



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

*„Entwicklung einer hautfreundlichen Formulierung mit
Panax Ginseng-Extrakt:
Charakterisierung und Hautpermeation“*

verfasst von / submitted by

Zorana Dekić, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the
degree of

Magistra pharmaciae (Mag.pharm.)

Wien, 2021 / Vienna 2021

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth

Mitbetreut von / Co-Supervisor:

Mag. Dr. Victoria Klang

Eidstattliche Erklärung

Ich erkläre eidestattlich, dass ich die Arbeit selbstständig angefertigt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle aus ungedruckten Quellen, gedruckter Literatur oder aus dem Internet im Wortlaut oder im wesentlichen Inhalt übernommenen Formulierungen und Konzepte gemäß den Richtlinien wissenschaftlicher Arbeiten zitiert, durch Fußnoten gekennzeichnet bzw. mit genauer Quellenangabe kenntlich gemacht habe.

Datum:

Unterschrift:

Bad Vöslau, am 20.September 2021


Dekić Zorana, BSc

DANKSAGUNG

Besonders bedanken möchte ich mich bei Mag. pharm. Dr. Victoria Klang für die ausgezeichnete Betreuung und die Chance in ihrem Team meine Masterarbeit absolvieren zu dürfen. Ich schätze es sehr, dass sie mir bei meiner Idee und der daraus entstandenen Themenauswahl für die Arbeit Unterstützung gegeben hat. Ein herzliches Dankschön für die nette Zusammenarbeit und die Erfahrungen, die ich in dieser Zeit sammeln konnte. Danke auch für die freundschaftlichen Gespräche und kollegiale Beihilfe während meiner praktischen Arbeit.

Weiters bedanke ich mich bei Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Wirth und der gesamten Division für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Department für Pharmazeutische Wissenschaften, für die Bereitstellung der Messgeräte und des Arbeitsplatzes.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei Dr. Ammar Tahir, MSc für die Ausarbeitung einer HPLC-Methode zur Quantifizierung des Ginseng-Extrakts und seine Bereitschaft zur Kooperation bedanken.

Ein großer Dank gebührt der Firma KGV-Korea Ginseng Vertriebs GmbH und Herrn Benno von Sobbe für die Bereitstellung des *Panax Ginseng*-Extraktes. Durch diese Kooperation wurde die Umsetzung der Ideen zu dieser Arbeit ermöglicht.

Der größte Dank geht an meinen Ehemann Dejan und meine Kinder Mila und Marko. Seit Beginn meines Studiums haben sie mich in jeder Hinsicht unterstützt und sind mir stets zur Seite gestanden. Danke für die Ausdauer und das Mitgefühl während meiner stressigen Prüfungszeiten. Sie haben mir die Kraft gegeben, das Studium bis zum Ende durchzuziehen. Ebenso ein großes Dankeschön an meinen Onkel Univ. Lekt. Gert G. Beirer und meine Tante Vesna. Sie haben mich immer mental unterstützt und motiviert. Ein unbeschreiblich besonderer Dank geht an meine Mutter Dragana und Schwiegermutter Radosava. Danke für die Hilfe und Unterstützung in kritischen Lernphasen während der gesamten fünfjährigen Studienzeit. Sie sind immer da, mir und meiner Familie unter die Arme zu greifen.

Abschließend möchte ich mich auch bei meinem Vater Zoran, meinem Bruder Dragan, Schwägerin Lidija und Schwager Karl herzlichst bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung	6
2. Allgemeiner Teil	7
2.1. <u>Die Haut</u>	7
2.1.1. Aufbau und Funktion der menschlichen Haut	7
2.1.2. Hautalterung	10
2.1.2.1. Intrinsische Faktoren	10
2.1.2.2. Extrinsische Faktoren	11
2.1.2.3. Kosmetisch verwendete Wirkstoffe („Anti-Aging“)	11
2.2. <u>Nanoemulsionen</u>	14
2.2.1. Definition	14
2.2.2. Komponenten	15
2.3. <u>Verwendete Hilfsstoffe</u>	18
2.3.1. Mittelkettige Triglyceride	18
2.3.2. Saccharoseester	19
2.3.3. Kaliumsorbat	20
2.4. <u>Panax Ginseng in Dermatika und Kosmetika</u>	21
2.4.1. Herkunft und Pflanze	21
2.4.1.1. Ginseng Spezies	23
2.4.2. Aktive Inhaltsstoffe	24
2.4.2.1. Triterpensaponine	24
2.4.2.2. Polysaccharide	27
2.4.2.3. Polyacetylene	27
2.4.2.4. Weitere Inhaltsstoffe	28
2.4.3. Wirkung und Toxizität	29
2.4.4. Ginseng und Anwendung	30
2.4.5. Ginseng in der Kosmetik (dermale Anwendung)	30
3. Methoden und Materialien	33
3.1. <u>Hochdruckhomogenisation</u>	33
3.2. <u>Dynamische Laserlichtstreuung DLS und</u>	
<u>Elektrophoretische Lichtstreuung ELS</u>	34
3.2.1. Hydrodynamischer Durchmesser	34

3.2.2. Zetapotential	35
3.2.3. Polydispersitätsindex PDI	36
3.3. <u>Rheologie</u>	36
3.3.1. Fließkurven	36
3.3.2. Oszillationsversuche	38
3.3.3. Rheometer	39
3.4. <u>pH-Messung</u>	40
3.5. <u>Franz-Zelle</u>	41
3.6. <u>HPLC</u>	41
4. Experimenteller Teil und Ergebnisse	43
4.1. <u>Herstellung von Nanoemulsionen</u>	43
4.1.1. Vorversuche zur Herstellungsmethode und Evaluierung	43
4.1.2. Evaluierung der Messmethode für die Zetapotentialbestimmung	46
4.1.3. Charakterisierung und Stabilitätsuntersuchungen der NE	53
4.1.3.1. Messmethode und Ergebnisse Zetasizer	56
4.1.3.2. Messmethode und Ergebnisse pH-Wert	59
4.1.3.3. Messmethode und Ergebnisse Rheometer	60
4.1.4. Evaluierung der Messmethode für die Rheologie	75
4.2. <u>Herstellung von Nanoemulsionen mit Ginsengextrakt</u>	78
4.2.1. Herstellung der Nanoemulsionen	78
4.2.2. Charakterisierung und Stabilitätsuntersuchungen	80
4.2.2.1. Makroskopische Beurteilung	80
4.2.2.2. Ergebnisse Zetasizer	80
4.2.2.3. Ergebnisse pH-Wert	82
4.2.2.4. Ergebnisse Rheometer	83
4.2.3. Permeationsversuche mit Franz-Diffusionszellen	88
4.2.3.1. Ergebnisse der HPLC-Analyse	91
5. Diskussion	96
6. Zusammenfassung und Conclusio	98
7. Abstract	100
8. Literaturverzeichnis	101

1. Einleitung und Zielsetzung

Panax Ginseng, im speziellen der rote Ginseng aus der Familie der Araliaceae, beinhaltet ein komplexes Gemisch verschiedener Inhaltsstoffe. Hierbei sind neben Polyacetylenen und Polysacchariden die als Ginsenoside bekannten Triterpensaponine von Interesse für verschiedene medizinische Ansätze [1]. In der Literatur finden sich zahlreiche Studien, die einen anti-tumoralen, anti-inflammatoryischen, anti-oxidativen und adaptogenen Effekt von Ginseng beschreiben [2].

Neben der systemischen Anwendung von *Panax Ginseng*-Extrakten ist auch eine dermale Anwendung in Kosmetika möglich. Hier gibt es Hinweise auf positive Effekte, die der natürlichen Hautalterung entgegenwirken [3]. Daher wird *Panax Ginseng*-Extrakt in „Anti-Aging“-Produkten verwendet.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein geeignetes Vehikel zur dermalen Applikation eines hochwertigen *Panax Ginseng*-Extrakts zu entwickeln. Zu diesem Zweck wurde eine Reihe von hautfreundlichen O/W-Nanoemulsionen auf Basis von verschiedenen Saccharoseestern (Zuckertensiden) hergestellt und in Bezug auf ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften hin verglichen.

Besonderes Augenmerk lag auf der Lagerstabilität und den Fließeigenschaften, die nach einer umfassenden anfänglichen Charakterisierung bis zu 12 Wochen beobachtet wurden. Die vielversprechendste Formulierung wurde zur Einarbeitung eines *Panax Ginseng*-Trockenextrakts herangezogen.

Zuletzt wurden Permeationsstudien mit Franz-Diffusionszellen und porziner Bauchhaut als Modellmembran durchgeführt, um erste Informationen über die Hautpermeation der wichtigsten Ginsenoside zu erhalten. Die verwendete HPLC-Technik konnte dank einer Kooperation mit der Division für Pharmakognosie, Department für pharmazeutische Wissenschaften, genutzt werden. Auch eine Gehaltsbestimmung und Überwachung der chemischen Stabilität wurde im Rahmen der Arbeit begonnen, um potenzielle Abbauprozesse zu verfolgen.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Die Haut

2.1.1. Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

Die Haut ist mit einer Fläche von 1,5 - 2 m² und einer durchschnittlichen Masse von 11 kg das größte menschliche Organ. Dadurch, dass die Haut die gesamte äußere Oberfläche unseres Körpers bedeckt, ist sie für den Menschen lebenswichtig [5]. Der Aufbau der Haut umfasst drei Schichten, nämlich die Epidermis, die Dermis und die Subcutis. In Abbildung 1 ist der Aufbau schematisch dargestellt.

