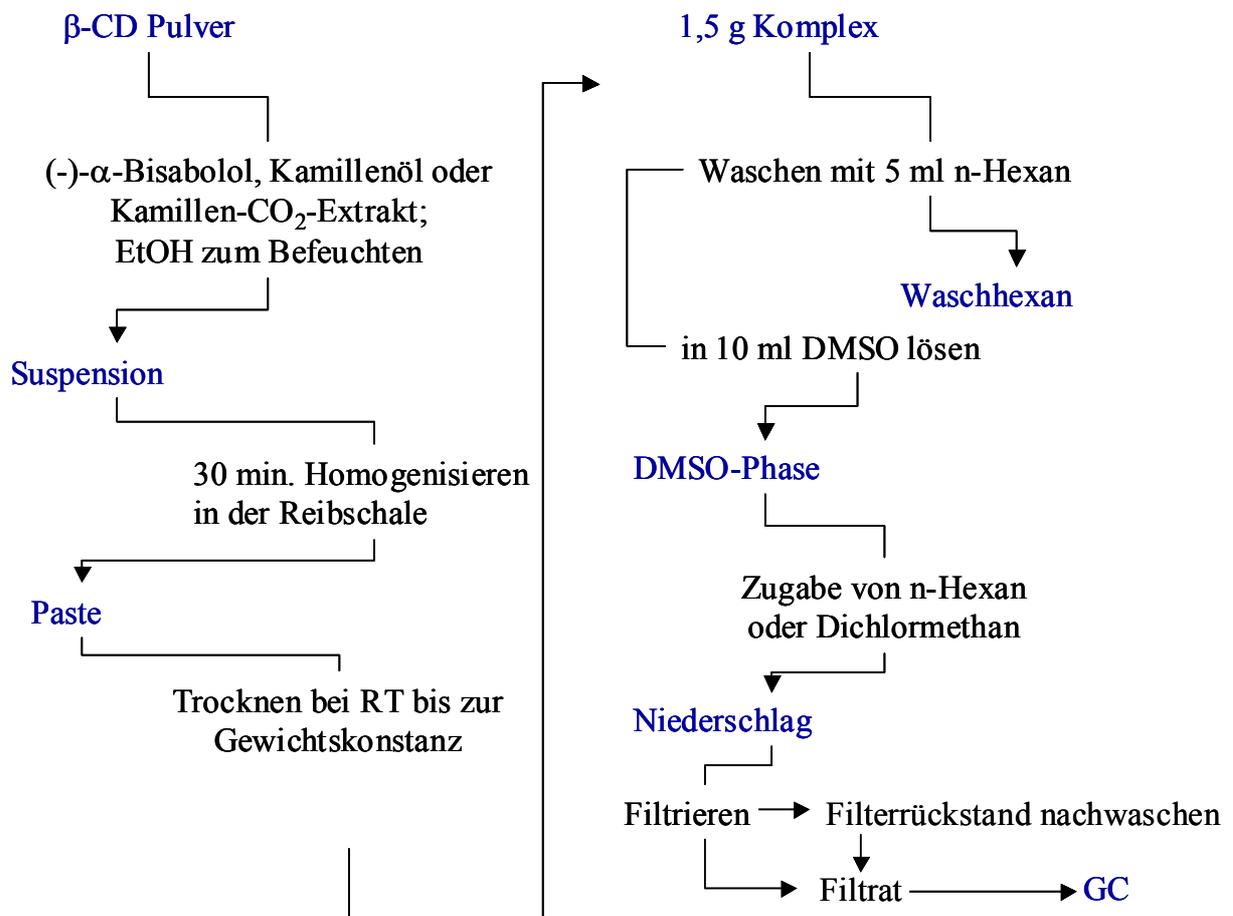


Abb. 5.7 Herstellung und Analytik der Einschlussverbindung nach der Knetmethode für die 3 Ausgangsstoffe (-)-α-Bisabolol, Kamillenöl und Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt

### 5.3.1 Versuche mit (-)- $\alpha$ -Bisabolol und Kamillenöl

Die ersten Versuche zur Herstellung des Komplexes werden mit der Leitsubstanz (-)- $\alpha$ -Bisabolol durchgeführt. Ein 10:1 ( $\beta$ -CD:(-)- $\alpha$ -Bisabolol) Verhältnis wird gewählt, um sicher zu sein, dass ein vollständiger Einschluss erfolgt. Drei unabhängig voneinander hergestellte Komplexe werden jeweils zweimal analysiert. Bei der Herstellung nach der Knetmethode werden nicht komplexierte Gastmoleküle an der Oberfläche des  $\beta$ -CDs adsorbiert, die durch Waschen mit n-Hexan werden. Die Notwendigkeit des Waschen der Komplexe beschreiben auch Frijlink (1990) und Veiga (2001). Es wird ein Lösungsmittel gewählt, in dem  $\beta$ -CD unlöslich, das Gastmolekül hingegen gut löslich ist. Nach intensivem Waschen mit n-Hexan beträgt die Wiederfindungsrate der eingeschlossenen Komponenten 90 %, im Wasch-Hexan werden 3 % (-)- $\alpha$ -Bisabolol wiedergefunden.  $\beta$ -CD bildet also auch in diesem Fall mit (-)- $\alpha$ -Bisabolol einen festen und stabilen Komplex, wobei die Streuung der Einschlußraten deutlich engere Vertrauensgrenzen aufweist als bei der Löslichkeitsmethode. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Knetmethode zeitsparender ist, da keine Equilibrierzeit von 48 Stunden notwendig ist und sie maschinell leichter durchzuführen und dadurch industrietauglicher ist.

Im nächsten Schritt wird das  $\beta$ -CD/Kamillenöl-System nach dieser Methode hergestellt. Das Verhältnis  $\beta$ -CD/Kamillenöl wird so gewählt, dass das molare Verhältnis  $\beta$ -CD:(-)- $\alpha$ -Bisabolol 10:1 beträgt. In der Tab. 5.2 ist die Wiederfindungsrate der Kamillenölinhaltstoffe aus dem mit n-Hexan nichtgewaschenen Komplex dargestellt, um sicherzustellen, dass keine Verluste während der Herstellung und Aufarbeitung entstehen.

$\beta$ -Farnesen, (-)- $\alpha$ -Bisabolol und Bisabololoxid B werden nahezu vollständig wiedergefunden, Chamazulen zu 80 % und cis-EID nur zu 21 %. Bisabololoxid A und trans-EID sind wegen der sehr geringen Gehalte nicht detektierbar. Auf das Problem der Wiederfindung bei den Spiroethern wird später näher eingegangen (s. 5.3.2).

## 5 Herstellung und Charakterisierung der Komplexe

Tab. 5.2 Gemeinsame Wiederfindung der freien und eingeschlossenen Kamillenöl-Inhaltsstoffe aus der  $\beta$ -CD/Kamillenöl-Verbindung, hergestellt nach der Knetmethode

	Wiederfindung [%] (n = 8)	relative Standardabweichung [%]	95%iger Vertrauensbereich [%]
$\beta$ -Farnesen	96,2	7,0	4,9
Bisabololoxid B	95,2	5,0	3,5
(-)- $\alpha$ -Bisabolol	91,8	8,6	6,0
Chamazulen	80,2	11,6	8,0
cis-EID	21,0	8,4	5,9
trans-EID	2,35 (n = 2)	0,07	0,05

Bei der Herstellung des Komplexes wird mit Hilfe von Ethanol zuerst eine Suspension aus  $\beta$ -CD und dem Gast angefertigt. Die Menge des Ethanols hat auch einen Einfluss auf die Stabilität des Komplexes. Bei den nachfolgenden Versuchen werden ca. 3 g  $\beta$ -CD, 300 mg ätherisches Öl und 5 ml Ethanol verwendet, eine Reduktion des Suspensionsmittels auf 2 ml führt zu deutlich instabileren Einschlüssen. Die Ergebnisse sind in Tab. 5.3 zusammengefasst.

Tab. 5.3 Wiederfindungsrate der freien und eingeschlossenen Inhaltsstoffe aus dem Kamillenöl/ $\beta$ -CD-Komplex, hergestellt mit 2 ml Ethanol

Wiederfindungsrate [%]	$\beta$ -Farnesen	Bisabololoxid B	(-)- $\alpha$ -Bisabolol	Chamazulen	cis-EID	trans-EID
Komplex	54,9	71,8	68,3	48,5	21,3	0,0
Waschhexan	47,0	31,5	34,0	38,5	41,8	75,4

Um den freien und eingeschlossenen Anteil zu ermitteln, werden die hergestellten Verbindungen zunächst gewaschen. Die im Komplex wiedergefundene Menge an (-)- $\alpha$ -Bisabolol korreliert mit der Einschussrate bei Einsatz von reinem (-)- $\alpha$ -Bisabolol; sie beträgt in beiden Fällen 90 %, im Wasch-Hexan wird kein (-)- $\alpha$ -Bisabolol nachgewiesen (Abb. 5.8). Ein ähnliches Bild ergibt sich bei  $\beta$ -Farnesen, Bisabololoxid B und Chamazulen, es wird nur ein verschwindend geringer Anteil herausgewaschen. Beim Chamazulen liegt die Einschussrate bei 80 % und entspricht damit der Wiederfindungsrate direkt nach der Herstellung. Die Einschussrate von cis-EID beträgt ca. 20 %, trans-EID konnte nicht detektiert werden (Abb. 5.8). Bei einer schlechten Wiederfindungsrate ist es schwierig die sehr geringe Menge von 2 % trans-EID bezogen auf 1000 mg Kamillenöl zu detektieren.

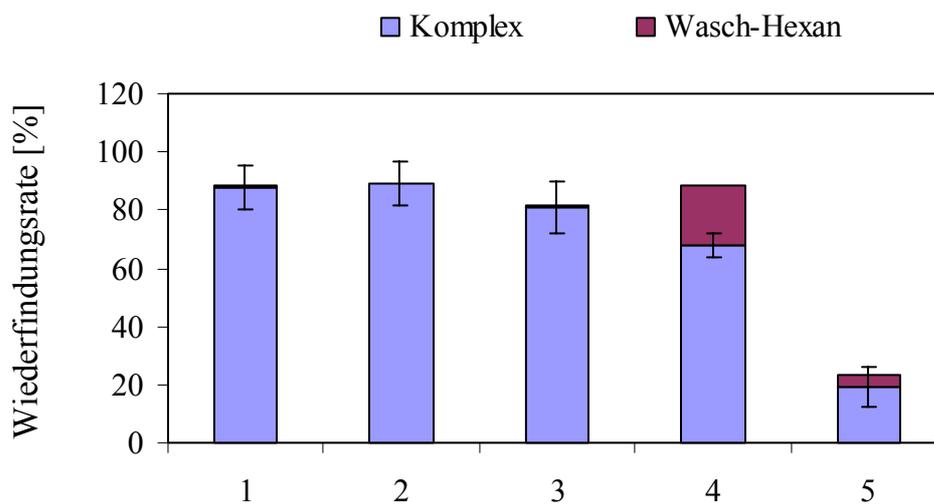


Abb. 5.8 Bestimmung der freien (Wasch-Hexan) und eingeschlossenen (Komplex) Inhaltsstoffe in  $\beta$ -CD/Kamillenöl-Einschlussverbindungen mit einer molaren Zusammensetzung  $\beta$ -CD:(-)- $\alpha$ -Bisabolol 10:1.  **$\beta$ -Farnesen (1), Bisabololoxid B (2), (-)- $\alpha$ -Bisabolol (3), Chamazulen (4), cis-En-In-Dicycloether (EID) (5)**, trans-EID nicht detektierbar. Komplex wird **EINMAL** gewaschen (Wasch-Hexan).

Betrachtet man die Einschussrate und den engen Vertrauensbereich der relevanten Inhaltsstoffe (mit Ausnahme der Spiroether), erweist sich die Knetmethode geeignet zur Herstellung des Komplexes. Wie man aus der Abb. 5.9 entnehmen kann, wird das

Resultat noch durch weitere Versuche bestätigt, bei denen die Proben intensiv gewaschen werden (s. 7.2.2.1).  $\beta$ -CD schließt (-)- $\alpha$ -Bisabolol,  $\beta$ -Farnesen und Bisabololoxid B nahezu vollständig ein. Chamazulen wird wie erwartet größtenteils (50 %) herausgewaschen. Wie schon erwähnt (s. 5.2.2) scheint Chamazulen aufgrund seiner Größe und einer starren Struktur schlecht einschließbar zu sein.

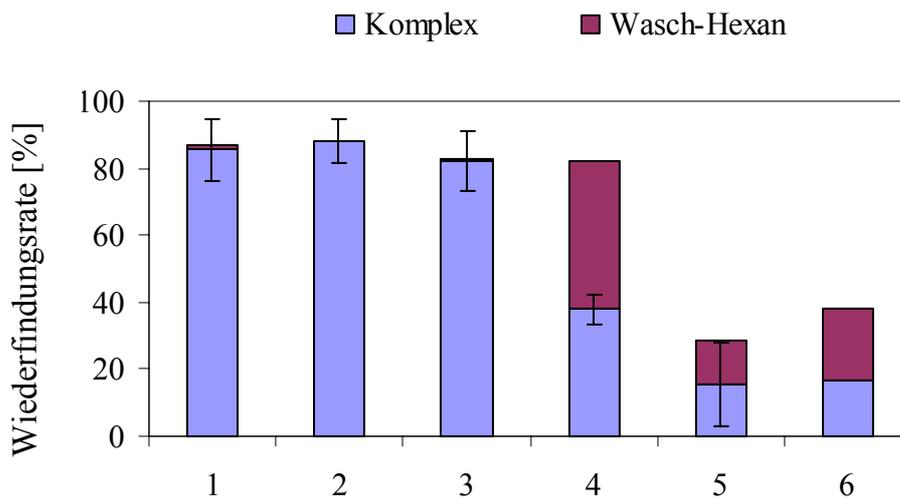


Abb. 5.9 Bestimmung der freien (Wasch-Hexan) und eingeschlossen (Komplex) Inhaltsstoffe in  $\beta$ -CD/Kamillenöl-Einschlussverbindung, mit einer molaren Zusammensetzung  $\beta$ -CD:(-)- $\alpha$ -Bisabolol 10:1.  **$\beta$ -Farnesen (1), Bisabololoxid B (2), (-)- $\alpha$ -Bisabolol (3), Chamazulen (4), cis-En-In-Dicycloether (EID) (5), trans-EID (6).** Komplex wird solange gewaschen bis keine Inhaltsstoffe im Wasch-Hexan nachweisbar.

### 5.3.2 Versuche mit Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt

Aufgrund der positiven Ergebnisse bei der Herstellung des  $\beta$ -CD/Kamillenöl-Komplexes nach der Knetmethode wird diese Methode auch für die Herstellung des Komplexes mit Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt gewählt.

Der Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt hat folgende Zusammensetzung:  $\beta$ -Farnesen 60 mg, Bisabololoxid B 3 mg, (-)- $\alpha$ -Bisabolol 130 mg, Bisabololoxid A 2 mg, cis-EID 125 mg und trans-EID 28 mg. Der Komplex wird gemäß der  $\beta$ -CD/(-)- $\alpha$ -Bisabolol- und  $\beta$ -CD/Kamillenöl-Verbindung aus einem Teil Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt und zunächst 10 Teilen  $\beta$ -CD angefertigt. Anschließend wird der  $\beta$ -CD-Anteil variiert, um die optimale Zusammensetzung zu ermitteln. In Abb. 5.11 a, b und c ist die Entwicklung eines stabilen Komplexes dargestellt. Die Komplexe unterscheiden sich entsprechend ihrer Zusammensetzung in Geruch und Aussehen. Einschlussverbindungen aus einem Teil Extrakt und 2 bzw. 5 Teilen  $\beta$ -CD riechen stark nach Kamille und haben pastöse Konsistenz. Die Komplexe mit 7 oder 10 Teilen  $\beta$ -CD und einem Teil Extrakt sind freifließende Pulver, deren Geruch deutlich reduziert ist. Szente et al. (1982) beschreiben solche Komplexe in ihrer Arbeit als „a pale blue coloured fine microcrystalline powder“ und „a faint camomile odour“.

Ein aus 10 g  $\beta$ -CD und 1 g Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt angefertigter Komplex erweist sich als stabil gegenüber dem Auswaschen mit n-Hexan, die Einschussrate von  $\beta$ -Farnesen, (-)- $\alpha$ -Bisabolol und Bisabololoxid B beträgt ca. 90 %, nur ein kleiner Teil von 5 bis 10 % wird herausgewaschen. Die Spiroether zeigen weiterhin dasselbe Verhalten mit schlechten Wiederfindungsraten und einer hohen Empfindlichkeit gegenüber dem Waschvorgang (30 % Wiederfindung in n-Hexan).

Das molare Verhältnis zwischen  $\beta$ -CD und (-)- $\alpha$ -Bisabolol (16:1) stimmt in diesem Fall nicht mit den früheren Mengenverhältnissen (10:1) überein, da der Gehalt an (-)- $\alpha$ -Bisabolol im ätherischen Öl höher als im CO<sub>2</sub>-Extrakt ist. Deshalb wird eine Reduktion der  $\beta$ -CD-Menge auf 7 g vorgenommen. Das molare aus  $\beta$ -CD und (-)- $\alpha$ -Bisabolol-Verhältnis beträgt dann 10:1 (Abb. 5.11 b).

7 g  $\beta$ -CD sind ausreichend, um  $\beta$ -Farnesen, (-)- $\alpha$ -Bisabolol und Bisabololoxid B in ihren, in einem Gramm Extrakt vorkommenden Mengen stabil einzuschließen. Die Einschussrate für diese Inhaltsstoffe beträgt wieder ca. 90 %. Andere Komponenten des Extraktes mit ähnlicher Molekülgröße und -struktur zeigen ein dem (-)- $\alpha$ -Bisabolol entsprechendes Einschussverhalten (Abb. 5.10 a, b, c). Die Einschussrate dieser Substanzen im Komplex ist von den im ätherischen Öl oder CO<sub>2</sub>-Extrakt vorhandenen Begleitstoffen unabhängig.

Der Versuch, den  $\beta$ -CD-Anteil weiter zu reduzieren, um einen Vergleich zur Löslichkeitsmethode aufzustellen, führt zu einem unbefriedigenden Ergebnis (Abb. 5.11 c). Sowohl 2 g, wie auch 5 g  $\beta$ -CD kombiniert mit einem Gramm Extrakt, was einem molaren Verhältnis von 3:1 oder 8:1 entspricht, liefern gleiche Einschussraten von  $\beta$ -Farnesen, (-)- $\alpha$ -Bisabolol und Bisabololoxid B. Die Einschussrate im Komplex ist im Vergleich zur Löslichkeitsmethode (Einschussrate 90 %) deutlich schlechter, lediglich 60 % werden eingeschlossen. Bestimmte Anteile lagern sich vermutlich nur an der Oberfläche der  $\beta$ -CD an und können somit sehr leicht mit n-Hexan abgewaschen werden. Durch Erhöhung des  $\beta$ -CD-Anteiles werden stabilere Einschussverbindungen hergestellt, und der Anteil an freien Komponenten verringert sich deutlich (Abb. 5.11 a, b).

Unabhängig vom Verhältnis  $\beta$ -CD zu Extrakt findet man ca. 30 % von cis- und trans-EID im Waschhexan wieder. Die gestreckte Struktur der Moleküle, bedingt durch alternierende Einfach-Dreifach-Bindungen (Abb. 5.10 d) lässt vermuten, dass Teile dieser Moleküle nach Komplexierung noch herausragen, was die Komplexstabilität reduziert und ein Herauswaschen erleichtern. Wie aus den Abb. 5.11 a und c ersichtlich, tritt bei den Spiroethern ein Defizit in der Wiederfindungsrate von ca. 20 - 30 % auf. Dies erwies sich als analytisches Problem, da die Spiroether eine hohe Affinität zu DMSO aufweisen und sich diese Bindung bei der Extraktion mit Dichlormethan nicht sofort lösen kann. Nach einer Equilibrierzeit des DMSO/Dichlormethan-Gemisches von 12 h werden die Spiroether zu nahezu 100 % wiedergefunden (Abb. 5.11 b). Die Verwendung von Dichlormethan als zweites Lösungsmittel ist notwendig, da kein rei-

## 5 Herstellung und Charakterisierung der Komplexe

---

nes DMSO in der Gaschromatographie eingesetzt werden kann. Dichlormethan wird aufgrund der guten Lösemittleigenschaften für Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakte gewählt.