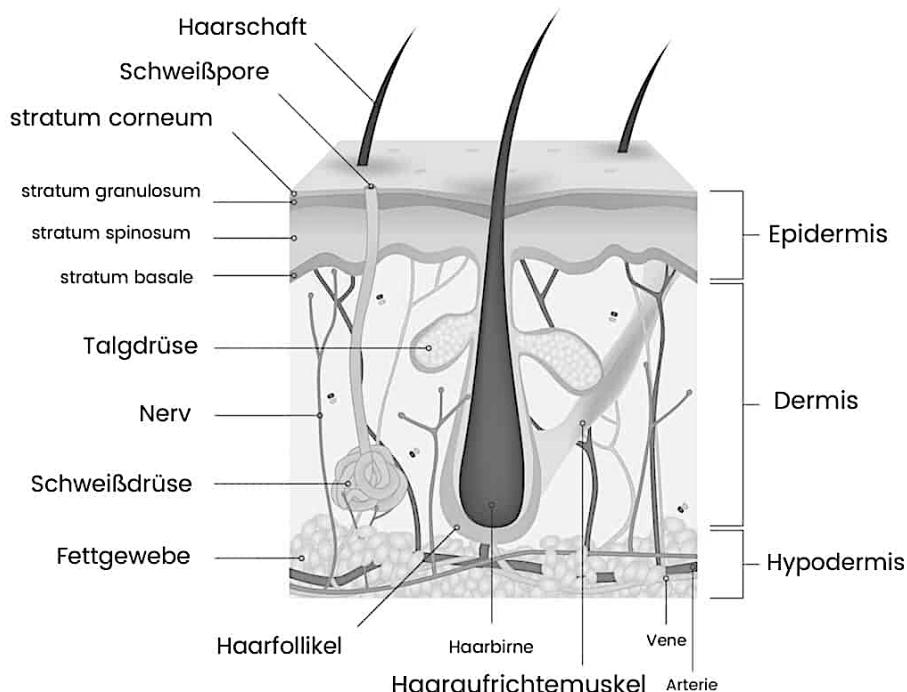


Abb.1: Schematischer Aufbau der Haut [6]

Die verschiedenen Funktionen der Haut hängen eng mit der Physiologie der Hautschichten zusammen und werden nachfolgend genauer beschrieben. Allgemein kann man sagen, dass eine der Hauptaufgaben der Haut darin besteht, das Gewebe gegen chemische, physikalische und mechanische Verletzungen zu schützen. Ebenso bietet die Haut eine Schutzbarriere gegen unerwünschtes Eindringen von Bakterien und Mikroorganismen. Sie verhindert die Austrocknung unseres Körpers, anderseits lässt sie eine gewisse Wasserverdunstung zu, die zur Thermoregulation

beiträgt. Sie wirkt also als Wärmeregulator und vermittelt als eines der Sinnesorgane durch ihre empfindlichen Sensoren Schmerz-, Berührungs-, Temperatur- und Druckkreize [7].

Der pH-Wert der Hautoberfläche beträgt 4,2 - 5,6; der Hydrolipidfilm mit seinem sauren Milieu ist ebenfalls sehr wichtig für die intakte Barrierefunktion [5].

Die Epidermis

Die Epidermis, der ektodermale Teil der Haut, auch Oberhaut genannt, besteht allgemein aus einer Horn- und Keimschicht mit deren Hautanhangsgebilden wie Schweißdrüsen, Haaren und Nägeln. Dieser Teil der Haut wird nicht durchblutet und besteht aus einem mehrschichtigem Plattenepithel mit einer Dicke von 40 µm – 1,6 mm. Die oberste Hautschicht ist verantwortlich für die Pigmentierung und die Schutzbarrierefunktion.

Die Epidermis besteht je nach Region aus 4 - 5 Schichten. Das Stratum corneum (Hornschicht) besteht aus vollständig abgeplatteten, kernlosen Zellen, den Korneozyten. Korneozyten sind abgestorbene Keratinozyten und werden letztlich als kleine Hautschüppchen abgestoßen.

Das Stratum lucidum (Glanzschicht) befindet sich nur in der Leistenhaut der Fusssohlen und Handflächen. Es handelt sich um stark verhornte Hautpartien. Die Glanzschicht enthält Eleidin, welches aus Keratohyalin entstanden ist.

Das Stratum granulosum (Körnerschicht) umfasst flache Zellen mit Zellkern mit sogenannten Keratinosomen, die Ceramide enthalten, welche sehr wichtig für die Barrierefunktion des Stratum corneum sind [7].

Das Stratum spinosum (Stachelzellschicht) besteht aus mehreren Zelllagen. Diese Zellen sind über Desmosomen miteinander verknüpft. In dieser Schicht findet die Umwandlung der Keratinozyten statt. Keratohyalin, ein Protein, das sich in Form von kleinen Granula innerhalb der Keratinozyten ansammelt, leitet die Verhornung (Keratinisierung) der Zellen ein. Im Stratum spinosum findet man auch immunkompetente Abwehrzellen, die Langerhans-Zellen.

Das Stratum basale (Basalschicht) ist wichtig für die Pigmentierung der Haut, da hier die Synthese und Speicherung des Hautpigments Melanin stattfindet. Melanin wird in den Melanozyten aus Tyrosin über L-Dopa gebildet. Melanozyten sind Pigmentzellen; sie bilden und speichern Melanin in Melanosomen, die dann von den

Keratinozyten aufgenommen werden. Die Keratinozyten werden hier gebildet und alle vier Wochen als tote Hautschicht abgeschuppt [7,8].

Die Dermis

Die Dermis wird auch Corium oder Lederhaut genannt, da aus ihr bei Tieren durch Gerbung Leder hergestellt werden kann. Es ist die kollagenfaserreiche und bindegewebehaltige Schicht der Haut. Histologisch unterteilt man diese Schicht in das Stratum papillare (Zapfenschicht) und reticulare (Netzschicht).

Das Stratum reticulare besteht aus festen, gekreuzten Kollagenfaserbündeln und mit dazwischenliegenden Elastinfasern, die aus Elastin und Mikrofibrillen bestehen. Diese sind gemeinsam mit den Fibroblasten verantwortlich für die Elastizität der Haut. Weitere Zellen, die in dieser Hautschicht zu finden sind, sind Fibrozyten, die ebenso wie Fibroblasten bindegewebespezifische Zellen sind. Weiters finden sich hier Mastzellen, Lymphozyten und Monozyten [7,8].

Das Stratum papillare ist eine Gewebeschicht mit Ausstülpungen zur Epidermis hin. Durch diese Vorwölbungen (Papillen) ist die Dermis mit der Epidermis wellenförmig verstrickt [9]. Durch die zapfenförmigen Papillen, die in die Epidermis ragen, ist die Kontaktobерfläche zwischen diesen beiden Schichten vergrößert und ermöglicht einen notwendigen Stoffaustausch und Strukturzusammenhalt [10]. Weiters ist diese Schicht reich an feinen Fibrillen, Kapillaren und immunologisch aktiven Zellen wie Mastzellen und Histiozyten [7]. Neben dem Bindegewebe enthält die Lederhaut Blutgefäße, Nerven, Haarwurzeln und Haarfollikel, Schweiß- und Lymphdrüsen und glatte Muskulatur [9]. Die Zwischenräume sind von gelartiger Konsistenz, die durch einen hohen Gehalt an Glukosaminoglykanen, wie z.B. Hyaluronsäure, ein hohes Wasserbindevermögen aufweisen [10].

Die Subkutis

Die Subkutis, auch als Unterhaut oder Fettgewebe-Schicht benannt, geht in die Lederhaut ohne scharfe Grenzen über. Es ist ein lockeres, lamellar gebautes Bindegewebe, das viele Nervenfasern und Blutgefäße durchlaufen [9].

Die Funktion des subkutanen Fettgewebes ist der Kälteschutz und die Energiespeicherung. Die Ausprägung des Unterhautfettgewebes ist geschlechtsspezifisch, hängt von der Ernährung und dem Energiebedarf ab. In der Kindheit wird schon

eine gewisse Zahl an Fettzellen angelegt; die Fettzellen selbst können später nicht mehr abgebaut werden [10].

2.1.1. Hautalterung

Die Hautalterung bezeichnet einen biologischen Prozess, der Veränderungen der Haut umfasst. Damit sind tiefe Falten, runzelige Oberfläche und Risse gemeint. Diese Schädigungen der Haut können durch intrinsische und extrinsische Faktoren ausgelöst werden [11]. Der aktuelle Hautzustand sollte bei kosmetischen Beratungen berücksichtigt werden [12].

2.1.2.1. Intrinsische Faktoren

Der natürliche Hautalterungsprozess (physiologische oder intrinsische Hautalterung) wird durch individuelle genetische Prädisposition und chronobiologische Prozesse gesteuert. Genetische und hormonelle Effekte sind maßgeblich [11]. Die gonadalen Hormone sind am Alterungsprozess beteiligt. Die Verminderung von Östrogenen und Androgenen spielt eine wichtige Rolle beim Altern der Haut, wobei dies bei jedem Menschen aufgrund des individuellen Hormonsystems anders ist [13]. Die Hormonabnahme im Laufe des Lebens führt zu Veränderungen sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis; eine bis zu 50%ige Abnahme der Epidermisdicke und eine bis zu 30%igen Abnahme der Dermisdicke tritt ein [14].

Die intrinsischen Abbauprozesse beinhalten eine Veränderung der Haut-Mikroflora, eine Senkung des oberflächlichen pH-Werts und eine Abnahme des Lipidgehalts des Stratum Corneum [15]. Weiters weist alternde Haut eine reduzierte Zellproliferation auf; die Synthese der Matrixproteine ist reduziert und die Anzahl der Enzyme, die diese Matrixproteine abbauen, ist erhöht. Außerdem wird die Hautalterung auf der molekularen Ebene durch oxidativen Stress und Verkürzung der Telomere deutlich beeinflusst [16,20]. Weitere Folgen der natürlichen Hautalterung sind ein sinkender Kollagengehalt, eine Abnahme des Wassergehaltes und der Elastizität [17]. Als typisches Merkmal der Hautalterung bilden sich Falten. Falten sind kleine Rinnen und Furchen, bedingt durch Nachlassen der Hautelastizität [9]. Weitere klinische Zeichen der Hautalterung sind Austrocknung der Haut, Schlaffheit und Atrophie, also Rückbildung und Ausdünnung der Haut [15].