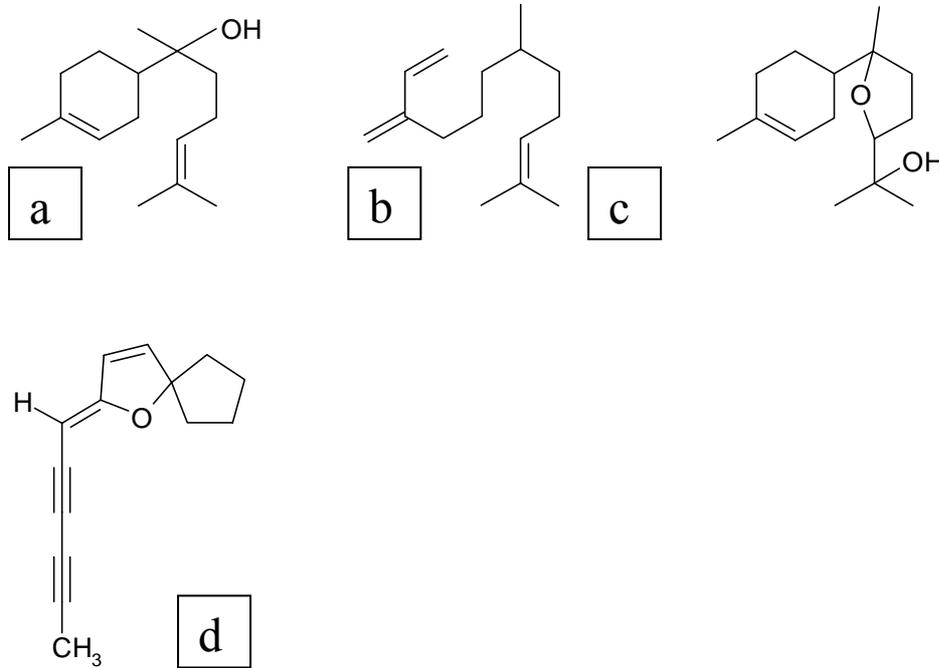


Abb. 5.10 a) (-)-α-Bisabolol, b) β-Farnesen, c) Bisabololoxid B und d) En-In-Dicycloether

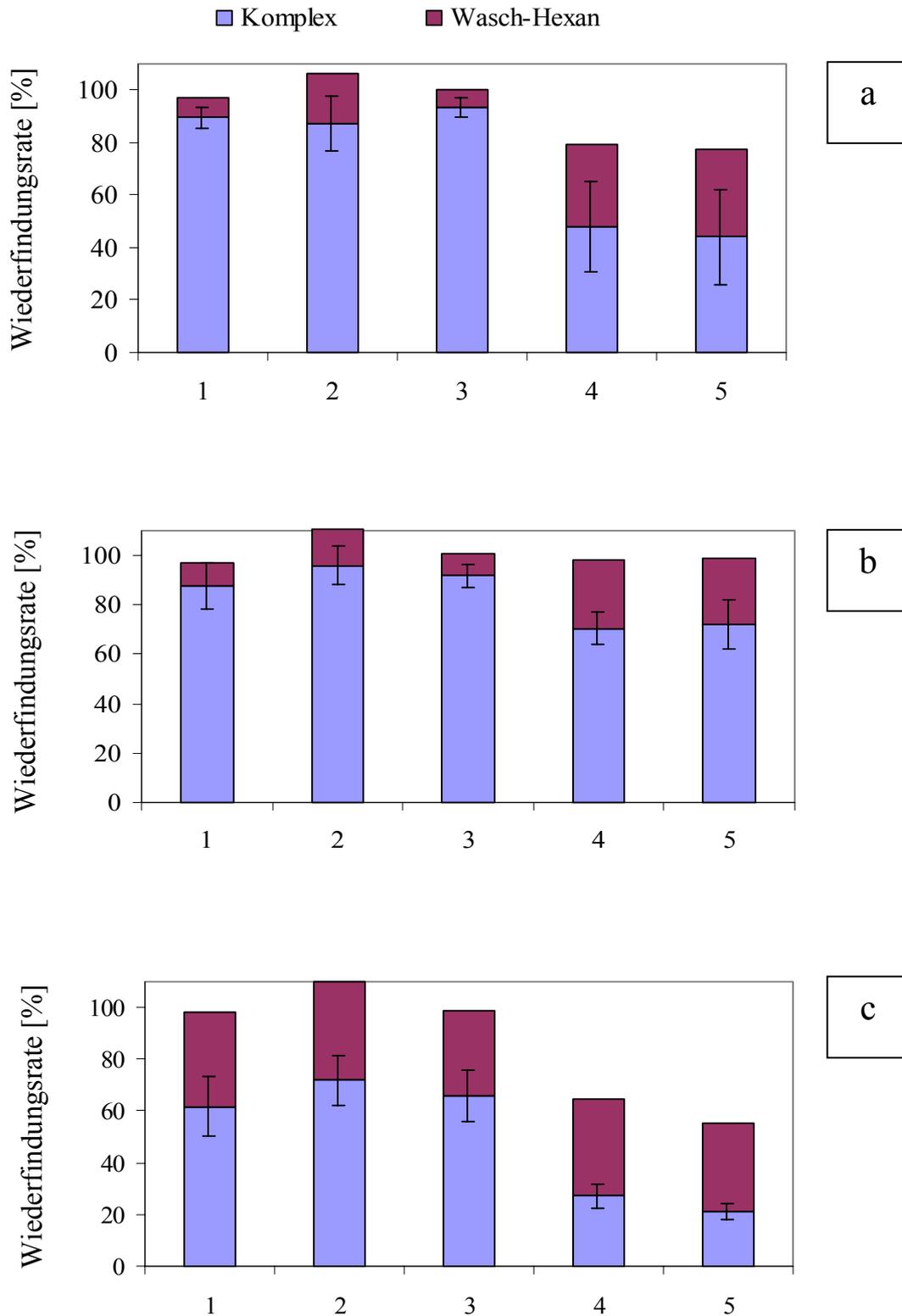


Abb. 5.11  $\beta$ -Farnesen (1), Bisabololoxid B (2), (-)- $\alpha$ -Bisabolol (3), cis-En-In-Dicycloether (EID) (4), trans-EID (5). Bestimmung der Einschussrate von eingeschlossenen (Komplex) und freien (Wasch-Hexan) Inhaltsstoffen in Verbindungen aus 1 g Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt und a) 10 g, b) 7 g und c) 2 und 5 g  $\beta$ -CD.

## 5 Herstellung und Charakterisierung der Komplexe

Im nächsten Schritt findet die Maßstabsvergrößerung von ca. 8 g Komplex, hergestellt in einer kleinen Reibschale ( $\varnothing$  9 cm) auf 120 g statt. Dafür wird die Verbindung in einer großen Reibschale ( $\varnothing$  26 cm) mit Pistill hergestellt und anschließend analysiert. Eine optische Prüfung deutet bereits darauf hin, dass kein vollständiger Einschluss stattgefunden hat, der Komplex ist dunkelgrün gefärbt und riecht stark nach Kamille. Eine gaschromatographische Untersuchung bestätigt die Vermutung, da ein großer Teil - bis zu 40 % der Inhaltsstoffe - im Wasch-Hexan zu finden ist. Der Komplex wird erneut in Ethanol suspendiert, und nach kurzem Verrühren wird die Paste durch den Drei-Walzen-Stuhl gegeben. Die Analytik und die optische Prüfung zeigen, dass ein stabiler Komplex entsteht. Die genauen Ergebnisse sind in der Abb. 5.12 zu sehen.

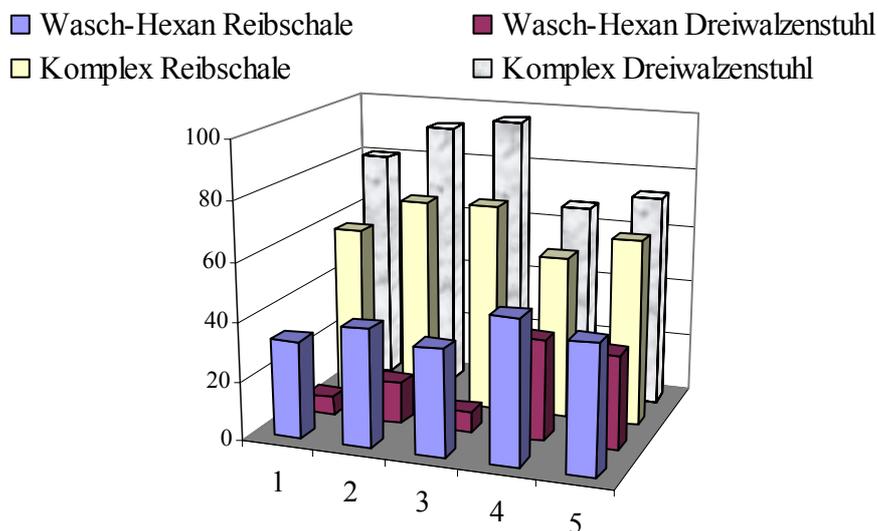


Abb. 5.12 Vergleich zwischen freien (Wasch-Hexan) und eingeschlossenen (Komplex) Inhaltsstoffen in  $\beta$ -CD/Kamillen- $\text{CO}_2$ -Extrakt-Verbindungen; **Verreiben in der Reibschale mit Pistill** und **Einsatz des Dreiwalzenstuhls**;  $\beta$ -Farnesen (1), Bisabololoxid B (2), (-)- $\alpha$ -Bisabolol (3), cis-En-In-Dicycloether (EID) (4), trans-EID (5).

### 5.4 Haltbarkeitsuntersuchungen des $\beta$ -Cyclodextrin / Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt-Komplexes

Die Stabilität ätherischer Öle kann durch Komplexierung mit Cyclodextrinen verbessert werden. So beschreiben Szente et al. (1988a) die Stabilisierung von Tee-Aromen wie Citronenöl, Bergamotte-, Jasmin-, Pfefferminz- und Zimtöl durch die Komplexbildung mit  $\beta$ -CD. Duftstoffe (Buschmann et al. 1991) sowie das ätherische Öl der Kamille (Szente 1981, Thoss et al. 1994) werden ebenfalls durch den Einschluss in  $\beta$ -CD stabilisiert. Es ist deshalb zu prüfen, ob die Stabilität der in einem Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt enthaltenen relevanten Inhaltsstoffe der Kamille durch den Einschluss in  $\beta$ -CD verbessert werden kann. Für die weiteren Untersuchungen wird der Komplex aus 7 Teilen  $\beta$ -CD und 1 Teil Extrakt verwendet, der Komplex wird bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , Raumtemperatur,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  über drei Monate eingelagert wird.

Abb. 5.13 zeigt die Ergebnisse der Haltbarkeitsuntersuchungen für die Leitsubstanzen im Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt. Cis- und trans- EID werden quantitativ gemeinsam erfasst. (-)- $\alpha$ -Bisabolol, erweist sich als sehr stabil. Der eingeschlossene Anteil liegt nach 3 Monaten bei allen Lagertemperaturen bei ca. 90 % bezogen auf den Ausgangsgehalt. Die EID zeigen relativ große Schwankungen im Gehalt, die aber weniger auf die Stabilität als auf die problematische Analytik der Substanzen zurückzuführen sind. Der eingeschlossene Anteil beträgt 60 - 80 %, was den ursprünglichen Mengen im Komplex direkt nach der Herstellung entspricht. Der instabile, nicht eingeschlossene Anteil wird durch das Waschen mit n-Hexan vorher entfernt. Szente et al. (1982) beschreiben, dass die Spiroether auch in einer komplexierten Form nach 72 Stunden bei  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$  zum Teil abgebaut werden. Allerdings wird in seiner Arbeit nicht zwischen freien und eingeschlossenen Anteilen unterschieden.

Von den untersuchten Bestandteilen des Kamillenextraktes ist das  $\beta$ -Farnesen als unsubstituiertes Sesquiterpen die flüchtigste Komponente. Da aber nach Komplexierung lediglich bei  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  einmal die 90 %-Grenze marginal unterschritten wird, kann für die anderen, weniger flüchtigen Extraktbestandteile auf eine höhere Stabilität und damit Einschussraten von über 90 % geschlossen werden.

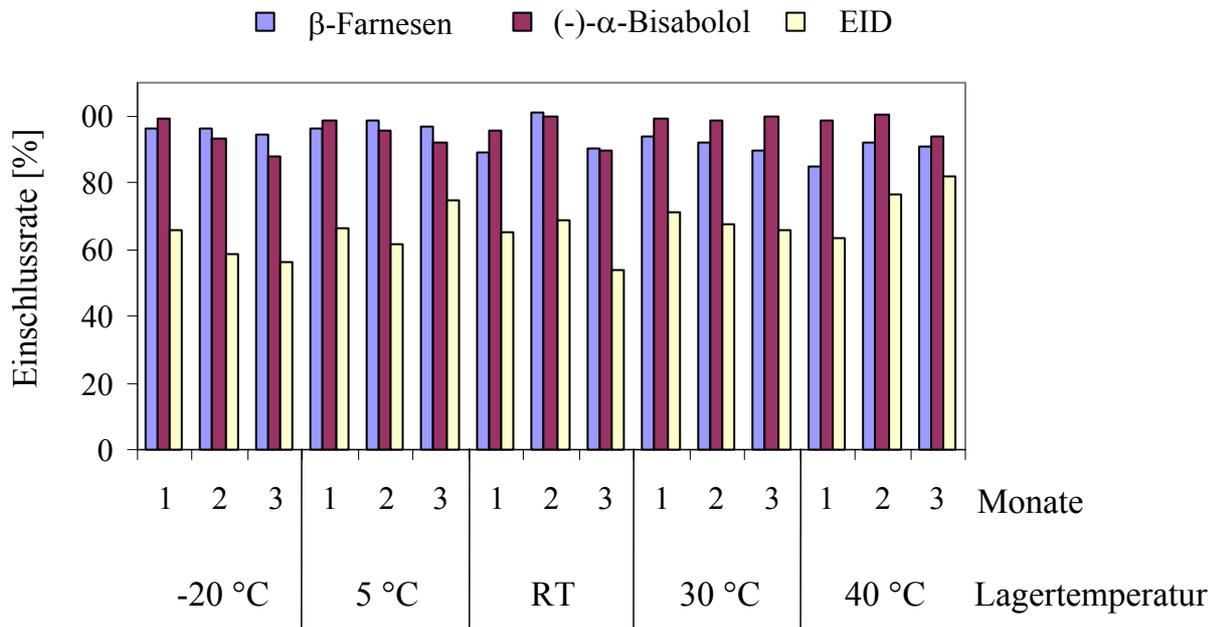


Abb. 5.13 Stabilitätsuntersuchung von  $\beta$ -CD/Kamillen- $\text{CO}_2$ -Extrakt-Einschlussverbindungen. Die Probenuntersuchung erfolgt nach dem **1. Monat (1), 2. Monat (2) und 3. Monat (3), bei einer Lagertemperatur von: -20 °C, 5 °C, Raumtemperatur, 30 °C, 40 °C.**

Wenn der eingeschlossene Anteil als 100%-Wert festsetzt wird, liegt die Wiederfindungsrate nach einer dreimonatigen Lagerung bei allen Temperaturen in den von EMEA vorgeschriebenen 95 – 105 %-Grenzen. Die Stabilität der Creme wird auf gleiche Weise überprüft (s. Kapitel 6.4).

Szente et al. (1988b) präsentieren die Ergebnisse einer zehnjährigen Stabilitätsstudie an pflanzlichen  $\beta$ -CD-Komplexen. Der Gehalt an Terpenoiden und schwefelhaltigen Inhaltsstoffen beträgt nach dieser Lagerungsdauer 80 - 100 %, wohingegen bei Substanzen mit phenolisch-aromatischen Charakter nur zu 40 - 60 % erhalten bleiben. Die in dieser Arbeit untersuchten Kamilleninhaltsstoffe sind ebenfalls terpenoiden Ursprungs. In einer früheren Arbeit stellen Szente et al. (1982) fest, dass die pharmakologisch wirksamen Kamilleninhaltsstoffe nach einem Einschluss in  $\beta$ -CD stabil gegenüber hohen Temperaturen (180 - 200 °C) und Oxidation durch Sauerstoff (Warburg-Apparatur in Sauerstoff-Atmosphäre bei 37 °C) bleiben. Thoss et al. (1994) wei-

sen darauf hin, dass auch eingeschlossene Inhaltsstoffe bei einer offenen Lagerung instabil werden. Dies wird auf die teilweise stattfindende Dissoziation der festen Einschlussverbindung durch Einwirkung der Luftfeuchtigkeit zurückgeführt.

### 5.5 Diskussion der Ergebnisse

Das stöchiometrische Verhältnis eines Komplexes aus  $\beta$ -CD und (-)- $\alpha$ -Bisabolol beträgt nach der Löslichkeitsmethode 1,67:1. Diese Zusammensetzung gilt sowohl für das reine (-)- $\alpha$ -Bisabolol, wie auch in Gegenwart von anderen Komponenten des ätherischen Öls. Andere Komponenten mit ähnlicher Molekülgröße und -struktur wie  $\beta$ -Farnesen und Bisabololoxid B zeigen ein dem (-)- $\alpha$ -Bisabolol ähnliches Einschlussverhalten. Die Einschlussrate dieser Substanzen im Komplex ist von den im ätherischen Öl oder CO<sub>2</sub>-Extrakt vorhandenen Begleitstoffen unabhängig. Die minimal notwendige Equilibrierzeit beträgt 48 Stunden, wobei eine Verlängerung keine wesentliche Verbesserung bringt. Die Spiroether zeigen nach 48 Stunden Equilibrierung die niedrigste Einschlussrate von ca. 30 bis 40 %, allerdings bringt hier die steigende Equilibrierdauer (7 Tage) für cis-EID eine Verbesserung auf ca. 70 %, wohingegen trans-EID unverändert bleibt. Der unvollständige Einschluss ist auf die starre Struktur der Spiroether zurückzuführen. Für die Löslichkeitsmethode folgt daraus ein optimales Verhältnis von  $\beta$ -CD zu (-)- $\alpha$ -Bisabolol wie 2:1 und eine Equilibrierzeit von sieben Tagen. In allen Untersuchungen an Komplexen, die mittels Löslichkeitsmethode hergestellt werden, fällt die schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auf. Der Grund dafür ist die ständige Gleichgewichtsverschiebung in einem feuchten Komplex und dadurch die Gefahr, dass Gastmoleküle verstärkt herausgewaschen werden und einer Zersetzung unterliegen können.

Durch das Knetverfahren erreicht man ebenso stabile Komplexe, deren Einschlussrate für (-)- $\alpha$ -Bisabolol,  $\beta$ -Farnesen und Bisabololoxid B ca. 90 % und für Spiroether 70 % beträgt. Das Produkt ist ein freifließendes, leicht nach Kamille riechendes Pulver. Kritische Verfahrensschritte bei der Herstellung sind die Wahl einer ausreichenden Menge Ethanol als Suspensionsmittel sowie ein genügend hoher Energieeintrag durch Verwendung eines Dreiwalzenstuhls. Das optimale molare Verhältnis von  $\beta$ -CD zu

(-)- $\alpha$ -Bisabolol beträgt 10:1, was einem Mengenverhältnis von 7 g  $\beta$ -CD und 1 g Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt entspricht. Die Tatsache, dass für die Bildung eines stabilen Komplexes mittels der Löslichkeitsmethode nur 2 Teile  $\beta$ -CD notwendig sind, kann am einfachsten dadurch erklärt werden, dass die Reaktionsfähigkeit einer Substanz in Lösung und damit molekulardisperser Verteilung erhöht wird. Begünstigt wird die Komplexbildung aus einer wässrigen  $\beta$ -CD-Lösung zusätzlich dadurch, dass Wassermoleküle in einer hydrophoben  $\beta$ -CD-Kavität keine Wasserstoff-Brücken-Bindungen ausbilden können und deshalb aus energetischen Gesichtspunkten ihren Platz den lipophilen Gastmolekülen zur Verfügung stellen (Cramer et al. 1967, Duchene et al. 1991 und Szejtli 1991).

Die Wasch-Hexan-Methode erweist sich als geeignet, um zwischen freiem und eingeschlossenem Anteil zu unterscheiden. Padukka et al. (2000) verwenden ebenfalls n-Hexan zum Waschen eines  $\beta$ -CD-Zitronenöl-Komplexes. Dieser Komplex wird nach der Löslichkeitsmethode in einem 7,3:1 (m/m)  $\beta$ -CD:Zitronenöl-Verhältnis hergestellt. Nach intensivem Waschen werden 12 % des Öls als freier Anteil bestimmt. Dieses Ergebnis stimmt mit den in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnissen überein, da die trockenen, nach der Knetmethode hergestellten Komplexe mit Ausnahme der Spiroether einen nichtkomplexierten Anteil von 10 % enthalten. Bhandari et al. (1998) untersucht  $\beta$ -CD:Zitronenöl-Komplexe mit einem deutlichen Überschuss an  $\beta$ -CD. Aus seiner Arbeit geht hervor, dass mit steigender CD-Menge weniger Zitronenöl herausgewaschen wird.