Ein weiterer wichtiger Faktor in Bezug auf die Hautalterung ist der persönliche Lebensstil. Dieser umfasst die Ernährung, den psychischen Status betreffend Stress und Schlafmangel, den Genussmittelkonsum von Alkohol und Tabak und die Medikamenteneinnahme [18]. Hier kann die Einzelperson präventiv wirksam werden, um eine übermäßige Hautalterung zu vermeiden. Der natürliche Alterungsprozess der Haut, die intrinsische Hautalterung, ist irreversibel und nicht zu beeinflussen, während extrinsische Faktoren mitunter beeinflussbar sind [12].

2.1.2.2. Extrinsische Faktoren

Die extrinsische Hautalterung wird durch äußere Belastungsfaktoren ausgelöst. Hierzu zählen UV-Strahlung, Traumata, Umweltverschmutzung, Infektionen und Rauchen [15].

Einer der bedeutendsten von außen wirkenden Faktoren auf die Hautalterung ist das Sonnenlicht. Die Wirkung des Lichts auf die Haut ist wichtig für die Vitamin D-Synthese. Es reicht jedoch eine kurze tägliche Exposition, um das Tageskontingent des fettlöslichen Hormons zu erhalten. Die Strahlungsschäden, die aufgrund der Penetrationstiefe des Sonnenlichts auftreten, sind jedoch massiv [19]. Über viele Jahre dauernde UV-Belastung führt zu Austrocknung, Schlaffheit, Brüchigkeit und feinen Falten sowie sogenannten Lentigines (Altersflecken) oder aktinischen Keratosen, eine Präkanzerose. In weiterer Folge können auch verschiedene Formen von Hautkrebs ausgelöst werden [15].

Das Auftreten von lichtbedingten kosmetischen Hautschäden wird auch als Lichtalterung, lichtbedingte Hautalterung bzw. Photo-aging bezeichnet [10,20]. Die Ein dringtiefe des Sonnenlichts in die Hautschichten hängt von der Wellenlänge ab; am problematischsten ist hier das UV-Licht im Bereich 200-400 nm, also dem UVA-Bereich [19].

2.1.2.3. Kosmetisch verwendete Wirkstoffe als „Anti-Aging-Mittel“

Da in der heutigen Gesellschaft in hochentwickelten Ländern dem Idealbild von jugendlicher Kraft und Schönheit ein hoher Stellenwert zugeordnet wird, ist die durch intrinsische und extrinsische Faktoren bedingte sichtbare Faltenbildung im Alter un erwünscht. Um die Haut möglichst lange gesund zu halten und die Faltenbildung zu verlangsamen, werden zahlreiche kosmetische Präparate angeboten. Die Schädi

gung der Haut durch Licht oder die Abnahme des Kollagens stehen bei vielen Produkten im Mittelpunkt. Man muss jedoch bei der Anwendung zwischen kosmetischen und dermatologischen Präparaten, also registrierten Arzneimitteln, differenzieren. Die meisten kosmetisch aktiven Substanzen oder arzneilichen Wirkstoffe verbleiben am lokalen Wirkort, der Haut [19].

Im Bereich der „Anti-Aging“-Strategien gibt es verschiedene Ansätze, um das Erscheinungsbild der Haut zu verbessern [12]. Einer der wichtigsten Aspekte ist der Schutz der Haut vor extrinsischen Faktoren wie UV-Licht. Hier eignen sich Präventiva, die gegen UV-Strahlung schützen [12]. Daher wird zahlreichen Kosmetika heute ein Breitbandfilter bzw. spezifische Sonnenschutzfilter gegen UVA- und UVB-Strahlung zugesetzt, die bei konsequentem Einsatz eine gute Schutzwirkung ausüben [19].

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der Erhalt der Hautfeuchtigkeit, welche mit zunehmendem Alter generell abnimmt. Zum Schutz gegen Austrocknung eignen sich Feuchtigkeitscremes [12]. Hier wird versucht, Feuchtigkeit in der Haut zu binden und sie nach außen glatter wirken zu lassen. Mitunter werden auch durchblutungsfördernde Stoffe für diesen Zweck eingesetzt, die aufgrund ihrer Wirkung den Wasserhaushalt kurzfristig beeinflussen können und so eine gewisse optische Wirkung auf die Falten haben [19]. Ebenso bieten Gesichtsmasken eine vorübergehende Hydratisierung der Haut und ein glatteres Hautbild [19].

Vitaminreiche Ernährung soll die Haut vor unerwünschten Oxidationsprozessen schützen, die in erster Linie durch freie Sauerstoffradikale verursacht werden [12,20]. Eine dermale Anwendung von Vitaminen und Antioxidantien, wie beispielsweise Vitamin E (Tocopherolacetat) oder Vitamin C (Ascorbinsäure), kann die Hautzellen direkt schützen [12]. Ascorbinsäure ist eines der wichtigsten kosmetisch eingesetzten Antioxidantien; das wasserlösliche Vitamin kann eine Vielzahl an Radikalen abfangen, ist für die Bildung des Bindegewebes wichtig, ist ein Cofaktor bei der Kollagensynthese und kann auch direkt die Kollagensynthese aktivieren [12]. Vitamin A-Derivate (β -Carotin oder Retinoide) inhibieren Enzyme wie Kollagenasen, die Kollagen und Elastin abbauen [12]. Auch der Vitamin B-Gruppe, darunter Panthothenösäure, Nicotinsäure, Biotin und Pyridoxin, sowie dem Coenzym Q10 (Ubichinon), wird eine positive kosmetische Wirkung zugeschrieben [12].

Eine weitere Substanzklasse, die im kosmetischen Bereich gerne eingesetzt wird, sind pflanzliche Polyphenole. Dazu zählen Proanthocyanidine, Hydroxyzimtsäuren,

Anthocyane und vor allem Biflavonoide, die in Ginseng, Aloe vera, Sojabohnen und Traubengerkerextrakten zu finden sind [10].

Die sogenannten Phytoestrogene, die in Ginseng und anderen Pflanzen wie Sojabohnen, grünem Tee, Rotklee, Traubensilberkerze enthalten sind, sollen eine positive Wirkung in Bezug auf Hautalterung haben. Vor allem von Isoflavonen wird berichtet, dass sie den Kollagenstoffwechsel stimulieren sollen [12]. Auf diese Weise soll der natürliche Hautalterungsprozess verlangsamt und das Bindegewebe straff gehalten werden [10,12]. Auch die Nutzung von dermalen Probiotika wird in diesem Zusammenhang intensiv diskutiert und untersucht [15].

Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung des Hautbildes besteht in der lokalen Anregung der Zellneubildung. Hierfür können Schälkuren und Peelings eingesetzt werden; sogenannte chemische Peelings beinhalten häufig α -Hydroxsäuren wie Salicyl- oder Fruchtsäure, die je nach Menge keratolytisch wirken und die Zellneubildung anregen; hochdosierte Anwendungen müssen medizinisch betreut werden [12].

Eine bekannte kosmetisch verwendete Substanz ist Hyaluronsäure. Diese ist äußerst regelmäßig in Anti-Falten-Cremes zu finden. Es handelt sich chemisch gesehen um ein Glycosaminoglycan, das große Mengen Wasser in der Haut bindet und auf diese Weise Falten verringert. In der ästhetischen Dermatologie wird Hyaluronsäure als Füllsubstanz (engl. Filler) in die Haut injiziert. Der Prozess ist effektiv gegen Falten, muss jedoch regelmäßig wiederholt werden. Auch Injektionen mit Botulinumtoxin (BTX A) werden gegen Falten eingesetzt, wobei dieser Strategie die Reduktion der Mimikfalten durch Lähmung der Gesichtsmuskulatur zugrunde liegt [12]. Als letzter Ansatz wäre noch die externe Zufuhr von Proteinen wie Kollagen zu nennen, um das Hautbild zu verbessern [12]. Das körpereigene Faserprotein Kollagen wird gerne kosmetisch eingesetzt, kann jedoch aufgrund seines Molekulargewichts nicht tief in die Haut penetrieren oder gar in die Dermis eingebaut werden [19].

2.2. Nanoemulsionen

2.2.1. Definition

Emulsionen sind halbfeste Zubereitungen, die oft als geeignete Darreichungsformen für Hautpflege verwendet werden. Sie sind streichfest und erzeugen ein angenehmes Hautgefühl. Emulsionen sind zwei- oder mehrphasige Systeme aus zwei miteinander nicht mischbaren Flüssigkeiten. Dieses fein verteilte Gemisch besteht meistens aus einer Öl- und Wasserphase [10].

Bei O/W-Emulsionen (Öl-in-Wasser) liegen die Öltröpfchen dispergiert in der hydrophilen Phase vor. Bei W/O-Emulsionen (Wasser-in-Öl) sind die Wassertropfen innen dispergiert und die äußere Phase bildet die lipophile Ölphase. Damit es zu keiner Phasentrennung kommt, ist eine Zugabe von Emulgatoren notwendig. Diese Tenside erfüllen die Funktion für den Zusammenhalt dieses heterogenen Gemisches und eine Reduktion der Oberflächenspannung [5].