Der Vergleich zwischen Löslichkeits- und Knetverfahren fällt in dieser Arbeit zu Gunsten des Knetverfahrens aus. Unter wirtschaftlichen Aspekten eignet sich das Knetverfahren besser zur Herstellung der Komplexe im Produktionsmaßstab. Die kürzeren Equilibrierzeiten sparen materiellen und personellen Einsatz. Der Verzicht auf Wasser sowie das Wegfallen des bei flüchtigen Komponenten problematischen Trocknungsvorganges sind weitere Vorteile der Knetmethode. Diese Tatsachen kompensieren den höheren  $\beta$ -CD Bedarf der Knetmethode.

Die Ergebnisse der Haltbarkeitsuntersuchungen zeigen, dass die relevanten Inhaltsstoffe über 3 Monate auch bei einer Temperatur von 40 °C stabil bleiben. Dies sind für empfindliche Stoffe, wie Bestandteile des ätherischen Öls, Bedingungen, die einem

Stress-Test entsprechen. Betrachtet man den Anteil der eingeschlossenen Komponenten als 100 %-Wert, so liegt die Wiederfindungsrate in den Grenzen von 95 – 105 %.

## Kapitel 6

### Herstellung und Charakterisierung einer Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt – haltigen Creme

#### 6.1 Literaturüberblick

Die im Kapitel 5 beschriebenen Komplexe aus Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt und  $\beta$ -CD sollen in eine Creme zur Behandlung von Neurodermitis eingearbeitet werden.

Die Anwendung von Cyclodextrinen ist in der Kosmetik weit verbreitet. Die Herstellung eines stabilen und haltbaren Komplexes ist die Voraussetzung für eine weitere Applikation. Die Komplexbildung kann je nach Wirkstoff und Typ des Cyclodextrins die Arzneistofffreisetzung beschleunigen, verlangsamen oder nicht beeinflussen. Anhand eines HP- $\beta$ -CD/Hydrocortison-Komplexes können Sigurdardottir und Loftsson (1995) sowie Loftsson (2000) die Verbesserung der Penetration von Hydrocortison durch die Mäusehaut bei einer molaren 1:1 bis 1:1,5 Gast/CD-Zusammensetzung beweisen. Diesen Effekt machen sich auch andere Autoren zunutze. Eine Verbesserung der Lösungs- und Freisetzungsgeschwindigkeit erzielen Rahman et al. (1991) für Chloramphenicol aus hydrophilen Salben durch Einschluss in  $\beta$ -CD, Lopez et al. (2000) für Dexamethason nach Einschluss in  $\beta$ -CD und HP- $\beta$ -CD und Lee et al. (1997) für Capsaicin in einem HP- $\beta$ -CD-Komplex aus einem Gel. Glomot et al. (1988) steigern die Bioverfügbarkeit und die Stabilität von Tixocortol – einem Corticoid – in einer hydrophilen Creme oder Salbe nach Komplexierung mit  $\beta$ -CD. Ein  $\beta$ -CD/Tretinoin-Komplex verursacht weniger Hautreizungen als Vergleichspräparate mit unkomplexiertem Arzneistoff (Amdidouche et al. 1994). Ein ebenfalls positiver Effekt ist die geringere Photosensibilisierung der Haut nach Einschluss von Chlorpromazin in  $\beta$ -CD oder Dimethyl- $\beta$ -CD (Hoshino et al. 1989).

Es stellt sich die Frage, wie die Freisetzung aus einer Einschlussverbindung erfolgen kann. Cyclodextrine sind in der Lage, Interaktionen mit lipophilen Komponenten der Haut oder der Hornhaut einzugehen. Lipide aus dem *Stratum corneum* werden mit ei-

ner wässrigen  $\beta$ -CD oder HP- $\beta$ -CD Pufferlösung extrahiert (Legendre et al. 1995, Vittoria et al. 1997). Weitere Autoren bestätigen diese Ergebnisse (Irie und Uekama 1997, Uekama et al. 1982, Duchene et al. 1991 a, b, Friljink 1990, Loftsson und Masson 2001). Cholesterol, ein wichtiger Bestandteil biologischer Membranen, hat eine hohe Affinität zu  $\beta$ -CD und geht demzufolge starke Bindungen ein, woraufhin im Gegenzug das Gastmolekül freigesetzt wird. Die Stabilitätskonstante für  $\beta$ -CD/Cholesterol-Komplex beträgt  $16100 \text{ M}^{-1}$  (Shiotani et al. 1995). Die Autoren zeigen, dass Cholesterol aus den biologischen Membranen mit Hilfe von  $\beta$ -CD extrahiert werden kann. Biologische Membranen sind lipophil und können passiv nur von lipophilen Molekülen passiert werden. Diese passive Diffusion wird jedoch durch eine hohe Konzentration der Arzneistoffe in der angrenzenden wässrigen Membranumgebung angetrieben. Deshalb sollte der Arzneistoff für eine erfolgreiche Formulierung sowohl hydrophile als auch lipophile Eigenschaften besitzen. Durch den Einschluss in CD kann diese Bedingung erfüllt werden. Die Löslichkeit der Kamilleninhaltsstoffe in Wasser wird erhöht, und der lipophile Charakter ermöglicht eine Penetration durch die biologischen Membranen. Somit dienen CD als Träger, um die Arzneistoffe aus der Salbe als Donator-Phase in die Haut als Akzeptor-Phase zu bringen. Da  $\beta$ -CD mit Membranen in Wechselwirkung treten, drängt sich die Vermutung auf, dies könne zu Hautirritationen führen. Dagegen spricht, dass  $\beta$ -CD ein relativ großes Molekül ( $M_r$  1135 g/mol) mit einer hydrophilen Oberfläche ist und dadurch nur unter großen Schwierigkeiten durch biologische Membranen penetrieren kann (Rajewski und Stella 1996, Uekama et al. 1998, Masson et al. 1999). Arima et al. (1990) stellen eine Rangfolge der CD für die Penetration durch die Haut wie folgt auf:  $\beta$ -CD < Dimethyl- $\beta$ -CD < Hydroxypropyl- $\beta$ -CD. Vollmer et al. (1992) arbeiten mit radioaktiv markierten Hydroxypropyl- $\beta$ -CD und zeigen, dass dieses CD im *Stratum corneum* vermehrt zu finden ist, jedoch in den Talgdrüsen oder Blutgefäßen nur in marginalen Konzentrationen. Eine Akkumulation in den Haarwurzeln ist nicht zu verzeichnen. Frömming und Szejtli (1994) beschreiben, dass  $\beta$ -CD weder Hautirritationen noch allergische Kontakt-Dermatitis hervorruft. Die Tests wurden sowohl an Tieren als auch an Menschen durchgeführt.

### 6.2 Auswahl der Grundlage

Die Wahl der Grundlage erfolgt unter drei Aspekten:

- Therapie der Neurodermitis,
- Konsistenz der Grundlage.

Neurodermitis (Syn.: endogenes Ekzem, chronische oder chronisch-rezidivierende atopische Dermatitis) ist eine IgE-vermittelte Überempfindlichkeit vom Soforttyp, ausgelöst u. a. durch immunologische und nichtimmunologische Faktoren, v. a. psycho- und neurovegetative Störungen (Pschyrembel 1994). Betroffen können alle Partien der Haut sein, meistens begleitet ein Juckreiz die Erkrankung. Die lokale Therapie wird häufig in Form einer Glucocorticoid-Creme durchgeführt (Steigleder 1986, Braun-Falco et al. 2000). Eine 5%ige Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extraktcreme kann eine Alternative zur Cortisontherapie darstellen, was eine unveröffentlichte Studie der Firma Robugen zeigt. 20 Patienten bekamen anstelle eines schwach wirksamen Corticoidpräparates eine Kamillencreme. Innerhalb von drei Wochen war die Symptomatik bei zwei Patienten vollständig abgeheilt, bei den anderen trat eine deutliche Verbesserung ein. Bei der Wahl der Grundlage geben der subjektive Eindruck des Patienten, der Hauttyp und die Jahreszeit wichtige Hinweise. Empfohlen werden sowohl Salben als auch Cremes. Der Patient benötigt für die Dauer der Therapie mindestens vier verschiedene Präparate (Gieler 1999). Aufgrund der Hinweise aus der Literatur wird eine hydrophile Creme ausgewählt.

Ausgangspunkt ist eine  $\beta$ -CD/Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt-Creme bestehend aus drei Teilen  $\beta$ -CD und einem Teil Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt in einer O/W-Grundlage. Die Rezeptur ist in Tab. 6.1 dargestellt.

Tab. 6.1 Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt/ $\beta$ -CD-Creme

Substanzen	[%]
Kamillen-CO <sub>2</sub> -Extrakt/ $\beta$ -CD-Mischung	40,0
Phosphat-Puffer pH 7,7	19,2
Cremophor A 25	1,6
Cremophor A 6	0,8
Glycerolmonostearat	8,0
Weißes Vaseline	16,0
Dickflüssiges Paraffin	8,0
Wollwachs	4,0
Isopropylmyristat	2,4

Aufgrund der Instabilität des Matricins wird anstelle von Wasser Phosphatpuffer pH 7,7 verwendet (Ness et al. 1996). Im sauren pH-Bereich kann es über die Chamazulen-carbonsäure zu Chamazulen abgebaut werden, und ab pH 8 erfolgt eine Zersetzung zu 8-Desacetylmaticin. Muster dieser Creme werden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , RT,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 3 Jahre eingelagert und in bestimmten Zeitabständen einer optischen Qualitätskontrolle unterzogen. Der Phosphat-Puffer pH 7,7 wird in einfacher und fünffacher Ionenstärke hergestellt, um einen möglichen Einfluss beobachten zu können. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Tab. 6.2 a und b zusammengestellt.

## 6 Herstellung und Charakterisierung einer Kamillencreme

Tab. 6.2 a Haltbarkeitsuntersuchung einer Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt/ $\beta$ -CD-Creme mit Phosphatpuffer pH 7,7 (1,04 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O und 10,68 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O; einfache Ionenstärke)

Untersuchung bei [°C]	0. Wo.	2. Wo.	4. Wo.	8. Wo.	12. Wo.	6. Mo.	12. Mo.	18. Mo.	24. Mo.	36. Mo.
	-20	–	–	–	–	–	–	–	–	–
5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
RT	–	–	–	–	(–)	(–)	(–)	(–)	(+)	+
30	–	–	–	–	(–)	(–)	+	+(+)	++	++
40	–	–	(–)	(+)	(+)	+	(+)+	+++	+++	+++

Tab. 6.1 b Haltbarkeitsuntersuchung einer Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt/ $\beta$ -CD-Creme mit Phosphatpuffer pH 7,7 (5,2 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O und 53,4 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O)

Untersuchung bei [°C]	0. Wo.	2. Wo.	4. Wo.	8. Wo.	12. Wo.	6. Mo.	12. Mo.	18. Mo.	24. Mo.	36. Mo.
	-20	–	–	–	–	–	–	–	–	–
5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
RT	–	–	–	–	(–)	(–)	(–)	(–)	(+)	+
30	–	(+)	(+)	+	+	+	+	+(+)	++	++
40	–	(+)	(+)	+	+	+	(+)+	+++	+++	+++

Optische Veränderung: – keine, + leichte, ++stärkere, +++ sehr starke, () nicht eindeutig

RT: Raumtemperatur

Die Creme mit Phosphat-Puffer pH 7,7 in einfacher Ionenstärke bleibt nach drei Jahren bei  $-20\text{ °C}$  und  $5\text{ °C}$  unverändert, bei Raumtemperatur treten nach 2 Jahren leichte Farbveränderungen auf, diese Veränderungen sind bei  $30\text{ °C}$  nach 12 Monaten und bei  $40\text{ °C}$  schon nach 6 Monaten zu beobachten. Die Creme mit einem Phosphat-Puffer in fünffacher Ionenstärke zeigt bei den Temperaturen  $-20\text{ °C}$ ,  $5\text{ °C}$  und Raumtemperatur das gleiche Verhalten, nur bei höheren Temperaturen treten die Farbveränderungen eher auf. Gegenüber nicht gepufferten Zubereitungen sind die beiden Rezepturen positiv zu beurteilen, deshalb wird der Phosphat-Puffer pH 7,7 mit einfacher Ionenstärke für die weiteren Versuche gewählt.

Um eine Creme mit 5 % Anteil an Kamillenextrakt herzustellen, benötigt man 40 % des  $\beta$ -CD/Kamillen- $\text{CO}_2$ -Extrakt-Komplexes. Dies stellt besondere Anforderungen an die Grundlage, da trotz des hohen Feststoffanteils eine geschmeidige, gut streichfähige Creme entwickelt werden soll.

Wird in die Grundlage der Tab. 6.1 der Komplex einarbeitet, ist die Creme wegen ihrer harten Konsistenz nicht anwendbar. Da für diese Rezeptur schon eine orientierende Stabilitätsstudie vorliegt, wird versucht, durch Variation der Zusammensetzung die Konsistenz zu verbessern. Die Erhöhung des Wasseranteils oder der Ersatz von Vaseline durch Paraffin (s. Tab. 7.6) bringt keine Verbesserung. Veränderungen der Menge an Glycerolmonostearat oder Wollwachs führen zum Brechen der Creme. Aus diesem Grund muss die Suche nach einer geeigneten Grundlage auf vollständig neue Rezepturen ausgeweitet werden. Die nichtionische hydrophile Creme scheint angesichts der geringen Anzahl der Inhaltsstoffe und relativ weicher Konsistenz zur Herstellung der Creme geeignet zu sein. Direkt nach der Herstellung ist die Creme gut streichfähig, allerdings härtet sie über Nacht nach, wodurch sie unbrauchbar wird. Der hohe Wasseranteil wird vermutlich vom pulverförmigen Komplex aufgesaugt, was sich zusätzlich negativ auf die Stabilität der Kamilleninhaltsstoffe auswirken würde. Die Basiscreme nach DAC zeichnet sich durch eine extrem weiche Beschaffenheit aus und erweist sich als geeignet. Die Creme bleibt nach Einarbeitung der gesamten Pulvermenge streichfähig und angenehm aufzutragen. Ihre Konsistenz verändert sich auch im Laufe der Zeit nicht, es erfolgt keine Nachhärtung. Es sind keine Unverträglichkeiten

der Kamilleninhaltsstoffe mit den Bestandteilen der Basiscreme bekannt (Rezeptur s. Tab. 6.3).

Tab. 6.3 Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt/ $\beta$ -CD-Komplex-haltige Basiscreme

Substanzen	[%]
Kamillen-CO <sub>2</sub> -Extrakt/ $\beta$ -CD-Komplex	40
Phosphatpuffer pH 7,7	24
GMS	2,4
Cetylalkohol	3,6
Miglyol	4,5
Weißes Vaseline	15,3
Polyoxyethyleglycerol- monostearat	4,2
Propylenglycol	6

Für Propylenglycol gibt es Untersuchungen über den Einfluss auf die Stabilität von Kamilleninhaltsstoffen (Vogel und Schmidt 1993). In einem Propylenglycol-Extrakt bleiben (-)- $\alpha$ -Bisabolol und Bisabololoxide unverändert. Matricin ist in einem solchen Extrakt über 12 Wochen nachweisbar, wohingegen es mit anderen Extraktionsmitteln sofort zersetzt wird. Die Spiroether werden durch Propylenglycol stabilisiert. Da der Extrakt in  $\beta$ -CD eingeschlossen ist, dürften die Hilfsstoffe der Creme auf die Stabilität der relevanten Kamilleninhaltsstoffe einen untergeordneten Einfluss haben, mit Ausnahme der Spiroether, die nicht vollständig komplexiert werden. Propylenglycol zeichnet sich durch positive Eigenschaften, wie verbesserte Feuchthaltung und eine mögliche Penetrationsbeschleunigung von Arzneistoffen in die Haut aus. Ein weiterer Vorteil ist seine konservierende Wirkung.

### 6.3 Herstellung und Analytik der Creme

Die Herstellung der Creme erfolgt gemäß Rezeptur in Tab. 6.3 nach dem Schema in Abb. 6.1.

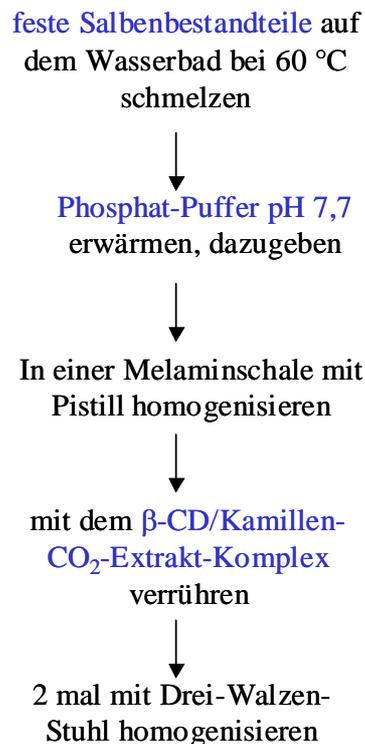


Abb. 6.1 Herstellung der  $\beta$ -CD/Kamillen- $\text{CO}_2$ -Extrakt -Komplex-Creme

Die festen Bestandteile der Grundlage werden auf dem Wasserbad bei 60 °C geschmolzen. Der Phosphatpuffer wird erwärmt und in kleinen Schritten in die Schmelze eingearbeitet, anschließend wird die modifizierte Basiscreme homogen gerührt und das verdunstete Wasser ergänzt. Zunächst stellt man eine Konzentratverreibung aus dem  $\beta$ -CD/Kamillen- $\text{CO}_2$ -Extrakt-Komplex und einem Teil der Grundlage her, um die Pulverpartikel mit einem dünnen Film aus Creme zu überziehen und eine bessere Einarbeitung zu ermöglichen. Anschließend wird die gesamte Grundlage zugefügt und der Ansatz zweimal durch den Drei-Walzen-Stuhl gegeben. Bei dem gewählten hohen Pulveranteil ist eine gute Homogenisierung besonders wichtig. Die an der Salbenmüh-

## 6 Herstellung und Charakterisierung einer Kamillencreme

le wirkenden Scherkräfte zerstören Feststoffagglomerate und liefern eine homogene, geschmeidige Creme.