Der mittlere Teilchengrößendurchmesser von Emulsionen liegt zwischen 100 nm (Nanometer) und bis zu einem Millimeter. Emulsionen mit einem Partikelgrößendurchmesser unter 100 nm nennt man Nanoemulsionen [21]. Der Begriff Nanoemulsion hat sich heutzutage auch für Emulsionen mit einem Partikeldurchmesser von 150 nm bis 250 nm als Synonym für Submikron-Emulsion oder Miniemulsion durchgesetzt [12, 23, 24].

Die Anwendung von Nanoemulsionen im dermalen kosmetischen Bereich zeigt sich als sehr vorteilhaft. Nanoemulsionen interagieren sehr rasch mit der Haut, haben eine fluide Konsistenz, eine kleine Partikelgröße und effiziente Permeation [22]. Der Aufbau einer Nanoemulsion basiert auf einer Lipidmonoschicht, die eine flüssige ölige Phase umschließt. Sie zählt zu den nanodispersen Systemen wie Liposomen und Lipidnanopartikel, die jedoch einen anderen Aufbau haben [12]. Weiters gibt es multiple Emulsionen, die sich durch einen komplexeren Aufbau auszeichnen [12]. Der Aufbau konventioneller und multipler Nanoemulsionen ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

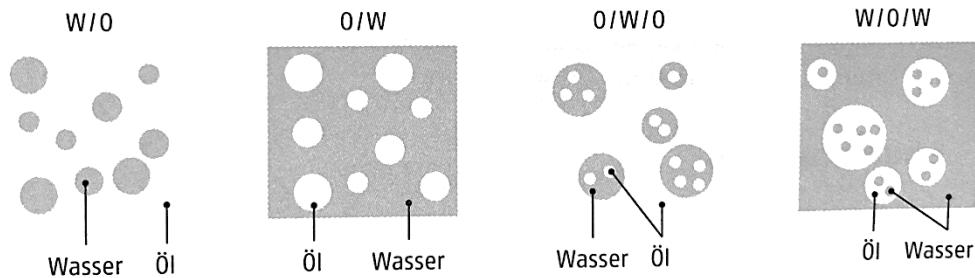


Abb. 2: Schematische Darstellung unterschiedlicher Emulsionstypen [12]

Die Herstellung der im Zuge dieser Arbeit produzierten Nanoemulsionen wird in Kapitel 4.1. *Herstellung von Nanoemulsionen* erläutert.

2.2.2. Komponenten von Emulsionen

Emulsionen bestehen aus einer lipophilen Phase (Ölphase), einer hydrophilen Phase (Wasserphase) und einem Tensid, welches die beiden miteinander nicht mischbaren Flüssigkeiten in einem Mehrphasensystem vereint. Emulsionen sind grundsätzlich thermodynamisch instabile Systeme, da das System eine Phasentrennung anstrebt [5].

Lipophile Grundlage

Als lipophile Flüssigkeiten eignen sich Fette und Öle. Sie sind Ester des dreiwertigen Alkohols Glycerin mit unterschiedlichen gesättigten oder ungesättigten Fettsäurezusammensetzungen. Kosmetisch gebräuchliche pflanzliche Fette und Öle sind beispielsweise Avocadoöl, Mandelöl, Olivenöl, Rizinusöl, Sesamöl, Sonnenblumenöl, mittelkettige Triglyceride und viele mehr [12]. Nanoemulsionen enthalten in der Regel einen Ölgehalt von 10-20 % m/m [10].

Hydrophile Grundlage

Hydrophile Grundstoffe in Emulsionen können Wasser (INCI: Aqua) oder Alkohole wie beispielsweise Ethanol, Propylenglykol oder Glycerol sein [12]. Üblicherweise verwendet man demineralisiertes gereinigtes Wasser, das in O/W-Emulsionen mengenmäßig eine der Hauptkomponenten ist [10].

Meistens werden Emulsionen vom Typ O/W für kosmetische Zwecke verwendet, da hydrophile Cremes schneller einziehen, sich einfacher verteilen lassen und keinen

Fettfilm hinterlassen [10]. Dies ist aus kosmetischer Sicht wünschenswert. Zur Basispflege trockener oder neurodermitischer Haut hingegen sollte unbedingt auf ein stärker rückfettendes Produkt zurückgegriffen werden, das mittels Okklusionseffekt die Hautfeuchtigkeit längerfristig erhöht [12].

O/W-Nanoemulsionen sind aufgrund der kleineren Tröpfchengröße physikalisch stabiler als normale O/W-Emulsionen; Nanoemulsionen auf Basis von Lecithin- oder Zuckertensiden sind zudem aufgrund des geringen Gehalts an Emulgatoren sehr gut hautverträglich [5].

Tenside (Emulgatoren)

Emulgatoren sind grenzflächenaktive Stoffe amphiphilen Charakters [5]. Sie verhindern, dass es zu einer Phasentrennung der Öl- und Wasserphase kommt. Sie sind für die Stabilität der Formulierung verantwortlich, da sie die Grenzflächenenergie herabsetzen [10,12].

Man unterscheidet bei Tensiden folgende Gruppen:

Anionenaktive Emulgatoren sind beispielsweise klassische Seifen wie Natriumstearat. Weitere funktionelle Gruppen, die man hier findet, sind Carboxylate, Sulfate, Sulfonate und Citrate. Ein bekanntes Beispiel aus der Gruppe der anionogenen Tenside ist Natriumdodecylsulfat [12].

Kationenaktive Emulgatoren sind beispielsweise quartäre Ammonium- und Pyridinium- Verbindungen. Diese werden jedoch seltener in kosmetischen Präparaten eingesetzt [10]. In der Pharmazie werden sie meistens als Konservierungs- und Desinfektionsmittel verwendet [5].

Amphotere Emulgatoren sind durch eine chemische Struktur gekennzeichnet, die sowohl anionische als kationische Gruppen enthält. Ein bekanntes Beispiel ist das Phosphatidylcholin, umgangssprachlich als Lecithin bezeichnet. Lecithine stellen eine große Gruppe von Tensiden dar, die gerne im Lebensmittelbereich verwendet werden. Betaine und Sulfolactaine (Sultaine) zählen auch zu den zwitterionischen Tensiden [12].

Nichtionische Emulgatoren sind Fettalkohole und Sterole wie beispielsweise Cetylalkohol, Stearylalkohol und Cholesterin. Sorbitanfettsäureester, sogenannte SPANs, sind nicht-ionische Tenside vom W/O-Typ. Polyoxyethylen-Sorbitanfettsäureester, sog. TWEENs oder Polysorbate, gehören zur O/W-Tensid-Gruppe. Weiters

gehören Polyoxyethylen-Fettsäureglyceride wie zum Beispiel Macrogolglycerolmonostearat, Polyoxyethylen-Fettalkoholether wie Macrogollaurylether, Glycerolfettsäureester wie Glycerolmonostearat und makromolekulare Tenside wie Poloxamere zu dieser Gruppe [5,12].

Tenside können als O/W- und W/O-Emulgatoren eingesetzt werden. Zur Charakterisierung von Tensiden eignet sich die HLB-Bestimmung nach Griffin. Die Bezeichnung „HLB-Wert“ steht für *Hydrophilic/Lipophilic Balance* (Gleichgewicht von hydrophilen und lipophilen Gruppen). Die Skala erstreckt sich über die Zahlenwerte 0-20 und gilt streng genommen nur für nichtionische Tenside. In Abbildung 3 ist ein Überblick über die Einsatzmöglichkeiten von Tensiden nach HLB-Wert dargestellt [5,25]. Für eine besonders gute Stabilität einer O/W-Emulsionen eignen sich Komplexemulgatoren, die spezielle Tensid-Mischungen darstellen und resistenter gegenüber Inkompabilitäten sind [12].

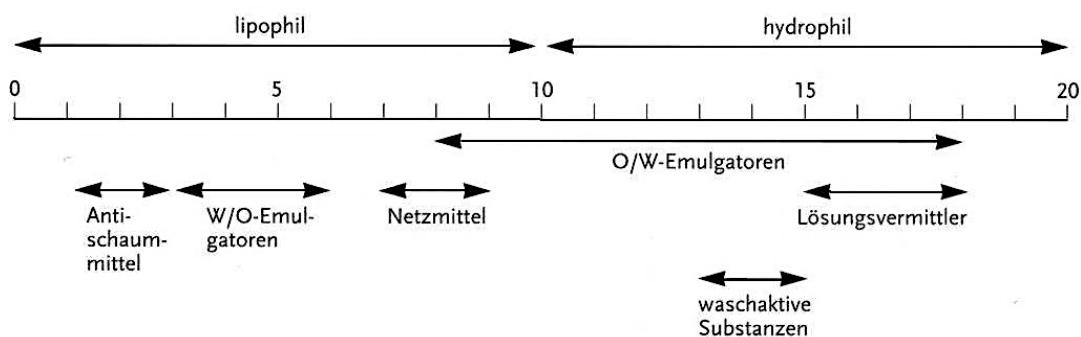


Abb.3: Einsatzmöglichkeit von Tensiden mit unterschiedlichem HLB-Wert [25]

2.3. Verwendete Hilfsstoffe

2.3.1. Mittelkettige Triglyceride

Mittelkettige Triglyceride oder MCT-Fette (medium chain triglyceride-Fette) sind Ester halbsynthetischer öliger Glyceride und gesättigter Fettsäuren. Sie werden auch als Neutralöle oder Neutralfette bezeichnet [5,12]. Ausgangsstoffe für die Herstellung sind Kokos- oder Palmkernöle. Sie werden verseift und hydriert, um die ungesättigten Fettsäuren zu beseitigen. Danach wird fraktioniert, um MCT-Fette mit den gewünschten Fettsäuren zu erhalten. Mittelkettige gesättigte Fettsäuren sind Capron-, Capryl- und Caprinsäuren mit einer Kohlenstoff-Kettenlänge von C6, C8 und C10 und Laurinsäure mit C12. Anschließend werden die Fettsäuren mit Glycerin wieder verestert [5,12].