Die Analytik der relevanten Kamilleninhaltsstoffe aus der Creme erfolgt nach Schema in Abb. 6.2

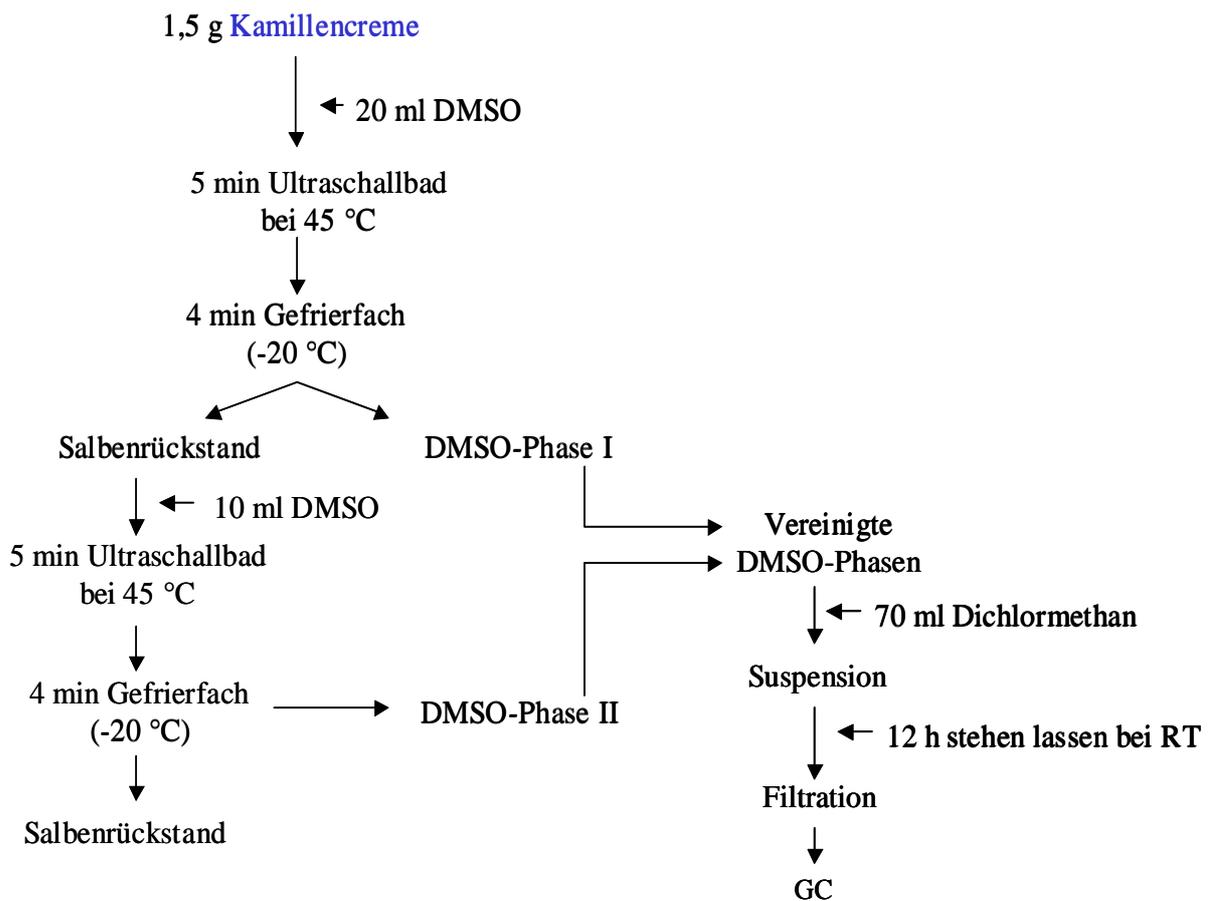


Abb. 6.2 Analytik der  $\beta$ -CD/Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt -Komplex-Creme

1,5 g der Creme werden in 20 ml DMSO bei 45 °C im Ultraschallbad innerhalb von 5 min gelöst. Damit die Bestandteile der Basiscreme im Gaschromatogramm nicht stören, wird die Emulsion zuerst im Gefrierfach bei -20 °C abgekühlt, die lipophilen Salbenbestandteile erstarren wieder und die DMSO-Phase kann separiert werden. Der Salbenrückstand wird wiederholt mit 10 ml DMSO versetzt und 5 min bei 45 °C im Ultraschallbad behandelt, abgekühlt und die DMSO-Phase abgetrennt, dies dient der vollständigen Extraktion aller Inhaltsstoffe. Die weitere Aufarbeitung der vereinigten DMSO-Phasen erfolgt gemäß der beschriebenen Analytik des Komplexes (s. Abb. 6.2 und Kapitel 7.2.2.2). In Abb. 6.3 ist die Wiederfindungsrate der relevanten Kamilleninhaltsstoffe dargestellt. Der freie und eingeschlossene Teil werden gemeinsam erfasst, da der Komplex vor dem Einarbeiten in die Creme nicht mit n-Hexan gewaschen wird. Für  $\beta$ -Farnesen und (-)- $\alpha$ -Bisabolol beträgt die Wiederfindungsrate nahezu 100 %, für cis-EID ca. 90 % und für trans-EID ca. 110 %. Eine teilweise Umwandlung von cis-EID zu trans-EID während der Aufarbeitung kann nicht vollständig vermeiden werden. Dieses Phänomen wurde schon von Linde (1972), Schilcher (1973), Ghassemi-Dehkordi (1988) und Grünhagen (1994) beschrieben. Den entscheidenden Einfluss auf die Isomerisierung von cis-EID zu trans-EID hat die Dauer und Intensität der Lichteinwirkung. Die Proben sollen daher vor Licht geschützt verarbeitet und gelagert werden.

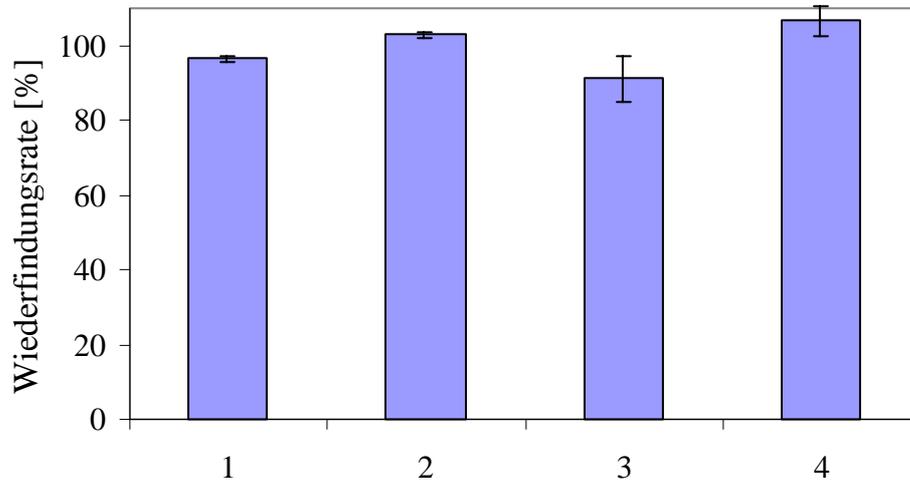


Abb. 6.3 Wiederfindungsrate von  **$\beta$ -Farnesen (1)**, **(-)- $\alpha$ -Bisabolol (2)**, **cis-En-In-Dicycloether (EID) (3)**, **trans-EID (4)** aus einer  $\beta$ -CD/Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt-Komplex-haltigen Creme.

Parallel zu dem Versuch mit der Kamillencreme werden der Komplex und der Extrakt auf die gleiche Art und Weise untersucht. In Abb. 6.4 sind die Gaschromatogramme des nativen Extraktes und der Salbenaufarbeitung einander gegenüber gestellt, um zu zeigen, dass die Hilfsstoffe aus der Grundlage das Chromatogramm des Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extraktes nicht stören und keine Veränderungen in der Zusammensetzung durch den Einschluss in  $\beta$ -CD und das Verarbeiten zu einer Creme im Vergleich zum nativen Extrakt auftreten (Gaedcke und Steinhoff 2000). Bisabololoxid A und B werden im Creme-Chromatogramm wegen zu kleiner Mengen nicht detektiert. Nach 13.52 min erscheint in diesem Chromatogramm ein Peak, der einem Hilfsstoff aus der Grundlage zuzuordnen ist. Die Güte der Trennung wird dadurch aber nicht beeinflusst und es werden keine relevanten Inhaltsstoffe überdeckt.

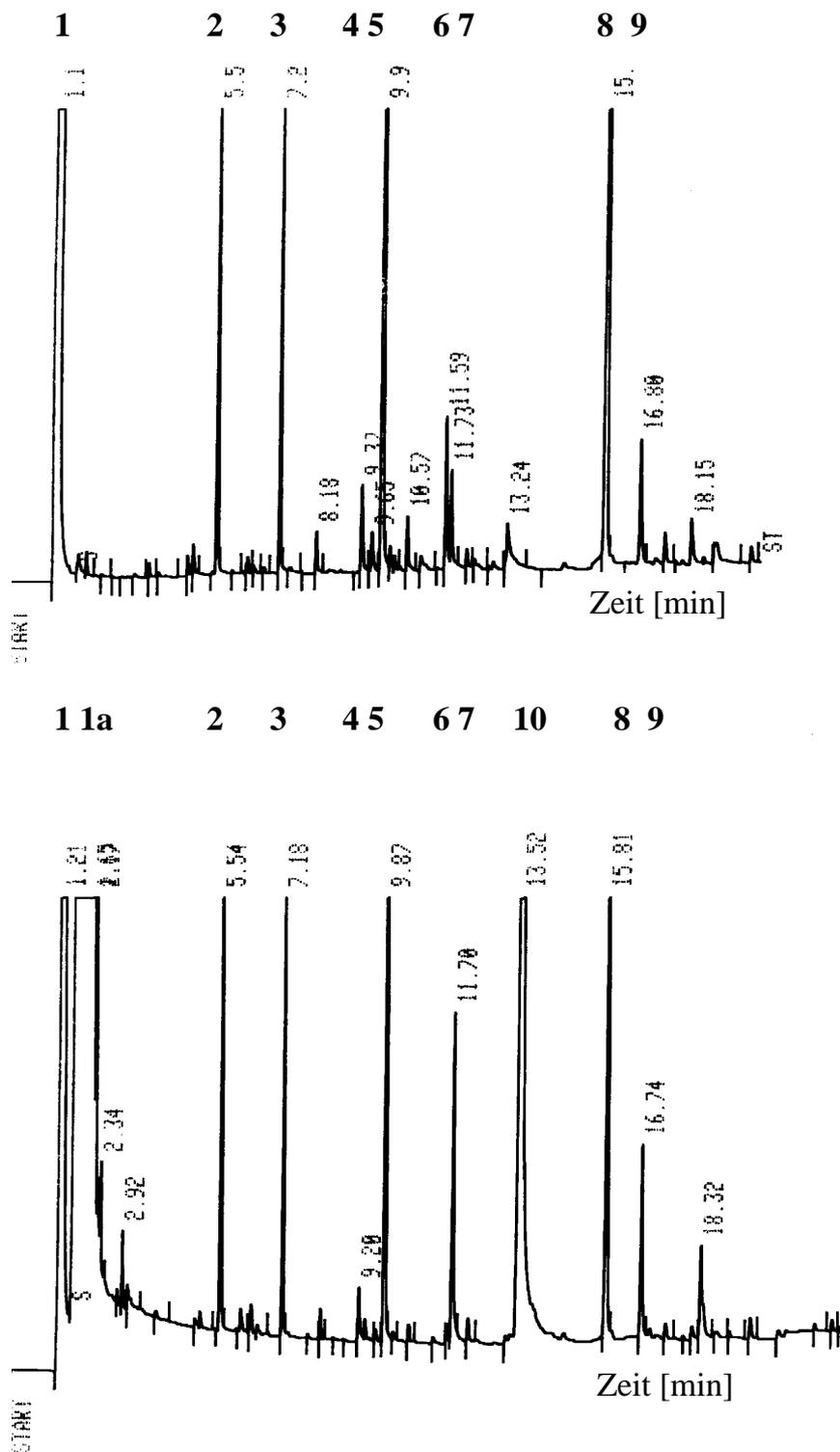


Abb. 6.4 Gaschromatogramm a) nativer Extrakt, b) nach Extraktion aus der Creme; (1) Dichlormethan, (1a) DMSO, (2)  $\beta$ -Farnesen, (3) n-Hexadecan (interner Standard), (4) Bisabololoxid B, (5) (-)- $\alpha$ -Bisabolol, (6) Bisabololoxid A, (7) Chamazulen, (8) cis-En-In-Dicycloether, (9) trans-EID und (10) ein Hilfsstoff aus der Basiscreme.

#### 6.4 Haltbarkeitsuntersuchungen

Die Kamillencreme wird unter den gleichen Bedingungen wie der Komplex eingelagert und untersucht (Kapitel 5). Wie bereits erwähnt, werden der freie und eingeschlossene Anteil gemeinsam erfasst sowie cis- und trans-EID zusammengefasst. Die Proben werden monatlich über eine Dauer von 3 Monaten untersucht. Die gewählten Lagerbedingungen liegen zwischen  $-20$  und  $+40$  °C. Bei  $-20$  °C und  $+5$  °C wird durch das Verfahren der Probennahme und -analytik außerdem die Beständigkeit der Creme gegen wechselnde Temperaturbedingungen (Auftauen, Wiedereinfrieren) getestet. Die Lagertemperaturen  $+30$  °C und  $+40$  °C stellen für die leicht flüchtigen Kamilleninhaltsstoffe bereits Bedingungen eines Stresstestes dar. In Abb. 6.5 sind die Ergebnisse der dreimonatigen Prüfung dargestellt.

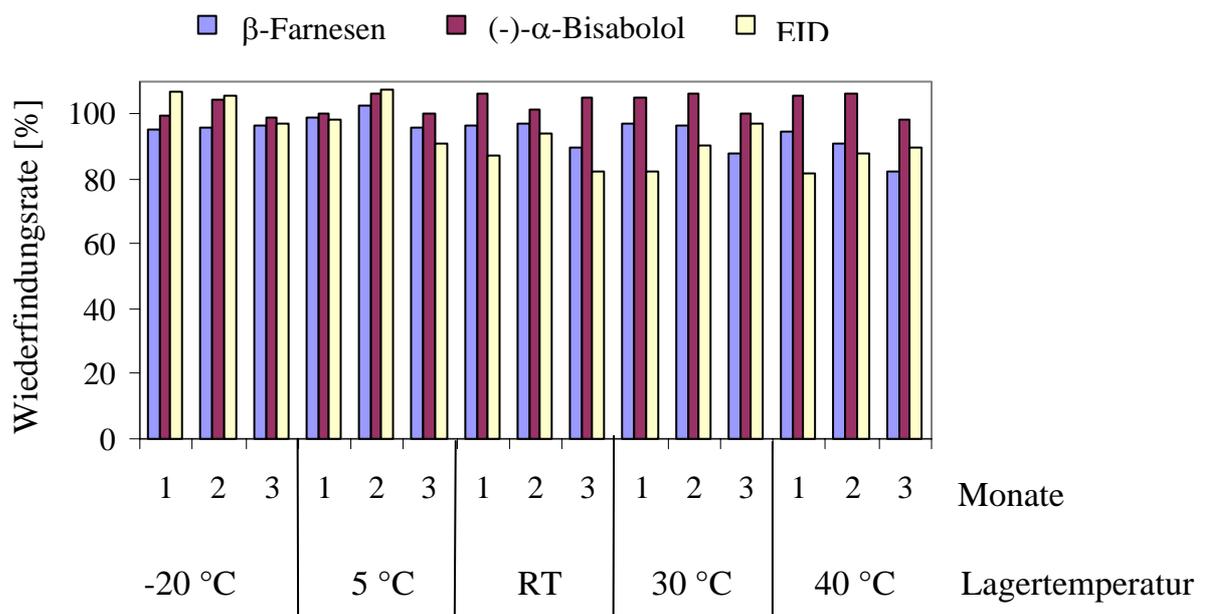


Abb. 6.5 Stabilitätsuntersuchungen  $\beta$ -CD/Kamillen- $\text{CO}_2$ -Extrakt-Komplex -haltigen Creme; Die Probenuntersuchung erfolgt nach dem **1. Monat (1), 2. Monat (2) und 3. Monat (3)**, bei einer **Lagertemperatur von:  $-20$  °C, 5 °C, Raumtemperatur, 30 °C, 40 °C**.

Betrachtet man zunächst (-)- $\alpha$ -Bisabolol, so stellt man fest, dass die Leitsubstanz stabil bleibt, der Gehalt beträgt 100 – 105 %.  $\beta$ -Farnesen, die flüchtigste Komponente im Extrakt zeigt keine signifikanten Verluste. Die Wiederfindungsrate liegt bei ca. 90 % und wird nur einmal bei 40 °C marginal unterschritten. Diese Werte stimmen mit den Ergebnissen der dreimonatigen Untersuchungen zur Stabilität des Komplexes (Kapitel 5) überein. Damit wird auch die Theorie der Stabilisierung der flüchtigen Inhaltsstoffe durch Komplexierung bestätigt. Die Wiederfindungsrate für die Summe aus freien und eingeschlossenen Inhaltsstoffe beträgt direkt nach der Herstellung des Komplexes nahezu 100 % und der freie Anteil liegt bei ca. 10 %. Dieser freie Anteil wird bei der Untersuchung des Komplexes im Kapitel 5 (Abb. 5.10 b) bestimmt. Daraus folgt, dass das eingeschlossene  $\beta$ -Farnesen (90 %) trotz der harten Lagerbedingungen stabil bleibt. Die Spiroether bleiben bei den Temperaturen –20 °C und 5 °C unverändert, die Wiederfindungsrate beträgt nahezu 100 %, was bedeutet, dass sowohl der freie wie auch der eingeschlossene Anteil nicht abgebaut werden. Mit steigender Temperatur sinkt der Gehalt auf ca. 80 – 90 %. Berücksichtigt man, dass der nicht komplexierte Teil bei den Spiroethern ca. 30 % ausmacht und die Haltbarkeitsuntersuchungen des Komplexes gezeigt haben, dass die Einschussrate von 60 – 80 % (s. Abb. 5.12) während Lagerung erhalten bleibt, kann der Verlust an Spiroethern von max. 20 % in der Creme dem nichteingeschlossenen Anteil zugeschrieben werden.

### 6.5 Diskussion der Ergebnisse

Die Basis-Creme nach DAC wird als Grundlage für die Kamillencreme gewählt. Sie zeichnet sich durch eine geeignete Konsistenz aus, um mit dem 40%igen Pulveranteil eine homogene Suspensionscreme zu bilden und ist als eine hydrophile Grundlage für die Neurodermitis-Therapie geeignet. Die hier vorgestellte Analysenmethode ermöglicht die selektive Bestimmung der relevanten Kamilleninhaltsstoffe sowohl aus dem nativen Extrakt als auch der Salbenzubereitung. Ein Vergleich der Gaschromatogramme zeigt keine Unterschiede. Weiter ist festzustellen, dass die Bestandteile der Grundlage die Trennung der Kamilleninhaltsstoffe nicht beeinflussen.

Die Haltbarkeit wird positiv bewertet, da es weder Verluste noch Wechselwirkungen mit den Hilfsstoffen aus der Grundlage zu verzeichnen gibt. Die Wiederfindungsrate der Spiroether nimmt bei höheren Temperaturen um 10 – 20 % ab, diese Abnahme kann dem nicht eingeschlossenen Anteil zugeschrieben werden.

## Kapitel 7

### Experimenteller Teil

#### 7.1 Materialien

##### 7.1.1 Kamillenblüten

Die Kamillenblüten aus der Ernte Juni 1999 werden in getrocknetem, unzerkleinertem Zustand von der Firma Bauer geliefert. Dieses Material wird von der Firma Robugen zur Verfügung gestellt. Die in Papiertüten gelieferten Kamillenblüten werden zusätzlich in schwarze Polyethylenbeutel verpackt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

##### 7.1.2 $\beta$ -Cyclodextrin

Produkt: BETA W 7 PHARMA

Charge: 019822

Hersteller: Wacker-Chemie GmbH

##### 7.1.3 Standardsubstanzen

Tab. 7.1 Standardsubstanzen

Substanz	Artikelnummer / Ch.-B.	Hersteller / Lieferant
(-)- $\alpha$ -Bisabolol CHROM GC	ROTI- Art.-Nr.: 9055.1 Ch.-B.: 4730036	Roth GmbH & Co.
n-Hexadecan für die GC	Art.-Nr.: 9605.0005 Ch.-B.: 214K17678505 Ch.-B.: S2801005 005	Merck KGaA
(-)- $\alpha$ -Bisabolol	Ch.-B.: 119710	Robugen GmbH

## 7 Experimenteller Teil

Substanz	Artikelnummer / Ch.-B.	Hersteller / Lieferant
cis-En-In-Dicycloether	Ch.-B.: 049716	Robugen GmbH
trans-En-In-Dicycloether	Ch.-B.: 049716	Robugen GmbH
Bisabololoxid A	Ch.-B.: 079730	Robugen GmbH
Bisabololoxid B	Ch.-B.: 089922	Robugen GmbH

(-)- $\alpha$ -Bisabolol, trans- und cis-En-In-Dicycloether sowie Bisabololoxid A und B werden freundlicherweise von der Firma Robugen zur Verfügung gestellt.

### 7.1.4 Lösungsmittel und Chemikalien

Tab. 7.2 Liste der Lösungsmittel und Chemikalien

Substanz	Artikelnummer	Hersteller / Lieferant
<i>Gase für die GC</i>		
Stickstoff (Typ 5.0)		Messer Griesheim GmbH
Wasserstoff (Typ 5.0)		Messer Griesheim GmbH
Synthetische Luft		Messer Griesheim GmbH
CO <sub>2</sub> für die Extraktion (Typ 5.0)		Messer Griesheim GmbH
<i>Lösungsmittel</i>		
Dichlormethan LiChrosolv gradient grade	Art.-Nr.: 106044	Merck KGaA
n-Hexan LiChrosolv gradient grade	Art.-Nr.: 104391	Merck KGaA

## 7 Experimenteller Teil

Substanz	Artikelnummer	Hersteller / Lieferant
Ethanol 96%ig Reag. Ph Eur	Art.-Nr.: 159010	Merck KGaA
Aqua ad injectabilia		hergestellt am Lehrstuhl für Pharm. Technologie Tübingen durch Umkehrosiose und anschließende Destillation
<i>Chemikalien</i>		
Natriumchlorid Reag. Ph Eur	Art.-Nr.: 159302	Merck KGaA
Natriumsulfat Reag. Ph Eur	Art.-Nr.: 159337	Merck KGaA
<i>Pufferkapseln für die Kalibrierung des pH-Meters</i>		
PH-Set I pH = 4,01; 7,00; 9,00	Art.-Nr.: 112052	Merck KGaA
<i>Puffersubstanzen</i>		
Natriumdihydro- genphosphat-Dihydrat	Art.-Nr.: 106345	Merck KGaA
di- Natriumhydrogenphosphat- Dihydrat	Art.-Nr.: 106576	Merck KGaA

---

Alle übrigen Lösungsmittel und Chemikalien besitzen p.a.-Qualität.