In dieser Arbeit wurden MCT-Fette für die lipophile Phase der Nanoemulsion gewählt. Neutralöle zeigen eine gute Hautverträglichkeit und sind geruchsneutral. MCT-Fette zeichnen sich außerdem als stabile, niedrig viskose und nicht-oxidierbare Grundlage aus. Sie zeigen hervorragende Lösungsmittelleigenschaften, nicht nur mit Lipidkomponenten, sondern auch mit Alkohol [5,12]. Abbildung 4 zeigt die chemische Struktur von mittelketten Triglyceriden.

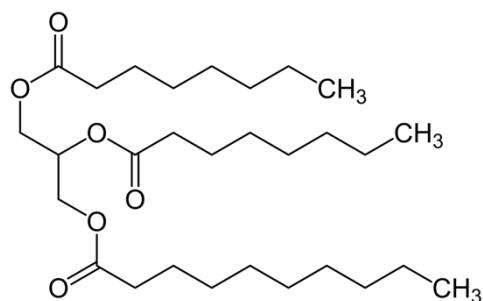


Abb.4: chemische Struktur von MCT [26]: Glycerin verestert mit zwei Capryl- (C8) und einer Caprinsäure (C10)

Die MCT-Fette, die in der Arbeit zur Herstellung der Nanoemulsionen verwendet wurden, wurden von der Herba Chemosan Apotheker AG erworben (Triglycerida saturata media, PHQ, CAS: 73398-61-5; Neutralöle- nicht zur parenteralen Anwendung, lichtgeschützt bis max. 25°C lagern).

2.3.2. Saccharoseester

Saccharoseester oder Zuckerester gewinnen in Kosmetik und Pharmazie in der heutigen Zeit immer mehr an Bedeutung. Sie zählen zu den nicht-ionogenen Tensiden. Aufgrund ihrer lösungsmittelfreien Herstellung haben sie einen hohen Stellenwert erlangt. Lösungsmittelfreie Zuckerester sind beispielsweise Saccharose-Laurat und Stearat. Zuckerester zeigen hervorragende dermatologische Aspekte [27,28,31]. Es ist bekannt, dass sie toxikologisch unbedenklich sind. Auch in hohen Konzentrationen zeigen die Zuckerester eine feuchtigkeitsspendende Wirkung und gute Haut- und Schleimhautverträglichkeit [27]. Ein weiterer Vorteil der Zuckertenside, die nicht nur aus Saccharose, sondern auch aus Glucose oder Sorbitol hergestellt werden können, ist die nachwachsende Rohstoffgewinnung und die biologische Abbaubarkeit [29,30]. Aufgrund dieser positiven dermatologischen Eigenschaften wurden die Saccharoseester in dieser Arbeit als Emulgatoren gewählt. Saccharose besitzt acht freie Hydroxygruppen, die man mit Fettsäuren verestern kann. Je nach Länge und Anzahl der Fettsäuren ergeben sich unterschiedliche Tenside. Die Polarität der Tenside, also ihre Lösungseigenschaften, wird - wie schon erwähnt - anhand des HLB-Werts dargestellt. Es sind daher unterschiedliche Zuckerestergemische erhältlich. Im Zuge dieser Arbeit sollten verschiedene Produkte auf ihre Eignung zur Emulsionsstabilisierung hin getestet und verglichen werden.

Die Saccharoseester, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren „Sucrose Fatty Acid Ester“ der Firma Surfhope™ SE Pharma (Mitsubishi-Chemical Corporation, Japan) mit folgenden Bezeichnungen: D-1803 (HLB-Wert 3), D-1809 (HLB-Wert 9), D-1811 (HLB-Wert 11) und D-1815 (HLB-Wert 15). Die Zahl 18 in der Nomenklatur steht für eine Kohlenstoffkette mit 18 C-Atomen, D gibt die Produktkategorie an (pharmazeutische Qualität). In der vorliegenden Arbeit wurden also unterschiedliche Saccharoseester mit Stearinsäure verwendet.

Der chemische Aufbau von Saccharosestearat ist in Abbildung 5 dargestellt.

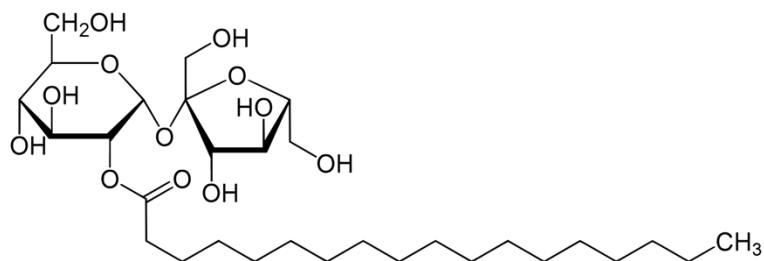


Abb.5: Saccharosestearinsäureester [30]

2.3.3. Kaliumsorbat

Kaliumsorbat (INCI: Potassium Sorbate) ist das Kaliumsalz der Sorbinsäure. Es wird im kosmetischen Bereich als Konservierungsmittel eingesetzt, da es auf der Haut gut verträglich ist [32]. Im Lebensmittelbereich ist es auch als Konservierungsmittel E202 bekannt. Es ist leicht wasserlöslich und geruchsneutral [33]. Die konservierende Wirkung ergibt sich im optimalen pH-Bereich, der zwischen fünf und sechs liegt. Nur in diesem pH-Bereich kann Kaliumsorbat als Sorbinsäure die antimikrobielle Wirkung entfalten. Meistens wird eine Konzentration von ca. 0,01-0,2% von Kaliumsorbat in einer Formulierung eingesetzt. Sorbinsäure kann auch direkt angewendet werden. Der Nachteil ist die geringere Wasserlöslichkeit gegenüber Kaliumsorbat, sowie die Wasserdampfflüchtigkeit [34]. Abbildung 6 zeigt die chemische Struktur von Kaliumsorbat.

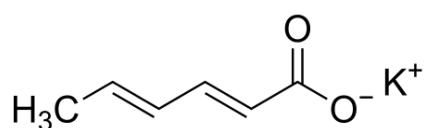


Abb. 6: Kaliumsorbat [33]

In dieser Arbeit wurde als Konservierungsmittel Kaliumsorbat-Granulat „Potassium sorbate purum p.a.“ der Firma Sigma-Aldrich (St.Louis, USA) und Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) verwendet.

2.4. Panax Ginseng in Dermatika und Kosmetika

2.4.1. Herkunft und Pflanze

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Formulierungsentwicklung für die asiatische traditionelle Arzneipflanze *Panax Ginseng*. Im asiatischen Raum seit langer Zeit verbreitet, hat Ginseng im Laufe der letzten Jahrzehnte auch im europäischen Raum an Bekanntheit erlangt. Der *Panax Ginseng* wächst in asiatischen Gebirgslandschaften in Höhenlagen. Die Pflanze erhielt aufgrund der Form ihrer unterirdischen Anteile unter anderem den Trivialnamen „Menschenwurzel“ (Abbildung 7), der auch auf ihren medizinischen Nutzen für die Menschen hinweisen soll [35,36]. Hauptsächlich ist die getrocknete Wurzel des *Panax Ginseng* samt ihren Inhaltsstoffen, den Ginsenosiden, medizinisch von Bedeutung [37].



Abbildung 7: unterirdische Anteile von *Panax Ginseng* [36, abgedruckt mit freundlicher Genehmigung des Hollym Verlags]

Die Pflanze *Panax Ginseng* (chinesisch: Ren shen oder schin-seng) zählt zur Familie der Araliaceae (Efeugewächse) und ist ursprünglich in Asien und Nordamerika beheimatet [1,36]. Der Gattungsname *Panax* wird aus dem Griechischen übersetzt und bedeutet „alles heilend“, abgeleitet von „pan“ (=alles) und „ax, axos“ (=Heilmittel, Heilung) [36,40].

Die botanische Bezeichnung *Panax ginseng* C. A. Meyer wurde 1843 vom deutsch-russischen Wissenschaftler Carl Anton Meyer festgelegt [36,37,38]. Diese Ginseng-Art stammt aus Nordchina und Südkorea [35] und wird auch Koreanischer oder Echter Ginseng genannt [40].

Der koreanische Ginseng (Abbildung 8) ist eine ausdauernde krautige Pflanze mit einer Wuchshöhe bis zu 80 cm. Die Pflanze verfügt über runde Stängel, fünfzählig gefiederte Blätter und einen Dolden-artigen Blütenstand mit 15 bis 30 kleinen grün-weißlichen Blüten und rot-glänzenden runden Beeren [40]. Die Wurzel (Radix Ginseng), die aufgrund ihrer Inhaltsstoffe medizinisch interessant ist, hat im Durchschnitt eine Länge von 20 cm. Sie ist ein Speicherorgan und die Qualität der Arzneidroge wird anhand des zunehmenden Alters gemessen [35].