**7.1.5 Sonstige Materialien**

Tab. 7.3 Liste der sonstigen (Verbrauchs-)Materialien

Material	Artikelnummer	Hersteller / Lieferant
Celluloseacetat-Membran- filter, 0,45 µm Porengröße, 25 mm Durchmesser	Art.-Nr.: 11102-25-N	Sartorius AG
Rundfilter (Sorte 595)	Art.-Nr.: 311610	Schleicher & Schuell GmbH
Probengläser N 11-1 Nutzvolumen 1ml	Art.-Nr.: 702 01	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Bördelkappen für Vials N 11 TB/oA-0,9	Art.-Nr.: 702 56	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Zentrifugengläser DURAN, Ø 44 mm mit Schraubver- schlusskappe GL 32	Art.-Nr.: SO-1000	Roland Vetter Laborbedarf e. K.
Zentrifugengläser, 15 ml mit Gewinde 15-415	Art.-Nr.: 73 785-15	Roland Vetter Laborbedarf e. K.
Schraubverschlüsse mit Gewinde 15-415, mit PTFE-Einlage	Art.-Nr.: 73 802-15 415	Roland Vetter Laborbedarf e. K.
Flaschen 50 ml, braun, mit Schraubverschluss DIN 28	Art.-Nr.: 32 230	Wepa
Schraubdeckelgefäße 100 ml		Heumann GmbH
Aluminium Salbentuben		Linhardt

### 7.1.6 Geräte zur allgemeinen Verwendung

Tab. 7.4 Liste der allgemein verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller / Lieferant
Laborwaage Mettler AT 261 DeltaRange	Mettler Toledo GmbH
Laborwaage Mettler AE 200	Mettler Toledo GmbH
Laborwaage Mettler PC 4400 DeltaRange	Mettler Toledo GmbH
Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments GmbH
Heizpilz	Heraeus Instruments GmbH
Vakuumrotationsverdampfer Rotavapor-R	Büchi Laboratorium-Technik GmbH
Prozessor-Tensiometer K 12	Krüß Laborgeräte GmbH
Drei-Walzen-Stuhl	Otto Hermann GmbH
Reibschale mit Pistill Ø 26 cm, Ø 9 cm	Rosenthal
Trockenschränke	
Typ GTR0214	Memmert GmbH & Co. KG
Typ B 40	Memmert GmbH & Co. KG

### 7.1.7 Datenverarbeitung

Rechner (Fa. Schmelz), Pentium 75 MHz, 128 MB RAM, 6 GB Festplatte.

Tab. 7.5 Liste der allgemein verwendeten Software

Software	Hersteller / Lieferant
Biblio 32 Bit, Version 32.1	VCH
Excel 2000 für Windows	Microsoft GmbH
Word 2000 für Windows	Microsoft GmbH
Power Point 2000 für Windows	Microsoft GmbH
STL, Statistikprogramm	Arbeitskreis Ebel, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg
Isis-Draw 2.3	Microsoft GmbH
K 121, Version 2.04 a	Krüss Laborgeräte GmbH

## 7.2 Analytik

### 7.2.1 Gaschromatographie (GC)

#### 7.2.1.1 Beschreibung der Methode

<i>Geräte</i>	Gaschromatograph HP 5890 Serie II Autoinjektor HP 7673A mit Probeteller Integrator HP 3392A, Hewlett-Packard (seit 2000 Agilent Technologies)
<i>Injektor</i>	Typ Split/Splitless Kapillar-Einlass

## 7 Experimenteller Teil

---

	Temperatur	250 °C
	Split	1:10
<i>Detektor</i>	Typ	Flammenionisationsdetektor (FID)
	Temperatur	250 °C
	Wasserstoff	Fluss 2 ml/min
	Synthetische Luft	400 ml/min
	Auxiliary Gas	30 ml/min Stickstoff (Typ 5.0)
<i>Säule</i>	30 m * 0,25 mm I.D. Optima delta-3, Macherey-Nagel	
	Filmdicke	0,25 µm
	Max. Temperatur	340 - 360 °C
<i>Trägergas</i>	Typ	Wasserstoff 5.0
	Total flow	20 ml/min
	Detektorausgang	2 ml/min
<i>Einspritzvolumen</i>	1 - 5 µl mittels Autoinjektor	
<i>Temperaturprogramm</i>		
	<i>Ätherisches Öl:</i>	
	120 °C - 170 °C	7 °C/min
	170 °C - 194 °C	3 °C/min
	194 °C - 220 °C	5 °C/min
	220 °C	10 min
	<i>CO<sub>2</sub>-Extrakt:</i>	
	120 °C - 170 °C	7 °C/min
	170 °C - 194 °C	3 °C/min
	194 °C - 300 °C	5 °C/min
	300 °C	10 min

Die Auswertung erfolgt über das Peakflächenverhältnis der einzelnen Inhaltsstoffe zu n-Hexadecan als internem Standard. Zur Responsefaktorbestimmung werden Lösungen von (-)- $\alpha$ -Bisabolol, Bisabololoxid A oder B, bzw. cis- oder trans-En-In-Dicycloether eingesetzt, die jeweils zusätzlich n-Hexadecan enthalten. Die Lösungen werden zweimal unabhängig voneinander hergestellt, viermal injiziert und Mittelwert und relative Standardabweichung berechnet.  $\beta$ -Farnesen wird als (-)- $\alpha$ -Bisabolol berechnet.

*Korrekturfaktoren:*

(-)- $\alpha$ -Bisabolol	1,22
$\beta$ -Farnesen	1,22
Bisabololoxid A	1,50
Bisabololoxid B	1,58
cis-En-In-Dicycloether	2,00
trans-En-In-Dicycloether	1,90

### 7.2.1.2 Probenaufbereitung und Standardlösungen

*Herstellung der internen Standardlösung*

290 mg n-Hexadecan werden in einem 500,0 ml Messkolben in n-Hexan gelöst. Daraus resultiert eine Lösung mit einem Gehalt von 0,55 – 0,58 mg/ml.

*Herstellung der Standardlösungen zur Faktorbestimmung*

26,5 mg n-Hexadecan und 16,6 mg (-)- $\alpha$ -Bisabolol werden in einem 25,0 ml Messkolben gelöst.

7,96 mg Bisabololoxid B und 1,0 ml (0,58 mg) der n-Hexadecan Lösung,

4,92 mg Bisabololoxid A und 1,0 ml (0,58 mg) der n-Hexadecan Lösung,

5,1 mg cis-En-In-Dicycloether und 1,0 ml (0,58 mg) der n-Hexadecan Lösung oder

7,2 mg trans-En-In-Dicycloether und 1,0 ml (0,58 mg) der n-Hexadecan Lösung

werden jeweils in einem 100,0 ml Messkolben in n-Hexan gelöst.

### *Herstellung des Phosphat-Puffers pH 7,7*

1,04 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat und 10,68 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat werden genau gewogen, in einem Liter Wasser für Injektionszwecke gelöst und der pH-Wert kontrolliert.

### *Probenvorbereitung des Kamillenöls*

Ca. 100 mg des mittels Wasserdampfdestillation gewonnenen ätherischen Öles (s. 7.3.1), genau gewogen, und 4,0 ml des internen Standards werden in 100,0 ml n-Hexan gelöst.

### *Probenvorbereitung des Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakts*

Ca. 300 mg des Extraktes (s. 7.3.2), genau gewogen, und 4,0 ml des internen Standards werden in einem 100,0 ml Messkolben in Dichlormethan gelöst. Die Lösung wird durch einen Papier-Rundfilter zweimal filtriert und direkt als Probenlösung eingesetzt.

### *Probenvorbereitung der Kamillencreme*

1,5 g der Kamillencreme wird mit 20 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt und fünf Minuten lang bei 45 °C im Ultraschallbad bis zum Schmelzen behandelt. Die Emulsion wird im Gefrierfach ca. 4 Minuten lang abgekühlt und die DMSO-Phase abpipetiert. Zum Salbenrückstand werden nochmals 10 ml DMSO gegeben und erneut wie beschrieben behandelt. Zu den vereinten DMSO-Phasen werden 70 ml Dichlormethan gegeben, wobei ein Niederschlag ausfällt. Diese Suspension wird 12 h stehen gelassen, anschließend durch einen Papier-Rundfilter filtriert. Nach Zugabe von 4,0 ml interner Standard-Lösung wird in einem Messkolben auf 100,0 ml mit Dichlormethan ergänzt.

### **7.2.1.3 Kalibrierung und Validierung**

#### *Kalibrierung für (-)- $\alpha$ -Bisabolol*

67,2 mg (-)- $\alpha$ -Bisabolol werden in einem 150,0 ml Messkolben in n-Hexan gelöst (Stammlösung). Die Verdünnungen werden hergestellt, indem je 2,0 ml interner Standard (0,58 mg n-Hexadecan/ml n-Hexan) und 1, 5, 10, 15, 20, 25 und 30 ml der

Stammlösung in einem Messkolben mit n-Hexan auf 50,0 ml aufgefüllt werden. Die Proben werden in willkürlicher Reihenfolge je viermal analysiert.

### *Kalibrierung für n-Hexadecan*

20,62 mg n-Hexadecan werden in einem 100,0 ml Messkolben in n-Hexan gelöst (Stammlösung). 2, 5, 10, 15, 20 und 30 ml dieser Stammlösung werden in einem Messkolben mit n-Hexan auf 100,0 ml aufgefüllt. Je Verdünnung werden sechs Einzelbestimmungen durchgeführt.

### *Systempräzision für (-)- $\alpha$ -Bisabolol, $\beta$ -Farnesen, cis-En-In-Dicycloether (EID), trans-EID*

Durch Wasserdampfdestillation gewonnenes Kamillenöl wird fünfmal analysiert, und der Mittelwert und die relative Standardabweichung berechnet. Des weiteren wird aus den Ergebnissen der Kalibrierung für (-)- $\alpha$ -Bisabolol bei jeder Verdünnung der Mittelwert bestimmt und die relative Standardabweichung berechnet.

### *Methodenpräzision für (-)- $\alpha$ -Bisabolol, $\beta$ -Farnesen, cis-En-In-Dicycloether (EID), trans-EID,*

Ein  $\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -CD)/(-)- $\alpha$ -Bisabolol Komplex wird dreimal unabhängig voneinander hergestellt (s. 7.2.2.2) und je viermal analysiert. Aus den Messwerten wird der Mittelwert bestimmt und die relative Standardabweichung berechnet.

Ein  $\beta$ -CD/Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt Komplex wird sechsmal unabhängig voneinander hergestellt (s. 7.2.2.2) und je viermal analysiert. Aus den Messwerten wird der Mittelwert bestimmt und die relative Standardabweichung berechnet.

Aus einer Kamillencremecharge wird fünfmal unabhängig voneinander eine Probe aufgearbeitet (s. 7.2.1.2) und jede Probe viermal analysiert. Aus den Messwerten wird der Mittelwert bestimmt und die relative Standardabweichung berechnet.

### *Bestimmungsgrenze*

Es wird das Rauschen des Messverfahrens durch Aufnahme der Basislinie bei der Dämpfung „-2“ (größte Empfindlichkeit des Ausgangssignals) bestimmt. Die mittlere

Höhe des Signals wird mit 10 multipliziert und über die Kalibriergerade in einen Konzentrationswert umgerechnet (Renger et al. 1994).

### *Erfassungsgrenze*

Es wird das Rauschen des Messverfahrens durch Aufnahme der Basislinie bei der Dämpfung „-2“ (größte Empfindlichkeit des Ausgangssignals) bestimmt. Die mittlere Höhe des Signals wird mit 3 multipliziert und über die Kalibriergerade in einen Konzentrationswert umgerechnet. (Renger et al. 1994).

### **7.2.1.4 (-)- $\alpha$ -Bisabolol-Standardsubstanz**

#### **7.2.1.4.1 Gehaltsbestimmung**

4,0 ml der n-Hexadecan-Lösung als interner Standard und (-)- $\alpha$ -Bisabolol der Firma Robugen (zehn Einwaagen im Bereich 4,1 mg - 16,32 mg) werden jeweils in 100,0 ml n-Hexan gelöst. Die Proben werden in willkürlicher Reihenfolge je sechsmal analysiert und der Gehalt gegenüber dem Standard der Firma Roth berechnet.

#### **7.2.1.4.2 Wiederfindungsrate aus einer wässrigen Lösung in Gegenwart von DMSO**

In ein Zentrifugenglas mit 10,0 ml Wasser für Injektionszwecke werden ca. 20 mg (-)- $\alpha$ -Bisabolol, genau gewogen, suspendiert. Anschließend werden 1,5 ml DMSO und 3,0 ml n-Hexan hinzugefügt. Diese Mischung wird 5 min lang geschüttelt; es resultieren zwei Phasen. Zur besseren Phasentrennung wird 0,1 g Natriumchlorid zugefügt. Nach dem Zentrifugieren (5 min, 2500 UpM) werden die zwei Phasen (Wasser/DMSO-Gemisch und n-Hexan) getrennt. Das Wasser/DMSO-Gemisch wird nach Zugabe von 0,1 g Natriumchlorid zweimal mit 3,0 ml n-Hexan ausgeschüttelt, die n-Hexan-Phase über Natriumsulfat getrocknet und durch einen Papier-Rundfilter in einen 10,0 ml Messkolben filtriert. Der Filterkuchen wird mit 3,0 ml n-Hexan nachgewaschen. Zum gesamten Filtrat werden 1,0 ml interner Standard hinzugefügt (Phase 1).

In einem zweiten Zentrifugenglas wird die nach der Zentrifugation abgetrennte n-Hexan-Phase über Natriumsulfat getrocknet und durch einen Papier-Rundfilter in einen 10,0 ml Messkolben filtriert. Der Filterkuchen wird mit 3,0 ml n-Hexan nachgewaschen. Zu dem gesamten Filtrat werden 1,0 ml interner Standard hinzugefügt (Phase 2). Die Phasen 1 und 2 werden gaschromatographisch auf ihren (-)- $\alpha$ -Bisabolol-Gehalt analysiert. Die Proben werden fünfmal unabhängig voneinander hergestellt und je Probe sechsmal analysiert. Falls notwendig, gemäß der Kalibrierung verdünnt.

### 7.2.1.4.3 Wiederfindungsrate aus einer wässrigen $\beta$ -Cyclodextrin-Lösung ( $\beta$ -CD)

Die Wiederfindungsrate aus einer wässrigen  $\beta$ -CD-Lösung wird genau wie unter Punkt 7.2.1.3.3 beschrieben durchgeführt, wobei 10,0 ml Wasser durch 5,0 ml wässrige  $1 \cdot 10^{-2}$  M  $\beta$ -CD-Lösung ersetzt werden.

## 7.2.2 Bestimmung der freien und eingeschlossenen Inhaltsstoffe

### 7.2.2.1 Löslichkeitsmethode

Die bei der Herstellung der Komplexe ausgefallene Einschlussverbindung (s. 7.4.2) wird zentrifugiert und die überstehende wässrige Lösung in ein zweites Zentrifugenglas dekantiert. Die Lösung wird nach Zugabe von 0,1 g Natriumchlorid dreimal mit 5,0 ml n-Hexan ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und durch einen Papier-Rundfilter in einen 25,0 ml Messkolben filtriert. Der Filtrerrückstand wird mit 5,0 ml n-Hexan nachgewaschen. Zu dem gesamten Filtrat werden 1,0 ml interner Standard hinzugefügt und auf 25,0 ml mit n-Hexan aufgefüllt (**Überstand**). Der Niederschlag (Komplex = Einschlussverbindung) wird mit 5 ml -Portionen n-Hexan (**Waschhexan**) solange gewaschen, bis das Lösungsmittel farblos ist. Diese optische Prüfung ist zulässig, da sie mit der gaschromatographischen Untersuchung übereinstimmt, wonach in dem im letzten Waschschrift verwendeten n-Hexan keine Inhaltsstoffe mehr detektierbar sind. Die erhaltenen Waschhexan-Phasen werden entweder einzeln nach Zugabe von 1,0 ml internem Standard und Auffüllen auf 10,0 ml analysiert oder sie werden

vereinigt, am Rotationsverdampfer auf ca. 20 ml eingeengt und in einem Messkolben nach Zugabe von 1,0 ml internem Standard mit n-Hexan auf 25,0 ml aufgefüllt.

Der **Komplex** wird in 1,5 ml DMSO gelöst und dreimal mit 5,0 ml n-Hexan ausgeschüttelt. Die vereinigten n-Hexan-Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und nachfolgend in einen 25,0 ml Messkolben filtriert. Nach Zugabe von 1,0 ml internem Standard wird die Lösung mit n-Hexan aufgefüllt.

### 7.2.2.2 Knetmethode

1,5 g Probe (Herstellung s. 7.4.3), genau gewogen, werden aus einer Charge entnommen und mit 5 ml n-Hexan gewaschen (**Waschhexan**). Das Waschhexan wird nach Zugabe von 1,0 ml internem Standard auf 10,0 ml aufgefüllt und analysiert.

Der gewaschene Komplex wird in 10 ml DMSO gelöst und mit 30 ml Dichlormethan versetzt. Es fällt ein Niederschlag aus. Die Suspension wird 12 h equilibriert und dann durch ein Papier-Rundfilter filtriert. Der Filtrückstand wird mit 5 ml Dichlormethan nachgewaschen. Nach Zugabe von 2,0 ml internem Standard wird die Lösung auf 50,0 ml mit Dichlormethan aufgefüllt.

### 7.2.3 Bestimmung des Wassergehaltes nach Karl-Fischer

#### *Geräte und Reagenzien*

Die Wassergehaltsbestimmungen werden mit einem Titrierstand Modell 703 (Deutsche Metrohm GmbH & Co.) und einer Zentraleinheit SM-Titrino 702 (Metrohm) durchgeführt. Die Aufnahme und Auswertung der Daten erfolgt mit einem HP Vectra VL Rechner, der über das QBASIC-Programm STP (Metrohm) gesteuert wird.

Titrationbedingungen:

Solvens	Methanol gradient grade / Formamid 2:1 (V/V)	
Titrans	Hydranal Composite 2	
Standard	Hydranal-Standard Natriumtartrat-2-hydrat (Riedel-de Haen)	
Einstellungen	Titrationseendpunkt	210 mV
	Beginn des Regelbereiches	250 mV

Maximaldosierate	3,0 ml/min
Stopdrift	12 $\mu$ l/min
Arbeitstemperatur	23 °C
I (pol)	40 $\mu$ A

Titerbestimmung und Titrationsen:

Vor Titrationsbeginn werden ca. 60 mg, genau gewogen, Natriumtartrat-2-hydrat (enthält 15,66 % Kristallwasser) eingewogen und der Titer des Hydranal-Composite 2 durch Dreifachbestimmung ermittelt. Die Extrakteinwaage (ca. 200 mg genau gewogen) wird so gewählt, dass eine ausreichende Menge Titrans verbraucht wird. Vor Titrationsbeginn wird der Extrakt 60 s mit einem Ultra-Turrax bei ca. 13500 U/min dispergiert. Mittelwert und Standardabweichung werden aus jeweils vier Einzelbestimmungen ermittelt.

### 7.2.4 Messung der Oberflächenspannung

Die Bestimmung der Oberflächenspannung wird mit einem Prozessor-Tensiometer K12 (Krüss Laborgeräte GmbH) nach der Wilhelmy-Platten-Methode durchgeführt. Das System wird zunächst auf 20,0 °C temperiert. Das Probengefäß und die Platte werden mit destilliertem Wasser und Aceton gereinigt und in der Flamme des Bunsenbrenners abgeflammt. Die Wilhelmy-Platte wird im Tensiometer befestigt, der Hubtisch soweit angehoben, bis sich die Platte knapp über der Wasseroberfläche befindet, und die Arretierung gelöst. Die Messung wird über den angeschlossenen HP Vectra-Rechner (M2 4/66, Software K121, Version 2.04a) gestartet, der Hubtisch angehoben bis die Flüssigkeit die Platte berührt. Wenn die Waage eine Gewichtszunahme von 0,0005 g registriert, beginnt der Rechner mit der Datenerfassung Aufzeichnung. Während eines Messintervalls von 3600 s wird alle 10 s die Kraft aufgezeichnet und in einem Diagramm die Oberflächenspannung über der Zeit aufgetragen.

Die folgenden Lösungen werden vermessen:

- destilliertes Wasser,
- Wasser/Ethanol 25/75 (V/V)
- eine mit Bisabolol gesättigte Wasser/Ethanol 25/75 (V/V)-Lösung

- eine mit Kamillenöl gesättigte Wasser/Ethanol 25/75 (V/V)-Lösung.

Mittelwert und Standardabweichung werden aus jeweils drei Einzelbestimmungen ermittelt.

### **7.3 Aufarbeitung der Kamillenblüten<sup>1</sup>**

#### **7.3.1 Wasserdampfdestillation**

350 g Kamillendroge, genau gewogen, werden mit 3 l demineralisiertem Wasser in einen 6-l-Rundkolben gefüllt. Das Wasser im Dampfkessel wird erhitzt, und um die Destillation am Anfang zu beschleunigen, wird der Inhalt des Rundkolbens mit Hilfe eines Heizpilzes zusätzlich erwärmt. Sobald das Wasser im Rundkolben anfängt zu sieden, wird der Heizpilz abgestellt. Die Destillation verläuft über vier Stunden. Ein Gemisch aus Wasser und ätherischem Öl wird in einem mit Eis-Wasser gekühlten Rundkolben aufgefangen. Nach Abkühlen der Destille werden Intensivkühler und Vakuum-Vorstoß mit Dichlormethan nachgespült. Das ätherische Öl wird dreimal mit 50 ml Dichlormethan ausgeschüttelt, die vereinigten Dichlormethan-Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer in einem tarierten Rundkolben eingeeengt. Das ätherische Öl wird bei -20 °C gelagert. Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie unter 7.2.1.2 beschrieben.

#### **7.3.2 CO<sub>2</sub>-Extraktion**

500 g unzerkleinerte Kamillenblüten werden in eine 3,5-l-Extraktionshülse der Hochdruckextraktionsanlage der Firma SITEC-Sieber Engineering AG (Schweiz) gegeben und mit überkritischem CO<sub>2</sub> bei 90 bar, 40 °C und einem Massenfluss von 8 kg/h über drei Stunden extrahiert. Die Abscheidung in die flüssige CO<sub>2</sub>-Phase erfolgt bei 40 bar und 8 °C. Nach Beendigung der Extraktion wird der Abscheider schnell entspannt und der Extrakt im gefrorenen Zustand entnommen. Nach Sublimation des restlichen festen CO<sub>2</sub> wird der Extrakt im Exsiccator über Blaugel und Phosphorpentoxid zwei Wo-

---

<sup>1</sup> Für die Extraktionsversuche werden Kamillenblüten der Ernte vom Juni 1999 verwendet.

chen getrocknet. Der Extrakt wird in einem Exsiccator bei 5 °C gelagert. Die weitere Aufarbeitung ist unter 7.2.1.2 beschrieben.

### **7.4 Herstellung der Cyclodextrin-Einschlussverbindungen**

#### **7.4.1 Phasen-Löslichkeits-Diagramm**

Das Phasen-Löslichkeits-Diagramm wird nach der Methode von Higuchi und Connors (1965) ermittelt.  $\beta$ -Cyclodextrin wird in einem Wasser/Ethanol-Gemisch 75/25 (V/V) gelöst, sodass zehn Konzentrationen im Bereich von  $0,1 \cdot 10^{-2}$  bis  $1,2 \cdot 10^{-2}$  M resultieren. Ein Überschuss an Substanz (1000 mg (-)- $\alpha$ -Bisabolol oder 500 mg ätherisches Kamillenöl) werden jeweils in 15 ml Zentrifugengläsern zu 10,0 ml der  $\beta$ -Cyclodextrin-Lösung gegeben. Die Proben werden bei 32 °C in einem Temperierschrank über 48 Stunden geschüttelt. Der ungelöste Teil an (-)- $\alpha$ -Bisabolol oder Kamillenöl wird abpipetiert und anschließend werden die Lösungen durch einen Celluloseacetat Membranfilter (Porengröße 0,8  $\mu\text{m}$ , Fa. Sartorius) filtriert. Das Filtrat wird zweimal nach Zugabe von 0,1 g Natriumchlorid mit 4,0 ml n-Hexan ausgeschüttelt. Zu den vereinten n-Hexan-Phasen wird 1,0 ml interner Standard gegeben und auf 10,0 ml mit n-Hexan aufgefüllt.

#### **7.4.2 Löslichkeitsmethode**

44 mg ( $2 \cdot 10^{-2}$  M) oder 22 mg ( $1 \cdot 10^{-2}$  M) bzw. 16 mg ( $7,5 \cdot 10^{-3}$  M) (-)- $\alpha$ -Bisabolol werden zu 10,0 ml  $\beta$ -CD-Lösungen in den Konzentrationen  $1 \cdot 10^{-2}$  M oder  $1,5 \cdot 10^{-2}$  M dazu gewogen, sodass drei Lösungen mit  $\beta$ -CD und (-)- $\alpha$ -Bisabolol im molaren Verhältnis 1:2, 1:1 und 2:1 resultieren. Entsprechend werden in Zentrifugengläsern (95 ml) Kamillenöl und  $\beta$ -CD so zusammengefügt, dass in 40,0 ml ein 1:1- oder 2:1-molares Verhältnis zwischen  $\beta$ -CD und (-)- $\alpha$ -Bisabolol (im Kamillenöl) vorliegt. Die Suspensionen werden 24, 48 Stunden beziehungsweise sieben Tage bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach der Equilibrierung werden die Proben zentrifugiert, der Überstand dekantiert, im Zentrifugenglas verbleibt der Komplex. Die Aufarbeitung erfolgt nach 7.2.2.1.

### 7.4.3 Knetmethode

2, 5, 7 bzw. 10 g  $\beta$ -CD-Pulver und 1 g Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt, genau gewogen, werden mit 2, 5, 7, bzw. 10 ml Ethanol befeuchtet und in einer Reibschale mit dem Pistill 45 min geknetet. Wenn größere Mengen hergestellt werden, werden zuerst in der Reibschale alle Komponenten angerieben und anschließend der Drei-Walzen-Stuhl verwendet. Die daraus resultierende Paste wird bis zum Verdunsten des Ethanols bei Raumtemperatur bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Aufarbeitung der Probe erfolgt gemäß 7.2.2.2.

## 7.5 Herstellung der Kamillencreme

### 7.5.1 Rezepturentwicklung

Für die Herstellung einer gut streichfähigen Creme mit 5 % Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt als Einschlussverbindung wird eine Rezeptur-Auswahl durchgeführt.

Tab. 7.6 Rezepturvorschläge zur Herstellung einer Kamillencreme

1. Rezeptur		2. Basiscreme DAC		3. Nichtionische hydrophile Creme	
$\beta$ -Cyclodextrin	40 T	$\beta$ -Cyclodextrin	40 T	$\beta$ -Cyclodextrin	40T
Wasser ger.	19,2 T	Wasser ger.	24 T	Wasser ger.	30 T
Cremophor A25	1,6 T	GMS	2,4 T	Tween 60	3 T
Cremophor A6	0,8 T	Cetylalkohol	3,6 T	Lanette O	6 T
GMS	8 T	Miglyol	4,5 T	Glycerol	6 T
Weißes Vaseline	16 T	Weißes Vaseline	15,3 T	Weißes Vaseline	15 T
Dickflüssiges Paraffin	8 T	Polyoxyethylenglycerolmostearat	4,2 T		
Wollwachs	4 T	Propylenglycol	6 T		
Isopropylmyristat	2,4 T				

Die 1. Rezeptur wird wie folgt abgewandelt:

<b>1a. Rezeptur</b>		<b>1b. Rezeptur</b>	
β-Cyclodextrin	40 T	β-Cyclodextrin	40 T
Wasser ger.	25,8 T	Wasser ger.	19,2 T
Cremophor A25	1,6 T	Cremophor A25	1,6 T
Cremophor A6	0,8 T	Cremophor A6	0,8 T
GMS	3,8 T	GMS	8 T
Vaseline	16 T	Paraffin dickflüssig	24 T
Paraffin dickflüssig	8 T	Wollwachs	4 T
Wollwachs	1,6 T	Isopropylmyristat	2,4 T
Isopropylmyristat	2,4 T		

Die optimierte Rezeptur basiert auf der Basiscreme nach DAC, wobei statt des gereinigten Wassers ein Phosphatpuffer pH 7,7 gewählt wird.

Tab. 7.7 Optimierte Rezeptur Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt/β-CD-Komplex-haltige Basiscreme

<b>Optimierte Rezeptur</b>	
Kamillen-CO <sub>2</sub> -Extrakt/ β-CD-Komplex	40 T
Phosphatpuffer pH 7,7	24 T
GMS	2,4 T
Cetylalkohol	3,6 T
Miglyol	4,5 T
Weißes Vaseline	15,3 T
Polyoxyethylenglycerol monostearat	4,2 T
Propylenglycol	6 T

### *Herstellung der Creme*

Alle lipophilen Bestandteile werden auf dem Wasserbad bei 60 °C geschmolzen, Phosphatpuffer pH 7,7 wird in die Grundlage eingearbeitet und anschließend kaltgerührt. Der  $\beta$ -Cyclodextrin/Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt-Komplex wird zuerst mit wenig Grundlage angerieben und nach Zugabe der gesamten Menge dreimal mit einem Drei-Walzen-Stuhl homogenisiert.

## **7.6 Stabilitätsuntersuchungen**

### **7.6.1 Einlagerung der Proben**

Die durch dicht verschlossene Braungläser geschützte Einschlussverbindung und die in 20 ml Aluminium-Tuben abgefüllte Creme werden für drei Monate bei -20 °C, 5 °C, Raumtemperatur, 30 °C und 40 °C eingelagert.

### **7.6.2 Probennahme, Probenaufarbeitung und Analytik**

Jeden Monat werden Proben gezogen, für die Einschlussverbindung gemäß 7.2.2.2 und für die Creme nach 7.2.1.2 aufgearbeitet und anschließend gaschromatographisch (s. 7.2.1.1) analysiert.

### **Kapitel 8** **Zusammenfassung**

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer Kamillen-Creme, die 5 % eines hochkonzentrierten Kamillenextraktes, der durch Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid hergestellt wird, enthält. Diese Creme ist eine Alternative zur Cortisontherapie bei Neurodermitis. Der intensive Geruch des Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extraktes macht den Einschluss in  $\beta$ -Cyclodextrin notwendig. Dadurch soll auch eine Stabilisierung der wertbestimmenden Kamilleninhaltsstoffe erreicht werden.

Die Entwicklung dieses Präparates schließt folgende Teilschritte ein:

- Ermittlung der Stabilitätskonstanten von reinem (-)- $\alpha$ -Bisabolol und in Gegenwart von anderen Inhaltsstoffen aus dem ätherischen Öl der Kamille mit  $\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -CD),
- Bestimmung der Einschlussrate von reinem (-)- $\alpha$ -Bisabolol und anderer relevanter Inhaltsstoffe aus dem ätherischen Kamillenöl,
- Optimierung der Herstellungsmethode des Komplexes,
- Bestimmung der Einschlussrate von relevanten Inhaltsstoffen aus dem Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt,
- Untersuchung der Stabilität des  $\beta$ -CD-Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt-Komplexes,
- Auswahl der Salbengrundlage,
- Herstellung und Analytik der Creme,
- Untersuchung der Stabilität der Kamillencreme.

Bei stark flüchtigen Verbindungen wie den ätherischen Ölen sind die Löslichkeits(≙ Kopräzipitation)- und die Knetmethode zur Herstellung des Komplexes am besten geeignet. Weitere Methoden wie die Lyophilisation und die Sprühtrocknung eignen sich nur bedingt, da bei der Herstellung mit erheblichen Verlusten gerechnet werden muss.

Eine Voraussetzung für das Kopräzipitationsverfahren ist, dass das Phasen-Löslichkeits-Diagramm nach Higuchi und Connors (1965) dem  $B_s$ -Typ folgt, d. h. ein fester Komplex ausfällt. Die Untersuchungen an (-)- $\alpha$ -Bisabolol-Reinsubstanz und dem ätherischen Kamillenöl ergeben, dass ein  $B_s$ -Typ für alle relevanten Inhaltsstoffe ((-)- $\alpha$ -Bisabolol,  $\beta$ -Farnesen, cis- und trans-EID) vorliegt. Bei diesen Untersuchungen steht der Vergleich des Verhaltens von (-)- $\alpha$ -Bisabolol-Reinsubstanz bzw. (-)- $\alpha$ -Bisabolol im ätherischen Öl in Gegenwart von  $\beta$ -CD im Vordergrund. Die in beiden Fällen sehr geringe Löslichkeit des (-)- $\alpha$ -Bisabolols in einem Ethanol/Wasser(25/75 V/V)-Gemisch wird durch Bildung löslicher Komplexe mit  $\beta$ -CD verbessert. Die höhere Grundlöslichkeit von (-)- $\alpha$ -Bisabolol-Reinsubstanz kann durch die gleichzeitig höhere Oberflächenaktivität der Substanz in einem Ethanol/Wasser Gemisch erklärt werden.

Die Stabilitätskonstanten der  $\beta$ -CD / (-)- $\alpha$ -Bisabolol-Komplexe, hergestellt mit reinem (-)- $\alpha$ -Bisabolol bzw. mit Kamillenöl weisen mit  $273 \text{ M}^{-1}$  und  $304 \text{ M}^{-1}$  keine deutlichen Unterschiede auf. Folglich beeinflusst die unterschiedliche Grundlöslichkeit der Substanzen die Komplexbildung nicht. Des weiteren lässt sich die Stabilitätskonstante für trans-EID ( $84 \text{ M}^{-1}$ ) bestimmen, für cis-EID wird die Konstante wegen einer zu großen Streuung der Werte nicht berechnet,  $\beta$ -Farnesen ist im Ethanol/Wasser-Gemisch unlöslich und bildet keine löslichen Komplexe mit  $\beta$ -CD.

Zunächst wird die Löslichkeitsmethode zur Herstellung der Komplexe gewählt. Die optimale Zusammensetzung des Komplexes wird am Beispiel von (-)- $\alpha$ -Bisabolol-Reinsubstanz und als Komponente des ätherischen Öls ermittelt. Die Bestimmung der Einschussrate erfolgt durch die Untersuchung des freien und eingeschlossenen Anteils. Der freie Anteil besteht aus überschüssiger Substanz in der Lösung und aus dem an der Oberfläche des Komplexes adhären Teil, der mit n-Hexan abgewaschen wird. Bei einem Verhältnis von 2 Mol  $\beta$ -CD und 1 Mol (-)- $\alpha$ -Bisabolol erhält man einen Komplex, in dem (-)- $\alpha$ -Bisabolol zu nahezu 100 % eingeschlossen ist. Dies gilt für die reine Substanz, die Einschussrate aus dem ätherischen Öl liegt bei ca. 90 %.  $\beta$ -Farnesen und Bisabololoxid B bilden ebenfalls stabile Komplexe mit Einschussraten über 80 - 90 %. Cis- und trans-EID zeigen die niedrigste Einschussrate von ca. 30 - 40

%). Der unvollständige Einschluss ist auf die starre Struktur der Spiroether zurückzuführen.

Parallel zur Bestimmung der molaren Zusammensetzung der Komplexe wird die Equilibrierdauer ermittelt. Die Probenuntersuchung erfolgt nach 24 und 48 Stunden sowie nach 7, 14 und 21 Tagen. Eine Zeitspanne von 48 h erweist sich als ausreichend, um stabile Komplexe zu bilden.

Die Herstellung von Komplexen nach der Lösungsmethode erweist sich als schlecht reproduzierbar. Bedingt durch die Feuchtigkeit des Komplexes, kommt es zu einer Gleichgewichtsverschiebung zwischen eingeschlossenem und freiem Anteil, was zu einem verstärkten Auswaschen der Gastmoleküle mit n-Hexan führen kann. Aus diesem Grund wird dieser Weg nicht weiter verfolgt.

Durch das Knetverfahren erreicht man ebenso stabile Komplexe aus Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt und  $\beta$ -CD, deren Einschlussrate für (-)- $\alpha$ -Bisabolol,  $\beta$ -Farnesen und Bisaboloxid B ca. 90 % und für Spiroether 70 % beträgt. Das Produkt ist ein freifließendes, leicht nach Kamille riechendes Pulver. Ein kritischer Verfahrensschritt bei der Herstellung ist die Wahl einer ausreichenden Menge Suspensionsmittel, das optimale Verhältnis beträgt 1 Teil Ethanol zu 1 Teil Komplex. Weiter ist ein genügend hoher Energieeintrag notwendig, erst die Anwendung des Dreiwalzenstuhls anstelle des Knetens in einer Reibschale führt zur Bildung eines stabilen Komplexes. Das optimale molare Verhältnis von  $\beta$ -CD zu (-)- $\alpha$ -Bisabolol beträgt 10:1, was einem Mengenverhältnis von 7 Teilen  $\beta$ -CD zu einem Teil Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extrakt entspricht.

Der Vergleich zwischen Löslichkeits- und Knetverfahren fällt zu Gunsten des Knetverfahrens aus. Unter wirtschaftlichen Aspekten eignet es sich besser zur Herstellung der Komplexe im Produktionsmaßstab. Der Verzicht auf Wasser sowie der Wegfall des bei flüchtigen Komponenten problematischen Trocknungsvorganges bei höherer Temperatur sind weitere Vorteile der Knetmethode.

Die Ergebnisse der Haltbarkeitsuntersuchungen der Komplexe zeigen, dass die relevanten Inhaltsstoffe über 3 Monate bei -20 °C, 5 °C, RT, 30 °C und 40 °C stabil bleiben. Dies sind gerade für empfindliche Stoffe, wie Bestandteile des ätherischen Öls, Bedingungen, die einem Stress-Test entsprechen. Die Wiederfindungsrate von einge-

geschlossenem (-)- $\alpha$ -Bisabolol liegt bei ca. 90 %, bei den Spiroethern bei 60 - 80 %, was den ursprünglichen Mengen im Komplex direkt nach der Herstellung entspricht. Von den untersuchten Bestandteilen des Kamillenextraktes ist das  $\beta$ -Farnesen als unsubstituiertes Sesquiterpen die flüchtigste Komponente, aber auch in diesem Fall wird lediglich bei 40 °C die 90 %-Grenze in einem Fall knapp unterschritten. Betrachtet man den Anteil der eingeschlossenen Komponenten als 100 %-Wert, so liegt die Wiederfindungsrate nach Lagerung in den vorgeschriebenen 95 – 105 %-Grenzen. Das Zwischenprodukt entspricht also den Anforderungen, die an Phytopharmaka gestellt werden.

Der letzte Schritt ist die Wahl einer geeigneten Salbengrundlage. Ausgehend von einer vorhandenen Rezeptur, für die eine orientierende Stabilitätsstudie vorliegt, werden verschiedene Variationen der Hilfsstoffzusammensetzung untersucht, um zu einer streichfähigen Konsistenz zu gelangen. Dies führte nicht zum Erfolg. Daraufhin werden die nichtionische hydrophile Creme und die Basiscreme nach DAC getestet. Während die nichtionische hydrophile Creme zum Nachhärten neigt, erweist sich die Basiscreme nach DAC hinsichtlich ihrer Konsistenz als geeignet. Lediglich das gereinigte Wasser wird aus Stabilitätsgründen durch Phosphatpuffer pH 7,7 ersetzt. Die Salbengrundlage zeichnet sich durch eine geeignete Konsistenz aus, um mit einem Pulveranteil von 40 % eine homogene Suspensionscreme zu bilden und ist als hydrophile Grundlage für die Neurodermitis-Therapie geeignet. Die Wiederfindungsrate liegt für alle relevanten Inhaltsstoffe bei nahezu 100 %. Anhand des Vergleichs der Gaschromatogramme mit denen des Extraktes ist festzustellen, dass die Bestandteile der Grundlage die Trennung der Kamilleninhaltsstoffe nicht verschlechtern und keine Peaks überdecken, was zu falschen Ergebnissen führen könnte.

Die Haltbarkeitsstudie führt zu einem positiven Ergebnis, da weder Verluste noch Wechselwirkungen mit den Hilfsstoffen aus der Grundlage zu verzeichnen sind. Der Gehalt der Spiroether nimmt bei 30 °C und 40 °C um 10 – 20 % ab, diese Abnahme kann dem nichteingeschlossenen Anteil zugeschrieben werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Einschluss eines Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extraktes in  $\beta$ -Cyclodextrin und die Weiterverarbeitung zu einer Salbe einen positiven

Einfluss auf Stabilität, Konsistenz und Geruch hat. Die in dieser Arbeit entwickelte Kamillencreme stellt für den Neurodermitis-Patienten eine hochdosierte, geruchlose und gut streichfähige Arzneiform dar.

**Kapitel 9**  
**Literaturverzeichnis**

Ahmed, M.O.; El-Gibaly, I. und Ahmed, S.M.