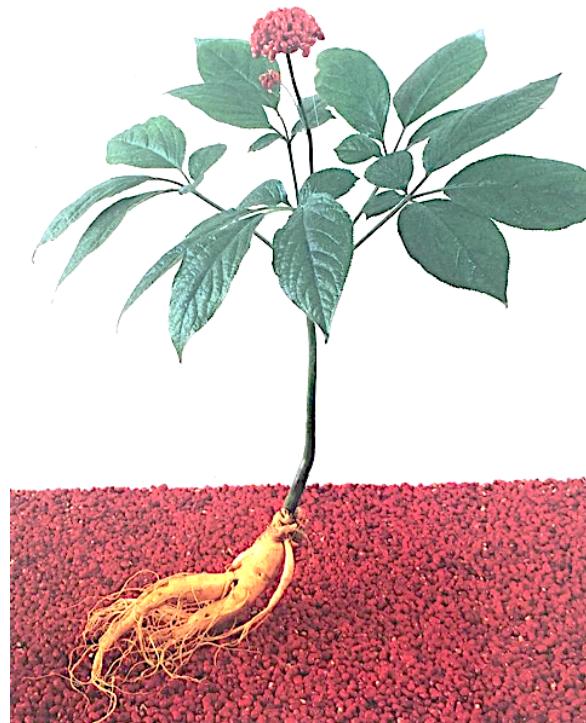


Abbildung 8: *Panax Ginseng* mit roten Beeren [36, abgedruckt mit freundlicher Genehmigung des Hollym Verlags]

2.4.1.1. Ginseng Spezies

In der Botanik sind zahlreiche unterschiedliche Ginseng-Arten bekannt. Die Systematik der Nomenklatur orientiert sich am jeweiligen Anbaugebiet, wie die folgende Liste verdeutlicht [40,41]:

- Panax Ginseng C.A.Meyer* - koreanischer Ginseng
- Panax quinquefolium L.* - nordamerikanischer Ginseng
- Panax notoginseng (Burk) F.H.Chen (Sanchi Ginseng)* - chinesischer Ginseng
- Panax trifolius L. (Dwarf Ginseng)* - Nordostamerika
- Panax pseudoginseng Wall* - Nepal, Himalaya
- Panax japonicus C.A.Meyer (Bamboo Ginseng)* - japanischer Ginseng
- Eleutherococcus senticosus* - sibirischer Ginseng, Taigawurzel
- Panax vietnamesis* - vietnamesischer Ginseng

Die Ginseng-Spezies, die in dieser Arbeit verwendet wurde, ist der koreanische *Panax Ginseng*, wobei hier wiederum die Unterarten 'Roter Ginseng', 'Weißer Ginseng' und 'Schwarzer Ginseng' existieren [42]. Diese Unterarten bezeichnen dieselbe Pflanze, jedoch sind die Verarbeitung der Wurzel und die Anbaudauer jeweils unterschiedlich. Weißer Ginseng besteht aus den gewaschenen, getrockneten und weiterverarbeiteten Ginseng-Wurzeln mit einem Wuchsalter von vier bis sechs Jahren. Roter Ginseng wird hingegen mindestens sechs Jahre lang angebaut, danach bei 100°C für zwei bis drei Stunden bedampft und anschließend bis zu einem Feuchtigkeitsgehalt unter 15% m/m getrocknet [3].

Durch diesen Prozess ergeben sich wesentliche Unterschiede. Aufgrund der Temperaturbehandlung gehen einige Inhaltsstoffe des weißen Ginsengs verloren. Durch den heißen Wasserdampf karamellisiert der Zucker, der in der Ginsengwurzel enthalten ist, und verfärbt sie rot. Dies führt zur Bildung spezieller Ginsenoside (siehe Kapitel 2.4.2) im Vergleich zum weißen Ginseng. Ein Vorteil ist, dass durch die Verdampfung die Ginsengwurzel konserviert wird und so länger haltbar ist. Der weiße Ginseng neigt hingegen zu Schimmelbildung, weswegen er meist vor der weiteren Verarbeitung geschält wird. Dadurch verliert er wichtige Inhaltsstoffe. Die längere Reifezeit des roten Ginsengs erhöht aufgrund der gebildeten Inhaltsstoffe die Qualität des gewonnenen Produkts [3,38].

Schwarzer Ginseng wird, ebenso wie der rote Ginseng, dem schonenden Verdampfungs- und Trocknungsprozess unterzogen, der bioenzymatische Auswirkungen

zeigt. Hier wird der Prozess jedoch nicht nur ein Mal, sondern bis zu neun Mal durchgeführt, wodurch sich Änderungen bei den sekundären Metaboliten der Inhaltsstoffe ergeben [43]. Es wurden unterschiedliche Zusammensetzungen der Inhaltsstoffe, im Speziellen der Ginsenoside und Oligosaccharide, beobachtet. Somit zählt der schwarze Ginseng aufgrund der aufwendigen Herstellung als qualitativ hochwertigstes und daher teuerstes Produkt [43].

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde der rote *Panax Ginseng* als pflanzliche Modelldroge verwendet. Das verwendete pulverförmige Produkt war ein Ginseng-Trockenextrakt (3-4:1, Auszugsmittel: Ethanol 60% (V/V), mit einem Ginsenosidgehalt von 14-16%). Die Firma KGV Korea Ginseng Vertriebs GmbH (Ginseng Pur, 53797 Lohmar, Deutschland) konnte als Kooperationspartner für die vorliegende Arbeit gewonnen werden und stellte den Extrakt für Forschungszwecke dankenswerterweise zur Verfügung.

2.4.2. Aktive Inhaltsstoffe des *Panax Ginseng*

Inhaltsstoffe des Ginsengs sind in vielen Organen der Pflanze u.a. auch in Blättern finden. Die medizinisch verwendeten Inhaltsstoffe befinden sich in den unterirdischen Teilen der Pflanze; den Wurzeln. Ginseng zählt mit seinen Inhaltsstoffen zu den Adaptogenen. Diese Gruppe von Arzneimitteln befähigt den Körper positiv Stresssituationen zu bewältigen [37].

Es sind zahlreiche unterschiedliche Inhaltsstoffe vertreten; daher kann eine allfällige Wirkung selten einer bestimmten Gruppe von Inhaltsstoffen zugeordnet werden [36]. Die meisten pharmakologischen Wirkungen werden den Ginsenosiden zugeschrieben, die zur Familie der Triterpensaponine zählen [37, 41].

2.4.2.1. Triterpensaponine: Ginsenoside

Saponine im Allgemeinen sind Glykoside von Triterpenen, Steroiden oder stickstoffhaltigen Steroiden (Steroidalkaloiden). Ihr Name leitet sich vom lateinischen *Sapo* (Seife) ab, da die Saponine grenzflächenaktiv sind und schäumen [1].

Panax Ginseng enthält eine Gruppe von Saponinen, die Glykoside des Triterpen-Aglykon sind und Ginsenoside genannt werden. Die Biosynthese der Ginsenoside beginnt mit 2,3-Oxidosqualen, welches auch die Vorstufe von Beta-Sitosterol ist, das cholesterinsenkende [44] und prostatotrope [45] Eigenschaften aufweist [41]. Abbildung 9 zeigt den Biosyntheseweg der Ginsenoside.

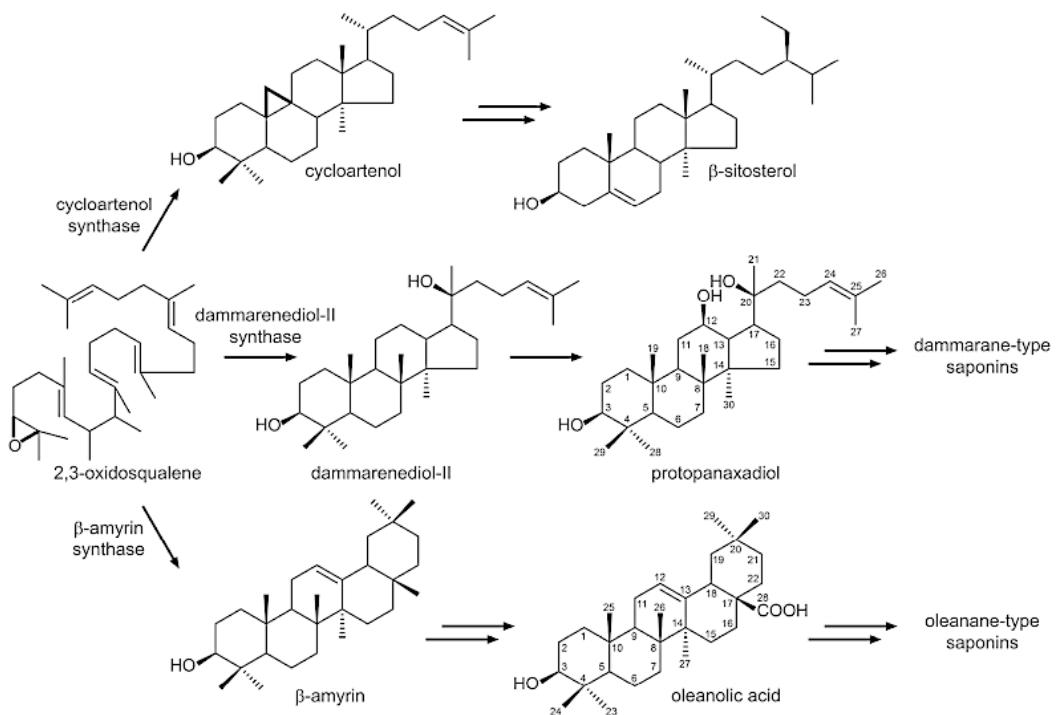


Abbildung 9: Biosyntheseweg der Triterpensaponine in *Panax Ginseng* [41]

Panax Ginseng beinhaltet Triterpensaponine sowohl vom Dammaran- als auch vom Oleanan-Typ. Aglykone des Oleanan-Typ sind chemisch betrachtet pentazyklische Triterpene. Saponine vom Dammaran-Typ zeigen einen tetrazyklischen Aufbau. Zuckerbausteine, die an das Aglykon gebunden sind, können Monodesmoside und Bisdesmoside sein. Monodesmoside sind Aglyka mit Zuckermolekülen in einer Position, Bisdesmoside weisen Zuckermoleküle in zwei Positionen auf.

Die medizinisch relevantesten Ginsenoside sind Dammaran-Typ-Ginsenoside, wie beispielsweise Rb1, Rb2, Re und Rg1. Ginsenoside vom Oleanan-Typ und somit Derivate der Oleanolsäure wie Ro sind sehr selten [41].