"Effect of cyclodextrins on the physicochemical properties and antimycotic activity of clotrimazole"

Int. J. Pharm. **171**, 111-121 (1998)

Amdidouche, D.; Montassier, P.; Poelman, M.-C. und Duchene, D.

"Evaluation by laser doppler velocimetry of the attenuation of tretinoin induced skin irritation by  $\beta$ -cyclodextrin complexation"

Int. J. Pharm. **111**, 111-116 (1994)

Ammon, H.P.T.; Sabieraj, J. und Kaul, R.

"Kamille"

Dtsch. Apoth. Ztg. **136**, 17-30 (1996)

Andersen, F.M. und Bundgaard, H.

"Inclusion complexation of metronidazole benzoate with  $\beta$ -cyclodextrine and its depression of anhydrate- hydrate transition in aqueous suspensions"

Int. J. Pharm. **19**, 189-197 (1984)

Andersen, G. H.; Robbins, F. M.; Domingues, F. J.; Moores, R. G.; Long, C. L.

"The utilization of Schardinger dextrans by the rat"

Toxicol. Appl. Pharmacol **5**, 257-266 (1963)

Arima, H.; Adachi, H.; Irie, T.; Uekama, K. und Pitha, J.

"Enhancement of the antiinflammatory effect of ethyl 4-biphenyl acetat in ointment by  $\beta$ -cyclodextrin derivatives: Increased absorption and localized activation of the prod-

rug in rats"

Pharm. Res. 7, 1152-1156 (1990)

Bergeron, J.R.; Channin, G.A.M.; Gibeily, G.J. und Pillor, D.M.

"Disposition requirements for binding in aqueous solution of polar substrates in the cyclohexaamylose cavity"

J. Am. Chem. Soc. 99, 5146-5151 (1977)

Betts, T.J.

"Potential of three different  $\alpha$ -cyclodextrin modifications for the gas chromatographic evaluation of constituents of volatile oils"

J. Chromatogr. A 653, 167-172 (1993)

Betts, T.J.

"Use of esterified and unesterified dipentylated  $\gamma$ -,  $\beta$ - and  $\alpha$ -cyclodextrins as gas chromatographic stationary phases to indicate the structure of monoterpenoid constituents of volatile oils"

J. Chromatogr. A 672, 254-260 (1994)

Bhandari, B.R.; D'Arcy, B.R. und Bich, L.L.T.

"Lemon oil to  $\beta$ -cyclodextrin ratio effect on the inclusion efficiency of  $\beta$ -cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex"

J. Agric. Food Chem. 46, 1494-1499 (1998)

Bilow, U.

"Cyclodextrin - ein wahrer Tausendsassa"

Frankfurter Allgemeine Zeitung 158, N1-N2 (2001)

Braun-Falco, O.; Plewig, G.; Wolff, H.H. und Winkelmann, R.R.

"Dermatitis and Eczema"

In: Dermatology,

Springer, Berlin, 336-357 (2000)

Buschmann, J.; Knittel, D. und Schollmeyer, E.

"Eigenschaften von Cyclodextrinkomplexen mit Duftstoffen"

Seifen-Öle-Fette-Wachse 117, 585-588 (1991)

Carle, R. und Gomaa, K.

"Chamomile: A pharmacological and clinical profile"

Drugs Today 28, 559-565 (1992)

Celebi, N.; Kislal, Ö. und Tarimci, N.

"The effect of  $\beta$ -cyclodextrin and penetration additives on the release of naproxen from ointment bases"

Pharmazie 48, 914-917 (1993)

Corrigan, O.I. und Stanley, C.T.

"Mechanism of drug dissolution rate enhancement from  $\beta$ -cyclodextrin-drug-systems"

J. Pharm. Pharmacol. 34, 621-626 (1982)

Cramer, F.

"Einschlussverbindungen"

Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 4-5 (1954)

Cramer, F.; Saenger, W. und Spatz, H.-C.

"Inclusion Compounds. XIX.: The formation of inclusion compounds of  $\alpha$ -cyclodextrin in aqueous solutions"

J. Am. Chem. Soc. 89, 14-20 (1967)

Deutscher Arzneimittel Codex

"Basiscreme"

Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, GOVI, Eschborn, B-020 (2001)

Deutsches Arzneibuch 2001

Monographie "Kamillenöl"

Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, GOVI, Eschborn

DePonti, R.; Torricelli, C.; Motta, A. und Crivellente, M.

"Use of a polarographic method, a UV method and the phase-solubility technique to determine the stability constant in aqueous solution of a  $\beta$ -cyclodextrin complex with a new immunomodulating agent"

Eur. J. Pharm. Biopharm. 37, 106-109 (1991)

Duchene, D.; Wouessidjewe, D. und Poelmann M.C.

"Cyclodextrins in cosmetics"

In: New trends in cyclodextrins and derivatives,

Duchene, D., Ed. de Sante, Paris, 275-293 (1991a)

Duchene, D.; Wouessidjewe, D. und Poelmann M.C.

"Dermal uses of cyclodextrins and derivatives"

In: New trends in cyclodextrins and derivatives,

Duchene, D., Ed. de Sante, Paris, 239-274 (1991b)

Ebel, S.

"Über den Vertrauensbereich kalibrierender Analysenverfahren. Teil1: Lineare Kalibrierfunktionen"

Comput. Appl. Lab. 1, 55-61 (1983)

Richtlinie Nr. 95/2/EG des Europäischen Parlaments und des Rates

über andere Lebensmittelzusatzstoffe als Farbstoffe und Süßungsmittel, 46 (1995)

Fornasier, R.; Lucchini, V.; Scrimin, P. und Tonnelato, U.

"Unimodal binding of azulene with  $\beta$ -cyclodextrin: an intermolecular nuclear o-

verhauser effect study"

J. Incl. Phenom. 4, 291-294 (1986)

Fredholt, K.; Ostergaard, J.; Savolainen, J. und Friis, G.J.

" $\alpha$ -Chymotrypsin-catalyzed degradation of desmopressin (dDAVP): influence of pH, concentration and various cyclodextrins"

Int. J. Pharm. 178, 223-229 (1999)

Fridrich, R.; Mehnert, W. und Frömmling, K.-H.

"Studies of the inclusion compound between  $\beta$ -cyclodextrin and cholesterol"

In: Minutes of the fifth international symposium on cyclodextrins, Paris, 299-302 (1990)

Frijlink, H.W.

"Biopharmaceutical aspects of cyclodextrins"

Dissertation, Groningen (1990)

Frijlink, H.W.; Eissens, A.C.; Hefting, N.R.; Poelstra, K.; Lerk, C.F. und Meijer, D.K.F.

"The effect of parenterally administered cyclodextrins on cholesterol levels in the rat"

Pharm. Res. 8, 9-11 (1991)

Frömmling, K.-H.

"Einschlußverbindungen und ihre pharmazeutischen Verwendungsmöglichkeiten"

Pharmazie in unserer Zeit 2, 109-115 (1973)

Frömmling, K.H. und Szejtli, J.

"Cyclodextrins in pharmacy"

Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1994)

Funk, W.; Heinz, B.; Michel, H. und Vonderheid, C.

"Quantitative HPTLC von Silybin - Vergleich mit einem quantitativen HPLC-Verfahren"

GIT 3, 4-11 (1987)

Gaedcke, F. und Steinhof, B.

Phytopharmaka

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 83-109 (2000)

Gal-Fuzy, M.; Szente, L.; Szejtli, J. und Harangi, J.

"Cyclodextrin-stabilized volatile substances for inhalation therapy"

Pharmazie 39, 558-559 (1984)

Gazzaniga, A.; Sangalli, M.E.; Benelli, P.; Conte, G. und Giordano, F.

"Interaction between acetaminophen and  $\beta$ -cyclodextrin by powder compaction"

S.T.P. Pharma Sci. 4, 421-424 (1994)

Ghassemi-Dehkordi, N.

"Analytik, Radioisotopenmarkierung und Pharmakokinetik von Matricin und Spiroäthern aus *Matricaria recutita* L."

Dissertation, Philipps-Universität Marburg (1988)

Gengerly, V.; Sebestyen, G. und Virag, S.

"Toxicity studies of beta-cyclodextrin"

In: Proceedings of the first international symposium on cyclodextrins,

Szejtli, J., D. Reidel, Dordrecht, 109-113 (1981)

Gerloczy, A.; Fonagy, A.; Keresztes, P.; Perlaky, L. und Szejtli, J.

"Absorption, distribution, excretion and metabolism of universally labelled  $^{14}\text{C}$ - $\beta$ -cyclodextrin in rat after per os administration"

In: Gums and stabilisers for the food industry,

Philips, G.O.; Wedlock, D.J. und Williams, P.A., Elsevier Applied Science, 503-510

(1986)

Gieler, U.

”Äussere Therapie”

In: Kinder und Neurodermitis

Gieler, U., im Kilian, Marburg, 47-49 (1999)

Giordano, F.; Gazzaniga, A.; Bettinetti, G.O. und La Manna, A.

"The influence of water content on the binding capacity of  $\beta$ -cyclodextrin"

Int. J. Pharm. 62, 153-156 (1990)

Giordano, F.; Rillosi, M.; Gazzaniga, A.; Majewski, W. und Perrut, M.

"Interaction of supercritical fluids with drug/cyclodextrin inclusion compounds and physical mixtures"

Proceedings of the eight international symposium on cyclodextrins, Kluwer, Dordrecht, 193-196 (1996)

Glasl, H. und Wagner, H.

"Gaschromatographische Untersuchung von Arzneibuchdrogen.

5. Mitteilung: Kamillenblüte - eine neue Wertbestimmung der Kamillendroge und ihrer Zubereitungen"

Dtsch. Apoth. Ztg. 116, 45-50 (1976)

Glomot, F.; Benkerrou, L.; Duchene, D. und Poelman, M.-C.

"Improvement in availability and stability of a dermacorticoid by inclusion in  $\beta$ -cyclodextrin"

Int. J. Pharm. 46, 49-55 (1988)

Grünhagen, U.

”Kapillargaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen an Kamillenextrakten”

Dissertation, Shaker, Stuttgart (1994)

Harangi, J. und Nanasi, P.

"Measurement of the essential oil in inclusion complexes with cyclodextrin by means of capillary gas chromatography"

Anal. Chim. Acta 156, 103-109 (1984)

Hedges, A.R.

"Industrial applications of cyclodextrins"

Chem. Rev. 98, 2035-2044 (1998)

Hellriegel, C.; Händel, H.; Wedig, M.; Steinhauer, S.; Sörgel, F.; Albert, K. und Holzgrabe, U.

"Study on the chiral recognition of the enantiomers of ephedrine derivatives with neutral and sulfated heptakis(2,3-O-diacetyl)- $\beta$ -cyclodextrins using capillary electrophoresis, UV, nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry"

J. Chromatogr. A 914, 315-324 (2001)

Higuchi, T. und Connors, K.A.

"Phase-Solubility Techniques"

Adv. Anal. Chem. Instr. 4, 117-212 (1965)

Hirayama, F. und Uekama, K.

Methods of investigating and preparing inclusion compounds

In: Cyclodextrins and their industrial uses

Duchene, D., Ed. de Sante, Paris, 131-159 (1987)

Hirayama, F.; Yamanaka, M.; Horikawa, T. und Uekama, K.

"Characterization of peracylated  $\beta$ -cyclodextrins with different chain lengths as a novel sustained release carrier for water-soluble drugs"

Chem. Pharm. Bull. 43, 130-136 (1995)

Hölzl, J.

"Kamille, die meistverwendete Arzneipflanze in Deutschland"  
therapeutikon 3, 555-560 (1989)

Hoshino, T.; Ishida, K.; Irie, T.; Uekama, K. und Ono, T.

"An attempt to reduce the photosensitizing potential of chlorpromazine with simultaneous use of  $\beta$ - and dimethyl- $\beta$ -cyclodextrins in guinea pigs"  
Arch. Dermatol. Res. 281, 60-65 (1989)

<http://www.cyclodex.com>

Irie, T. und Uekama, K.

"Pharmaceutical Applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation"  
J. Pharm. Sci. 86, 147-162 (1997)

Isaac, O.; Schneider, H. und Eggenschwiller, H.

"Beitrag zur Kenntnis des Kamillen-Bisabolols"  
Dtsch. Apoth. Ztg. 108, 293-298 (1968)

Ismail, S.

"Interaction of anti-convulsant drugs with alpha- and beta-cyclodextrins: I. Methsuximide"  
S.T.P. Pharma Sci. 1, 321-325 (1991)

Ismail, S.

"Interaction of anticonvulsant drugs with alpha- and beta-cyclodextrins II. Phen-suximide"  
S.T.P. Pharma Sci. 2, 181-185 (1992)

Jacobsen, J.; Bjerregaard, S. und Pedersen, M.

"Cyclodextrin inclusion complexes of antimycotics intended to act in the oral cavity - drug supersaturation, toxicity on TR146 cells and release from a delivery system"

Eur. J. Pharm. Biopharm. 48, 217-224 (1999)

James, K.C.

"Solute-Solvent complexation"

In: Solubility and related properties

James, K.C., Marcel Dekker, New York, 251-277 (1986)

Kaiser, C.S.; Römpp, H. und Schmidt, P.C.

"Pharmaceutical applications of supercritical carbon dioxide"

Pharmazie 56, 907-925 (2001)

Kawahara, K.; Ueda, H.; Tomono, K. und Nagai, T.

"Effect of diethyl  $\beta$ -cyclodextrin on the release and absorption behaviour of indomethacin from ointment bases"

S.T.P. Pharma Sci. 2, 506-513 (1992)

Koester, L.S.; Guterres, S.S.; Le Roch, M.; Eifler-Lima, V.L.; Zuanazzi, J.A. und Bassani, V.L.

"Ofloxacin/  $\beta$ -cyclodextrin complexation"

Drug Dev. Ind. Pharm. 27, 533-540 (2001)

Komiyama, M. und Bender, M.L.

"Importance of apolar binding in complex formation of cyclodextrins with adamantanecarboxylate"

J. Am. Chem. Soc. 100, 2259-2260 (1978)

Kralova, K.; Mitterhauszerova, L. und Stadler-Szöke, A.

"Inklusionskomplexe von  $\beta$ -Cyclodextrin mit Paracetamol und Phenacetin"

Pharmazie 38, 547-548 (1983)

Krasowska, H.; Czechowska, D. und Bura, I.

"In vitro release fenbufen and its inclusion complexes with cyclodextrins from different ointment bases"

Acta Pol. Pharm. - Drug Research 54, 23-30 (1997)

Lee, B.-J.; Lee, T.-S.; Cha, B.-J.; Kim, S.-H. und Kim, W.-B.

"Percutaneous absorption and histopathology of a poloxamer-based formulation of capsaicin analog"

Int. J. Pharm. 159, 105-114 (1997)

Legendre, J.Y.; Rault, I.; Petit, A.; Luijten, W.; Demuyne, I.; Horvath, S.; Ginot, Y.M. und Ciune, A.

"Effects of  $\beta$ -cyclodextrins on skin: implications for the transdermal delivery of piritidil and a novel cognition enhancing-drug, S-9977"

Eur. J. Pharm. Sci. 3, 311-322 (1995)

Lemme, J.

“Intelligente Stoffe“

<http://www.orf.via.at/modern.times/magazin/ausgaben/200176/stories/7603.asp>

Linde, H. und Cramer, G.

"(-)- $\alpha$ -Bisabolol und cis-2-[Hexadiin-(2,4)-yliden]-1,6-dioxaspiro-[4,4]-nonen-(3) in handelsüblichen Kamillen-Extrakten"

Arzneim.-Forsch. 22, 583-585 (1972)

Liu, F.; Kildsig, D. und Mitra, A.

"Beta-cyclodextrin/steroid complexation: effect of steroid structure on association equilibria"

Pharm. Res. 7, 869-873 (1990)

Loftsson, T.

"Pharmaceutical applications of  $\beta$ -cyclodextrin"

Pharm. Technol. Eur. 11 (10), 20-32 (1999)

Loftsson, T.

"Cyclodextrins in skin delivery"

Allured's Cosmetics Toiletties Magazine 115, 59-66 (2000)

Loftsson, T. und Masson, M.

"Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice"

Int. J. Pharm. 225, 15-30 (2001)

Lopez, R.F.V.; Collett, J.H.; Vitoria, M. und Bentley, L.B.

"Influence of cyclodextrin complexation on the in vitro permeation and skin metabolism of dexamethasone"

Int. J. Pharm. 200, 127-132 (2000)

Marques, H.M.C.

"Structure and properties of cyclodextrins. Inclusion complex formation"

Rev. Port. Farm. 64, 77-84 (1994a)

Marques, H.M.C.

"Cyclodextrins' derivatives. Absorption, toxicity, metabolism and fate."

Rev. Port. Farm. 64, 147-156 (1994b)

Marques, H.M.C.; Hadgraft, J. und Kellaway, I.W.

"Studies of cyclodextrin inclusion complexes. I. The salbutamol-cyclodextrin complex as studied by phase solubility and DSC"

Int. J. Pharm. 63, 259-266 (1990)

Masson, M. und Loftsson, T.

"Drug-Cyclodextrin complexation in the presence of water-soluble polymers: Enhanced solubility and percutaneous transport"

ACS Symp. Ser. 737, 24-45 (1999)

Mura, P.; Bettinetti, G.P.; Manderilli, A.; Faucci, M.T.; Bramanti, G. und Sorrenti, M.

"Interaktions of ketoprofen and ibuprofen with  $\beta$ -cyclodextrins in solution and in the solid state"

Int. J. Pharm. 166, 189-203 (1998)

Mura, P.; Faucci, M.T. und Parrini, P.L.

"Effects of grinding with microcrystalline cellulose and cyclodextrins on the ketoprofen physicochemical properties"

Drug Dev. Ind. Pharm. 27, 119-128 (2001)

Ness, A.

Hochdosierte, feste, matricinhaltige Kamillenzubereitungen

Dissertation, Tübingen (1995)

Ness, A.; Metzger, J.W. und Schmidt, P.C.

"Isolation, identification and stability of 8-desacetylmaticin, a new degradation product of matricine"

Pharm. Acta Helv. 71, 265-271 (1996)

Neuwald, F. und Scheel, D.

"Lagerungsversuche mit einem alkoholischen Kamillenfluidextrakt in verschiedenen Kunststoffbehältern"

Dtsch. Apoth. Ztg. 38, 1458 (1969)

Ono, N.; Hirayama, F.; Arima, H. und Uekama, K.

"Analysis of the phase solubility diagram of a phenacetin / competitor /  $\beta$ -cyclodextrin

ternary system, involving competitive inclusion complexation"

Chem. Pharm. Bull. 49, 78-81 (2001)

Otagiri, M.; Fujinaga, T.; Sakai, A. und Uekama, K.

"Effects of  $\beta$ - and  $\gamma$ - cyclodextrins on release of betamethasone from ointment bases"

Chem. Pharm. Bull. 32, 2401-2405 (1984)

Otero-Espinar, F.J.; Anguiano-Igea, S.; Garcia-Gonzalez, N.; Vila-Jato, J.L. und Blanco-Mendez, J.

"Interaction of naproxen with  $\beta$ -cyclodextrin in solution and in the solid state"

Int. J. Pharm. 79, 149-157 (1992)

Padukka, I.; Bhandari, B. und D' Arcy, B.

"Evaluation of various extraction methods of encapsulated oil from  $\beta$ -cyclodextrin-lemon oil complex powder"

J. Food Comp. Anal. 13, 59-70 (2000)

Palmieri, G.F.; Galli-Angeli, D.; Giovannucci, G. und Martelli, S.

"Inclusion of methoxybutropate in  $\beta$ - and ydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrins: Comparison of preparation methods"

Drug Dev. Ind. Pharm. 23, 27-37 (1997)

Pedersen, M.; Jacobsen, J. und Sorensen, A.M.

"Cyclodextrin inclusion complexes of Miconazole and Econazole - isolation, toxicity on human cells, and confirmation of a new interpretation of the drug supersaturation phenomenon"

Drug Dev. Ind. Pharm 25, 463-470 (1999)

Pekic, B.; Zekovic, Z. und Tolic, A.

"Study of the extraction of camomile flowers with supercritical carbon dioxide"

J. Serb. Chem. Soc. 60, 439-443 (1995)

Pekic, B.; Zekovic, Z. und Torlic, A.

"Dependence of the camomile flower yield on the carbon dioxide quantity during isothermal supercritical extraction "

J. Serb. Chem. Soc. 62, 531-533 (1997)

Pitha, J. und Pitha, J.

"Amorphous water-soluble derivatives of cyclodextrins: nontoxic dissolution enhancing excipients"

J. Pharm. Sci. 74, 987-990 (1985)

Preiss, A.; Mehnert, W. und Frömming, K.-H.

"In vitro hydrocortisone release from ointments in presence of cyclodextrins"

Pharmazie 49, 902-906 (1994)

Pschyrembel

"Atopisches Ekzem"

Klinisches Wörterbuch, Walter de Gruyter, Berlin (1994)

Rahman Abdel, A.A.; Khidr, S.H.; Ahmed, S.M. und Aboutaleb, A.E.

"Evaluation of chloramphenicol- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex"

Eur. J. Pharm. Biopharm. 37, 34-37 (1991)

Rajagopalan, N.; Chen, S.C. und Chow, W.-S.

"A study of the inclusion complex of amphotericin-B with  $\gamma$ -cyclodextrin"

Int. J. Pharm. 29, 161-168 (1986)

Rajewski, R.A. und Stella, V.J.

"Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery"

J. Pharm. Sci. 85, 1142-1169 (1996)

Reverchon, E. und Senatore, F.

"Supercritical carbon dioxide extraction of chamomile essential oil and its analysis by gas chromatography-mass spectrometry"

J. Agric. Food Chem. 42, 154-158 (1994)

Roselli, C.; Perly, B.; Duchene, D. und Wouessidjewe, D.

" $\beta$ -Cyclodextrin and its derivatives as solubilizing fillers for tablet formulations:  $^1\text{H}$ -NMR contribution as the ultimate tool for the study of drug / cyclodextrin interaction"

S.T.P. Pharma Sci. 9, 267-271 (1999)

Sabieraj, J.

"Zum Mechanismus der entzündungshemmenden Wirkung der Kamille, ihrer Extrakte und der Inhaltsstoffe Bisabololide, Chamazulen, Matricin, der Spiroether und Apigenin"

Dissertation, Tübingen (1993)

Saenger, W.

"Cyclodextrin-Einschlußverbindungen in Forschung und Industrie"

Angew. Chem. 92, 343-361 (1980)

Scalia, S.; Giuffreda, L. und Pallado, P.

"Analytical and preparative supercritical fluid extraction of chamomile flowers"

J. Pharm. Biomed. Anal. 21, 549-558 (1999)

Schilcher, H.

"Die Kamille"

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, (1987)

Schuette, J.M.; Ndou, T.T.; Munoz de la Pena, A.; Mukundan, S.,J. und Warner, I.M.

"Influence of alcohols on the  $\beta$ -cyclodextrin / acridine complex"

J. Am. Chem. Soc. 115, 292-298 (1993)

Sevastiyanova, E.V.; Davidenko, T.I.; Shapiro, Y.E. und Pykhiteev, E.G.

"Inclusion of the fir oil into  $\beta$ -Cyclodextrin"

Doklady Akademi Nauk Ukrainy 7, 110-115 (1993)

Shiotani, K.; Uehata, K.; Irie, T.; Uekama, K.; Thompson, D.O. und Stella, V.J.

"Differential effects of sulfate and sulfobutyl ether of  $\beta$ -cyclodextrin on erythrocyte membranes in vitro"

Pharm. Res. 12, 78-84 (1995)

Sidhu, G.S. und Oakenfull, D.G.

"Cyclodextrin/cholesterol complexation and technology for removing cholesterol from eggs and dairy products"

In: Minutes of the sixth international Symposium on cyclodextrins,  
Hedges, A.R., Ed.de Sante, Paris, 314-327, (1992)

Sigurdardottir, A.M. und Loftsson, T.

"The effect of polyvinylpyrrolidone on cyclodextrin complexation of hydrocortisone and its diffusion through hairless mouse skin"

Int. J. Pharm. 126, 73-78 (1995)

Soliman, O.A.E.; Kimura, K.; Hirayama, F.; Uekama, K.; El-Sabbagh, H.M.; El-Gawad, H. und Hashim, F.M.

"Amorphous spironolactone-hydroxypropylated cyclodextrin complexes with superior dissolution and oral bioavailability"

Int. J. Pharm. 149, 73-83 (1997)

Soyke, B.

"Stabilisierung von Matricin in festen Kamillenzubereitungen"

Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 6-9 (1991)

Stahl, E. und Schütz, E.

"Extraktion der Kamillenblüten mit überkritischen Gasen"

Arch. Pharm. 311, 992-1001 (1978)

Steigleder, G.K.

"Ekzeme"

In: Therapie der Hautkrankheiten

Thieme, Stuttgart, 147-153 (1986)

Stella, J.V. und Rajewski, A.

"Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery"

Pharm. Res. 14, 556-567 (1997)

Szejtli, J.

The metabolism, toxicity and biological effects of cyclodextrins

In: Cyclodextrins and their industrial uses

Duchene, D., Ed. de Sante, Paris, 173-204 (1987)

Szejtli, J.

"Cyclodextrins in Drug Formulations: Part I"

Pharm. Technol. 15, 36-44 (1991)

Szejtli, J.

"Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry"

Chem. Rev. 98, 1743-1753 (1998)

Szente, L.; Gal-Füzy, M. und Szejtli, J.

"Stabilization of camomile oil with  $\beta$ -cyclodextrin"

Proc. Int. Symp. Cyclodextrins, Budapest, 431-442 (1982)

Szente, L.; Apostol, I. und Szejtli, J.

"Suppositories containing  $\beta$ -cyclodextrin complexes: Part 1: Stability Studies"

Pharmazie 39 (10), 697-699 (1984)

Szente, L.; Gal-Füzy, M. und Szejtli, J.

"Tea aromatization with  $\beta$ -cyclodextrin complexed flavours"

Acta Aliment. 17, 193-199 (1988a)

Szente, L.; Harangi, J. und Szejtli, J.

"Long term storage stability studies on flavour-  $\beta$ -cyclodextrin complexes"

Proc. Int. Symp. Cyclodextrins, 4th Budapest Kluwer Academic Publishers, 545-550 (1988b)

Szente, L. und Szejtli, J.

"Stabilization of flavors by cyclodextrins"

ACS Symp. Ser. 370, 148-157 (1988)

Szente, L.; Mikuni, K.; Hashimoto, H. und Szejtli, J.

"Stabilisation and solubilisation of lipophilic natural colorants with cyclodextrins"

J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem. 32, 81-89 (1998)

Thoß, M.

"Stabilisierung Ätherischer Öle durch Cyclodextrine"

Dissertation FU-Berlin (1990)

Thoß, M.; Schwabe, L. und Frömming, K.-H.

"Cyclodextrin-Einschlußverbindungen von Zitronen-, Orangen-, Hopfen- und Kamillenöl"

Pharm. Ztg. -Wissenschaft 138, 144-148 (1993)

Thoss, M.; Schwabe, L. und Frömming, K.-H.

"Lagerungs- und Photostabilität der Cyclodextrin-Einschlußverbindungen von Zitro-

nen-, Orangen-, Hopfen- und Kamillenöl"

Pharmazie 49, 252-257 (1994)

Tokuoka, R.; Abe, M.; Fujiwara, T.T.K. und Saenger, W.

"Crystal structure of a  $\beta$ -cyclodextrin - ethanol - octahydrate"

Chem. Lett. 5, 491-494 (1980)

Uekama, K. und Otagiri, M.

"Cyclodextrins in drug carrier systems"

In: Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems,

Bruck, S.D., CRC Press, 1-40 (1987)

Uekama, K.; Hirayama, F.; Nasu, S.; Matsuo, N. und Irie, T.

"Determination of the stability constants for inclusion complexes of cyclodextrins with various drug molecules by high performance liquid chromatography"

Chem. Pharm. Bull. 26, 3477-3484 (1978)

Uekama, K.; Matsuo, N.; Hirayama, F.; Ichieagase, H.; Arimori, K.; Tsubaki, K. und Satake, K.

"Enhanced bioavailability of acetohexamide by  $\beta$ -cyclodextrin complexation"

Yakugaku Zasshi 100, 903-909 (1980)

Uekama, K.; Irie, T.; Sunada, M.; Otagiri, M.; Arimatsu, Y. und Nomura, S.

"Allevation of prochlorperazine -induced primary irritation of skin by cyclodextrin complexation"

Chem. Pharm. Bull. 30, 3860-3862 (1982)

Uekama, K.; Hirayama, F. und Irie, T.

"Cyclodextrin drug carrier systems"

Chem. Rev. 98, 2045-2076 (1998)

USP 25/NF 20)

The United States Pharmacopeia

Official monograph "betadex", general information "validation of compendial methods"

U.S. Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, 2515, 2256-258 (2002)

Veiga, F.; Teixeira-Dias, J.J.C.; Kedzierewicz, F.; Sousa, A. und Maincent, P.

"Inclusion complexation of tolbutamide with  $\beta$ -cyclodextrin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin"

Int. J. Pharm. 129, 63-71 (1996)

Veiga, F.; Fernandes, C. und Maincent, P.

"Influence of the preparation method on the physicochemical properties of tolbutamide / cyclodextrin binary systems"

Drug Dev. Ind. Pharm. 27, 523-532 (2001)

Veiga, M.D.; Diaz, P.J. und Ahsan, F.

"Interactions of griseofulvin with cyclodextrins in solid binary systems"

J. Pharm. Sci. 87, 891-900 (1998)

Vincieri, F.F.; Mazzi, G.; Mulinacci, N.; Papini, P. und Gelsomini, N.

"Monitoring by headspace gas chromatography (HSGC) of essential oils- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexation. The case of cinnamomum zeylanicum essential oil"

Pharm. Acta. Helv. 63, 282-286 (1988)

Vitoria, M.; Bentley, B.; Vianna, R.; Wilson, S. und Collett, J.

"Characterisation of the influence of some cyclodextrins on the stratum corneum from the hairless mouse"

J. Pharm. Pharmacol. 49, 397-402 (1997)

Vogel, K.

"Herstellung von Flüssigextrakten aus Kamille mit Propylenglykol als Lösungsmittel"  
Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1992)

Vogel, K.; Schmidt, P.C.

"An ethyl alcohol-free liquid extract of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert for oral and topical application"

Pharm. Pharmacol. Lett. 3, 152-155 (1993)

Vollmer, U.; Stoppie, P.; Mesens, J.; Wilffert, B. und Peters, T.

"Hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin in transdermal absorption in vivo in rats"

Minutes Int. Symp. Cyclodextrins, 6th, 535-538 (1992)

Vuorele, H.; Holm, Y. und Hiltunen, R.

"Extraction of the volatile oil in chamomile flowerheads using supercritical carbon dioxide"

Flavour Fragrance J. 5, 81-84 (1990)

Williams, A.C.; Shatri, S.R.S. und Barry, B.W.

"Transdermal permeation modulation by cyclodextrins: A mechanistic study"

Pharm. Dev. Technol. 3, 283-296 (1998)

Wollrab, A.

Gaschromatographie

Diesterweg Salle Sauerländer, Frankfurt, 91-98 (1983)

Yamaoka, K.; Yamagishi, Y.; Takayama, K.; Nambu, N. und Tsuneji, N.

"Interaktion of nitroglycerin with  $\beta$ -cyclodextrin in solution and in solid state."

Yakuzaigaku 41, 231-236 (1981)

Zerrouk, N.; Gines Dorado, J.M.; Arnaud, P. und Chemtob, C.

"Physical characteristics of inclusion compounds of 5-ASA in  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrins"

Int. J. Pharm. 171, 19-29 (1998)

Zosel, K.

"Praktische Anwendungen der Stofftrennung mit überkritischen Gasen "

Angew. Chem. 90, 748-755 (1978)

## Kapitel 10

## Anhang

### 10.1 Messdaten der Kalibrierung der gaschromatographischen Methode zur quantitativen Bestimmung von (-)- $\alpha$ -Bisabolol

Tab. 10.1 Messdaten der Kalibrierung von n-Hexadecan

	Konzentration n-Hexadecan [mg/100 ml]	Flächeneinheiten n-Hexadecan	Konzentration n-Hexadecan [mg/100 ml]	Flächeneinheiten n-Hexadecan [mg/100 ml]
	0,41	8571	3,09	61758
	0,41	8571	3,09	61261
	0,41	8409	3,09	61654
	0,41	8223	3,09	62925
	0,41	8157	3,09	62347
	0,41	8271	3,09	61446
<b>Mittelwert</b>		<b>8367,0</b>		<b>61898,5</b>
<b>realsdv [%]</b>		<b>2,13</b>		<b>1,01</b>
<b>var</b>		<b>3,18E+04</b>		<b>3,89E+05</b>
	1,03	20772	4,12	83704
	1,03	20708	4,12	84113
	1,03	20543	4,12	83740
	1,03	20518	4,12	83763
	1,03	20423	4,12	83172
	1,03	20449	4,12	83417
<b>Mittelwert</b>		<b>20568,8</b>		<b>83651,5</b>
<b>realsdv [%]</b>		<b>0,69</b>		<b>0,39</b>
<b>var</b>		<b>1,99E+04</b>		<b>1,04E+05</b>
	1	2,06	42112	
	2	2,06	41888	
	3	2,06	41689	
	4	2,06	41745	
	5	2,06	41868	
	6	2,06	41405	
<b>Mittelwert</b>		<b>41784,5</b>		
<b>realsdv [%]</b>		<b>0,57</b>		
<b>var</b>		<b>5,59E+04</b>		

Tab. 10.2 Messdaten der Kalibrierung von (-)- $\alpha$ -Bisabolol

	Konzentration (-)- $\alpha$ -Bisabolol [mg/50 ml]	Konzentration n-Hexadecan [mg/50 ml]	Flächeneinheiten (-)- $\alpha$ -Bisabolol	Flächeneinheiten n-Hexadecan	FE (-)- $\alpha$ -Bisabolol/ FE n-Hexadecan
<b>Mittelwert</b> <b>relsdv [%]</b> <b>var</b>	0,448	1,15	49893	169160	0,2949
	0,448	1,15	48899	166260	0,2941
	0,448	1,15	45242	164130	0,2756
	0,448	1,15	48198	161910	0,2977
			<b>48058</b>	<b>165365</b>	<b>0,2906</b>
			<b>4,17</b>	<b>1,87</b>	<b>3,4696</b>
					<b>1,02*10<sup>-4</sup></b>
<b>Mittelwert</b> <b>relsdv [%]</b> <b>var</b>	2,24	1,15	288170	178820	1,6115
	2,24	1,15	290180	181530	1,5985
	2,24	1,15	288510	180210	1,6010
	2,24	1,15	288360	179000	1,6109
			<b>288805</b>	<b>179890</b>	<b>1,6037</b>
			<b>0,32</b>	<b>0,70</b>	<b>0,4303</b>
					<b>4,76*10<sup>-5</sup></b>
<b>Mittelwert</b> <b>relsdv [%]</b> <b>var</b>	4,48	1,15	557860	167270	3,3351
	4,48	1,15	553960	165050	3,3563
	4,48	1,15	553420	167220	3,3095
	4,48	1,15	570300	169030	3,3740
			<b>558885</b>	<b>167143</b>	<b>3,3437</b>
			<b>1,41</b>	<b>0,97</b>	<b>0,8310</b>
					<b>7,72*10<sup>-4</sup></b>
<b>Mittelwert</b> <b>relsdv [%]</b> <b>var</b>	6,72	1,15	913330	172410	5,2974
	6,72	1,15	924140	174650	5,2914
	6,72	1,15	936000	175630	5,3294
	6,72	1,15	951550	177430	5,3630

	Konzentration (-) )- $\alpha$ -Bisabolol [mg/50 ml]	Konzentration n- Hexadecan [mg/50 ml]	Flächeneinheiten (-)- $\alpha$ -Bisabolol	Flächeneinheiten n-Hexadecan	FE (-)- $\alpha$ -Bisabolol/ FE n-Hexadecan
<b>Mittelwert</b>			937230	175030	5,3279
<b>relsdv [%]</b>			1,47	0,81	0,67
<b>var</b>					1,28*10 <sup>-3</sup>
	8,96	1,15	1312300	185390	7,0786
	8,96	1,15	1301200	183920	7,0748
	8,96	1,15	1295900	182610	7,0965
	8,96	1,15	1295870	182430	7,1034
<b>Mittelwert</b>			<b>1298550</b>	<b>183973</b>	<b>7,0833</b>
<b>relsdv [%]</b>			<b>0,29</b>	<b>0,76</b>	<b>0,16</b>
<b>var</b>					<b>1,35*10<sup>-4</sup></b>
	11,2	1,15	1829400	199190	9,1842
	11,2	1,15	1824700	198180	9,2073
	11,2	1,15	1828100	198940	9,1892
	11,2	1,15	1827999	198933	9,1890
<b>Mittelwert</b>			<b>1827400</b>	<b>198770</b>	<b>9,1936</b>
<b>relsdv [%]</b>			<b>0,13</b>	<b>0,26</b>	<b>0,13</b>
<b>var</b>					<b>1,48*10<sup>-4</sup></b>
	13,44	1,15	1884000	172140	10,9446
	13,44	1,15	1904010	173740	10,9595
	13,44	1,15	1918100	175950	10,9014
	13,44	1,15	1918000	175780	10,9119
<b>Mittelwert</b>			<b>1902067</b>	<b>173953</b>	<b>10,9352</b>
<b>relsdv [%]</b>			<b>0,90</b>	<b>1,10</b>	<b>0,2759</b>
<b>var</b>					<b>9,10*10<sup>-4</sup></b>

## 10.2 Firmenverzeichnis

Büchi Laboratorium-Technik GmbH, Esslingerstr. 8, D-73037 Göppingen

Extrasynthese, Z.I. Lyon-Nord-Impasse Jaquard, F-69726 Genay

Heraeus Instruments GmbH, Postfach 1561, D-63450 Hanau

Heumann GmbH, Heideloffstr. 18-28, D-90478 Nürnberg

Hewlett-Packard GmbH, Schickardstr. 2, D-71034 Böblingen

Krüß Laborgeräte GmbH, Borstelet Chausee 85-99a, D-22453 Hamburg

Linhardt & Co. GmbH, Weiherer Str. 41, D-76707 Hambrücken

Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Neumann-Neander-Str. 6-8, D-52355 Düren

Martin Bauer GmbH & Co. KG, Dutendorfer Str. 5-7, D-91487 Vestenbergsreuth

Memmert GmbH & Co. KG, Äuß. Rittersbacher Str. 38, D-91105 Schwabach

Merck KgaA, Frankfurterstr. 250, D-64271 Darmstadt

Messer Griesheim GmbH, Homberger Str. 12, D-40474

Mettler Toledo GmbH, Ockerweg 3, D-35396 Giessen

Microsoft GmbH, D-85716 Unterschleissheim

Millipore GmbH, Hauptstr. 87, D-Eschborn

Riedel-de Haen AG, Wunsdorfer Str. 40, D-30918 Seelze

Robugen GmbH, Alleenstr. 22-26, D-73730 Esslingen

Roland Vetter Laborbedarf e. K., Herrenbergerstr. 5, D-72119 Ammerbuch

Roth GmbH & Co, Willmar-Schwabe-Str. 4, D-76227 Karlsruhe

Sartorius AG, Weender Landstr. 94-108, D-37075 Göttingen

Schleicher & Schuell GmbH, Albert-Hahn-Str. 6-10, D-47269 Duisburg

Sigma GmbH, Grünwalderweg 30, D-82041 Deisenhofen

VCH-Verlagsgesellschaft, Boschstr. 12, D-64289 Weinheim

Wacker-Chemie GmbH, Hanns-Seidel-Platz 4, D-81737 München

Wepa Apotheken-Bedarf, Gartenstr. 14-16, D-56203 Höhr-Grenzenhausen

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Beerhues, Beissenhirtz, Breitmeier, Glombitza, Holzgrabe, Kempfle, Lehmann, Leistner, Meise, Mohr, Nickel, Pachaly, Ross, Rücker, Schlotmann, Schmidt, Schwabedahl, Steffens, Süverkrüp, Wahl, Wiedemann

## Lebenslauf

22. Februar 1971	geboren in Kattowitz / Polen
September 1978 – Juni 1986	Volksschule in Kattowitz
September 1986 – März 1988	Wilhelm Pieck Gymnasium in Kattowitz
April 1988 – Juni 1992	Jung-Stilling-Gymnasium in Hilchenbach
Oktober 1992 – April 1997	Studium der Pharmazie an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn
Mai – Oktober 1997	Praktikum bei den Troponwerken GmbH & CoKG in Köln
November 1997 – April 1998	Praktikum in der Lindenthal Apotheke in Köln
Mai 1998	Erlangen der Approbation für Apotheker
Seit Juli 1998	Beginn der Dissertation „Herstellung und Charakterisierung eines $\beta$ -Cyclodextrin / Kamillen-CO <sub>2</sub> -Extrakt-Komplexes als Wirkkomponente einer halbfesten Arzneiform“ am Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Universität Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. P.C. Schmidt