Die Nomenklatur der Ginsenoside basiert auf den Rf-Werten der dünnenschichtchromatographischen Auftrennung. Die Polarität nimmt von der Bezeichnung mit dem Buchstaben „a“ nach „h“ hin ab. Anhand der Zuckermoleküle ist dies ebenfalls zu erkennen [46]. Das „R“ in der Benennung steht für Radix.

Die Aglyka der Ginsenoside, die durch Abspaltung der Zucker frei werden, sind das Protopanaxadiol und Protopanaxatriol. Durch Säurehydrolyse entstehen Panaxadiol und Panaxatriol. In Abbildung 10 sind die chemischen Grundstrukturen und

die unterschiedlichen Seitengruppen der Ginsenoside dargestellt, sowie Panaxadiol- und Panaxatriol-Derivate. Die meisten Ginsenoside sind bisdesmosidisch. Monodesmosidische Ginsenoside sind beispielsweise Rf und Rg2 [46].

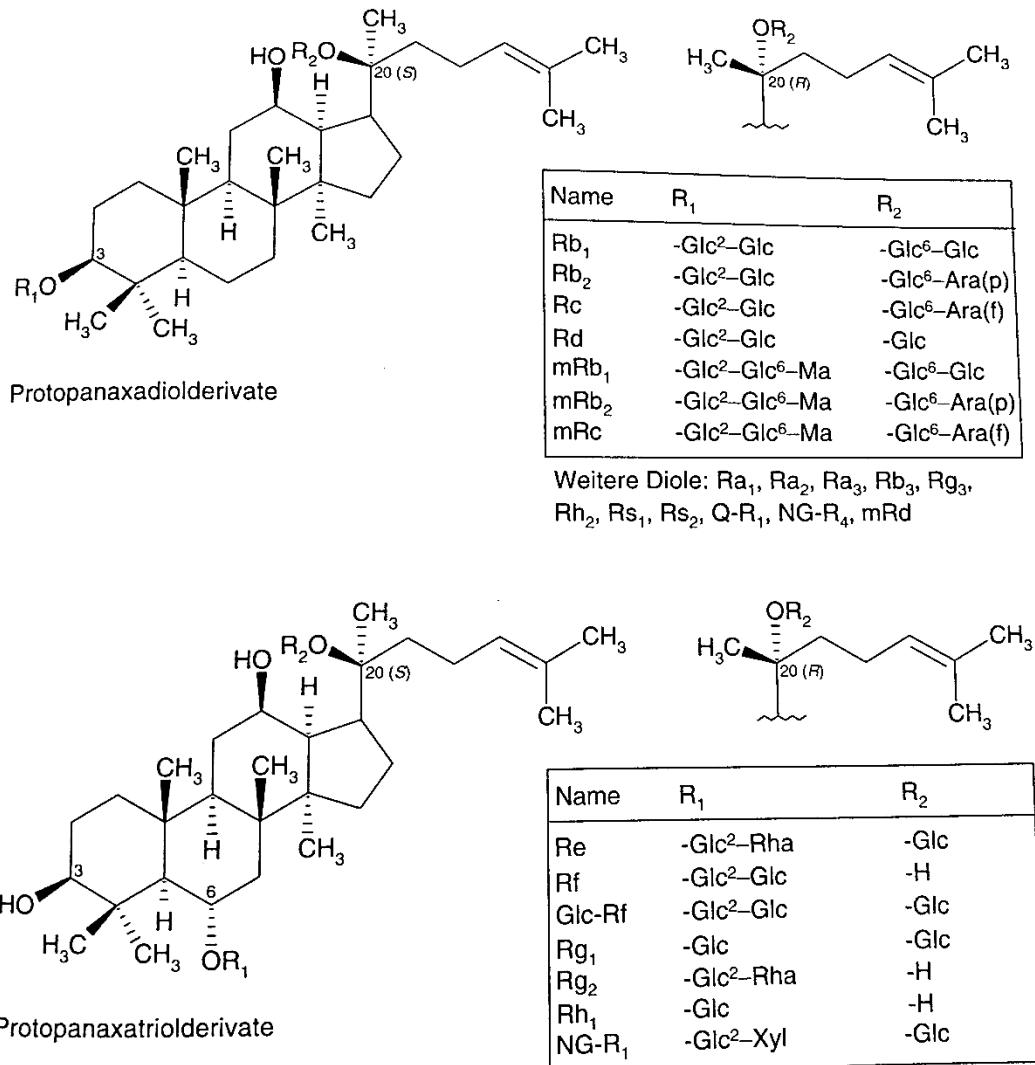


Abbildung 10: chemische Struktur der Ginsenoside [46]

Bei den Protopanaxadiol- Ginsenosiden sind die Zuckermoleküle an die C-3 und C-20-Hydroxygruppe-Gruppe gebunden. Bei Protopanaxatriol-Derivaten sind die Monosaccharide an die C-6 und C-20-Atome gebunden.

2.4.2.2. Polysaccharide

Polysaccharide sind Mehrfachzucker. Sie werden auch als Glykane bezeichnet und sind Kohlenhydrate, bei denen mehrere Monosaccharide (Einfachzucker) über glykosidische Bindungen verbunden sind.

Die Polysaccharide in *Panax Ginseng* sind vor allem die sogenannten Panaxane (A-U) und Ginsenane (PA, PB, S-IA und S-IIA). Panaxane sind Peptidoglykane, zusammengelagerte Makromoleküle aus Polysacchariden und Aminosäuren [46].

Bei den Panaxanen unterscheidet man saure (azide) und neutrale Polysaccharide, je nachdem ob sie Uronsäure enthalten. Neben Galacturonsäure und Glucuronsäure, aus der Gruppe der Uronsäuren, sind weitere in *Panax Ginseng* enthaltene Monosaccharide, Teile der Polysaccharide, Glucose, Galaktose, Arabinose, Rhamnose, Fucose und Mannose. Den aziden Polysacchariden, die vor allem im roten Ginseng zu finden sind, werden anti-inflammatorische und immunstimulierende Eigenschaften zugeschrieben [47].

2.4.2.3. Polyacetylene

Polyacetylene, ungesättigte Alkohole, sind lipophile C17-Acetylenderivate [46]. Beispiele dieser Substanzklasse, die in *Panax Ginseng* enthalten sind, sind Panaxynol (Falcarinol), Panaxytriol, Panaxydol und die Ginsenoyne A-E [52]. Das auch in Karotten enthaltene Falcarindiol zeigte in Studien cytotoxische, anticanzerogene und anti-inflammatoryische Eigenschaften [47,48]. In Abbildung 11 sind die chemischen Strukturen der drei wichtigsten Polyacetylene dargestellt.

Während man früher annahm, dass allein die Ginsenoside die wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe von *Panax Ginseng* darstellen, ist heute durch viele Studien belegt, dass sowohl die Polysaccharide als auch die Polyacetylene zur Gesamtwirkung beitragen [36,46].

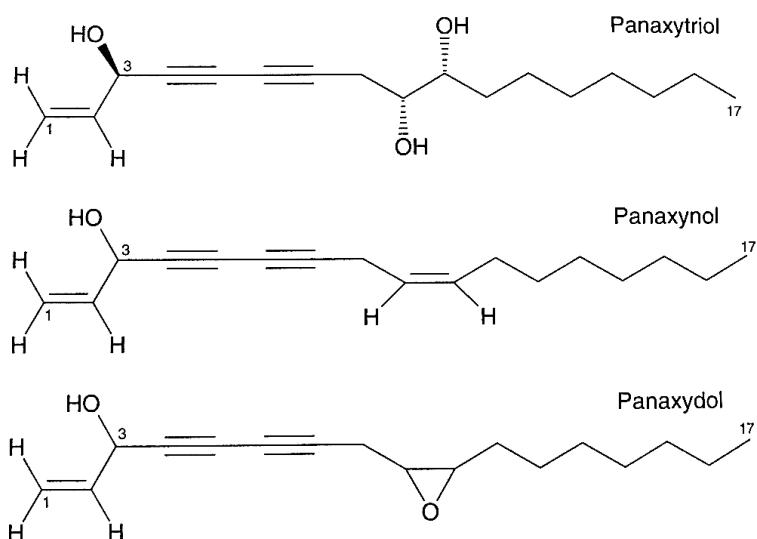


Abbildung 11: chemische Struktur der Polyacetylene [46]

2.4.2.4. Ätherische Öle und weitere Komponenten

Neben den bisher genannten Inhaltsstoffen enthält *Panax Ginseng* auch ätherische Öle, deren Hauptkomponenten Mono- und Sesquiterpene sind. Die häufigsten Monoterpen, die sich durch ein Grundgerüst aus zehn Kohlenstoffatomen auszeichnen, sind α - und β -Pinen. Die häufigsten Sesquiterpene, die ein Grundgerüst von 15 Kohlenstoffatomen aufweisen, sind β -Elemen, Eremophilen sowie Panaxene, Panaginsene, Panasinsene, Ginsinsene und Ginsenol [46, 51].

In Abbildung 12 sind einige Beispiele dargestellt.

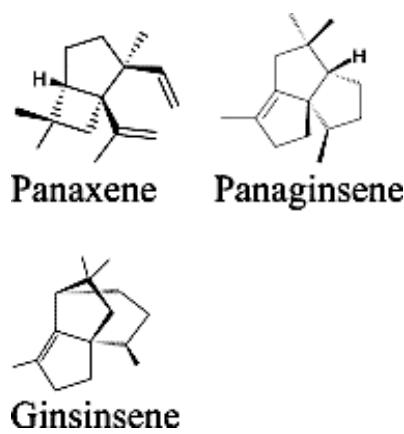


Abbildung 12: Sesquiterpene aus *Panax Ginseng* [51]

Weitere Komponenten, die in *Panax Ginseng* enthalten sind, sind laut Literatur Flavonoide wie Kaempferol, Alkaloide wie Harman und Fumarin, Phenole wie Salicylsäure sowie Aminosäuren, weitere pflanzliche Polysaccharide wie Stärke und Polyuronide Pektine, Fettsäuren, Peptide, Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamin B und C [35, 46, 51].

2.4.3. Wirkung und Toxizität

Die Anwendung des Ginsengs ist seit langem für medizinische Zwecke von Nutzen. Mittlerweile konnten wissenschaftliche Untersuchungen die Anwendung und Wirkung des *Panax Ginseng* durch zahlreiche klinische Studien bestätigen [37].

Da die wissenschaftliche Untersuchung der verschiedenen Ginseng-Arten ein sehr umfangreiches Themengebiet darstellt und sich Wirkung und Nutzen der Unterarten unterscheiden, wird im Rahmen dieser Arbeit lediglich auf die Anwendung des roten Ginsengs eingegangen.

Der rote Ginseng hat sich in Studien als pharmakologisch wirkungsvoller und nebenwirkungsärmer Ginseng als der weiße Ginseng bewiesen [48]. Der rote Ginseng wurde bereits in zahlreichen klinischen Untersuchungen evaluiert. Roter *Panax Ginseng* hat demnach einen positiven Einfluss auf Herz-Kreislauferkrankungen [53], Diabetes [55], Hypertonie [56] und Stress. Die Inhaltsstoffe des roten Ginsengs zeigen anti-tumorale [54], anti-inflammatorische und immunmodulierende Eigenschaften [57].

Die derzeitige Datenlage in Bezug auf Erhöhung der mentalen Leistungsfähigkeit und kognitiven Ausdauer durch *Panax Ginseng* zeigt positive Ergebnisse. Durch die Studie von Reay et al. [37] konnte nachgewiesen werden, dass Ginseng positive Auswirkung auf den Glucosemetabolismus hat und die Glucosekonzentration im Blut senken kann. Sechs andere Studien konnten positive Resultate in Bezug von Ginseng auf akute Atemwegserkrankungen, sowie chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) und chronische Bronchitis erlangen [37].

Auch die adaptogenen Eigenschaften des Ginsengs sind zu nennen, die ihm im Volksmund den Trivialnamen „Kraftwurzel“ eingebracht haben [35]. Ginsenoside wurden bereits in zahlreichen wissenschaftlichen Studien auf ihre pharmakologische Wirkung sowie ihre Toxizität hin untersucht. Sie zeigen sehr schwache Hämolysewirkung und sind sogar in hohen Dosen toxikologisch unbedenklich [46]. Als

Nebenwirkung des *Panax Ginseng* wird meist von unerwünschten Ereignissen im Magen-Darm-Trakt berichtet. Im Speziellen erfasste man Durchfall, Nausea und Magenprobleme, wobei diese Ereignisse als harmlos bewertet wurden und selten auftraten. Damit erwies sich *Panax Ginseng* als sicheres, toxikologisch unbedenkliches, nebenwirkungsarmes Therapeutikum für die hier erwähnten Anwendungen [37].

2.4.4. Anwendung

Ginseng wird peroral als Tonikum und Geriatrikum verwendet. Diese Zubereitungen sollen kräftigend wirken, indem sie den Körper widerstandsfähiger gegen Stress und andere äußere Einflüsse machen. Die Inhaltsstoffe des Ginsengs sollen bei Müdigkeit helfen und Menschen körperlich und geistig leistungsfähiger machen, ohne eine Abhängigkeit zu erzeugen. Diese leistungssteigernden Effekte wurden in präklinischen Studien mit Ratten und Mäusen nachgewiesen; auch eine bessere Merkfähigkeit wurde gezeigt. Ginseng wird daher auch in Produkten für Sportler, zur Konzentrationssteigerung sowie zur Immunstärkung, bei Erschöpfung und als Begleittherapie bei Lebererkrankungen eingesetzt.

Es gibt sehr viele Publikationen über *Panax Ginseng* und seine Wirkung [35, 36, 39]. In dieser Arbeit liegt der Fokus allein auf der weniger verbreiteten topischen Anwendung.

2.4.5. Ginseng in der Kosmetik

Wie bereits in Kapitel 2.1.1. erwähnt, spielen die freien Radikale, deren Theorie vom Wissenschaftler Harman 1956 aufgestellt wurde, eine wichtige Rolle für das Photo-Aging, also die lichtbedingte Hautalterung [58, 59].

Als Schutzmechanismus gegen extrinsische Einflussfaktoren hat die gesunde Haut ein antioxidatives Netzwerk. Durch freie Radikale, die beispielsweise durch UV-Strahlung entstehen, wird diese Barriere der Haut zerstört. Dieser oxidative Stress - ausgelöst durch freie Radikale - ist für den Alterungsprozess der Haut ein wesentlicher Faktor. Freie Radikale, die Proteine, DNA und Lipide der Haut angreifen, werden bei gesunder Haut durch die Enzyme Katalase und Superoxiddismutase abgebaut. Studien mit UV-Bestrahlung, die eine Abnahme der Katalase-Enzyme bewirkten, verdeutlichen die Bedeutung von oxidativem Stress beim Alterungsprozess [58,

59]. Aufgrund potenzieller antioxidativer Eigenschaften erhofft man, dass *Panax Ginseng* sich in diesem Bereich als wirksam erweisen könnte. Darin liegt die zunehmende Beliebtheit von *Panax Ginseng* im kosmetischen Bereich begründet [3]. Tatsächlich konnten in Studien Belege für den „Photo-Aging“-Schutz der Hautzellen durch Rg3 aus dem roten Ginseng gegenüber UVB-Strahlung gezeigt werden [3, 60].

Das Ginsenosid Rb3 vom Protopanaxadiol-Typ kann die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), welche durch UVB-Strahlen ausgelöst wird, unterdrücken und so die Superoxiddismutase vor Abbau schützen. Koreanischer roter Ginseng kann auch durch Reduktion von oxidativem Stress bei Hyperpigmentierung antimelanogen wirken [3].

Auch Extrakte und Metaboliten des roten Ginsengs können sich positiv auf die Keratinozyten-Funktion auswirken. Studien zum Thema Zelltod zeigten, dass roter Ginseng einen guten Ansatz für die Reparatur von DNA-Schädigungen darstellt [61]. Hong et al. konnten eine positive Wirkung des koreanischen roten Ginsengs bei chronischer atopischer Dermatitis zeigen; ein anti-inflammatoryischer Effekt konnte durch die Suppression von TNF- α in humanen Keratinozyten gezeigt werden [62].

Abgesehen vom Einsatzbereich Photo-Aging und Zelltod ist ein wichtiger Einsatzbereich der Themenkreis Hautelastizität und Faltenbildung. Einige Untersuchungen zeigen, dass Ginsenosid Rb1 aus dem roten *Panax Ginseng* positive Effekte auf die Kollagensynthese haben kann. Dadurch reduziert Rb1 die Faltenbildung und erhöht die Hautelastizität. Studien zeigten, dass koreanischer roter Ginseng den Bruch von Kollagenfasern beheben und die Kollagensynthese steigern kann [3, 63].

Kim et al. konnten in einer Studie mit einem eigens hergestellten „Korean Red Ginseng Water Extract“ die Expression von Matrix-Metalloproteinasen inhibieren [65]. Diese Kollagenasen, die durch UV-Strahlung entstehen, sind für den Abbau von Kollagen und Elastin in humaner Haut verantwortlich. Die Kollagensynthese bei natürlich gealterter Haut nimmt mit den Lebensjahren ab, ein Anstieg dieser Kollagenasen tritt ein [65]. Mit dem „Korean Red Ginseng Gel“ konnten die Hautfeuchtigkeit und Elastizität verbessert werden [65].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass antioxidative Enzyme wie Superoxiddismutase, Katalase und Gluthathion-Peroxidase durch oxidativen Stress in ihrer

Funktion beeinträchtigt werden. Dadurch können sie die Organe nicht mehr ausreichend schützen und diverse Erkrankungen entstehen. Aufgrund seiner Inhaltsstoffe wird in diesem Bereich roter koreanischer Ginseng seit vielen Jahren als traditionelles Arzneimittel im asiatischen Raum (Korea, China, Japan) bei hepatotoxischen und immunologischen Erkrankungen und Krebs genutzt. Die Inhaltsstoffe sowie ihre Metaboliten im Körper erhöhen die Aktivität der Superoxiddismutase und Katalase [64].

Im kosmetischen Bereich wird roter *Panax Ginseng* bereits in vielen Produkten eingesetzt. Aufgrund der positiven Wirkung des Ginsengs auf körpereigene Enzyme, die für den Abbau von Kollagen verantwortlich sind, ist dies ein vielversprechender Ansatzpunkt für Anti-Aging-Produkte [65].

3. Methoden und Materialien

3.1. Hochdruckhomogenisation

Hochdruckhomogenisation ist ein besonders intensives Mischverfahren für den Erhalt ultrafeiner Partikel oder Tröpfchen einer Suspension oder Emulsion. Diese Dispergiermethode wird beispielsweise bei der Herstellung von Emulsionen verwendet. Der Homogenisierungseffekt entsteht durch Hoch-/Niederdruckzyklen, die zu Phänomenen wie Kavitation, Aufprall- und Schereffekten führen und so eine Zerkleinerung der Tröpfchen bis in den Nanometerbereich ermöglichen. Der Homogenisierungsdruck kann individuell eingestellt werden [65,66].

Für diese Arbeit wurde der HDH (Hochdruckhomogenisator) *Emulsiflex C3* (Avestin, Mannheim, Deutschland) verwendet. Das Gerät ist in Abbildung 13 dargestellt.

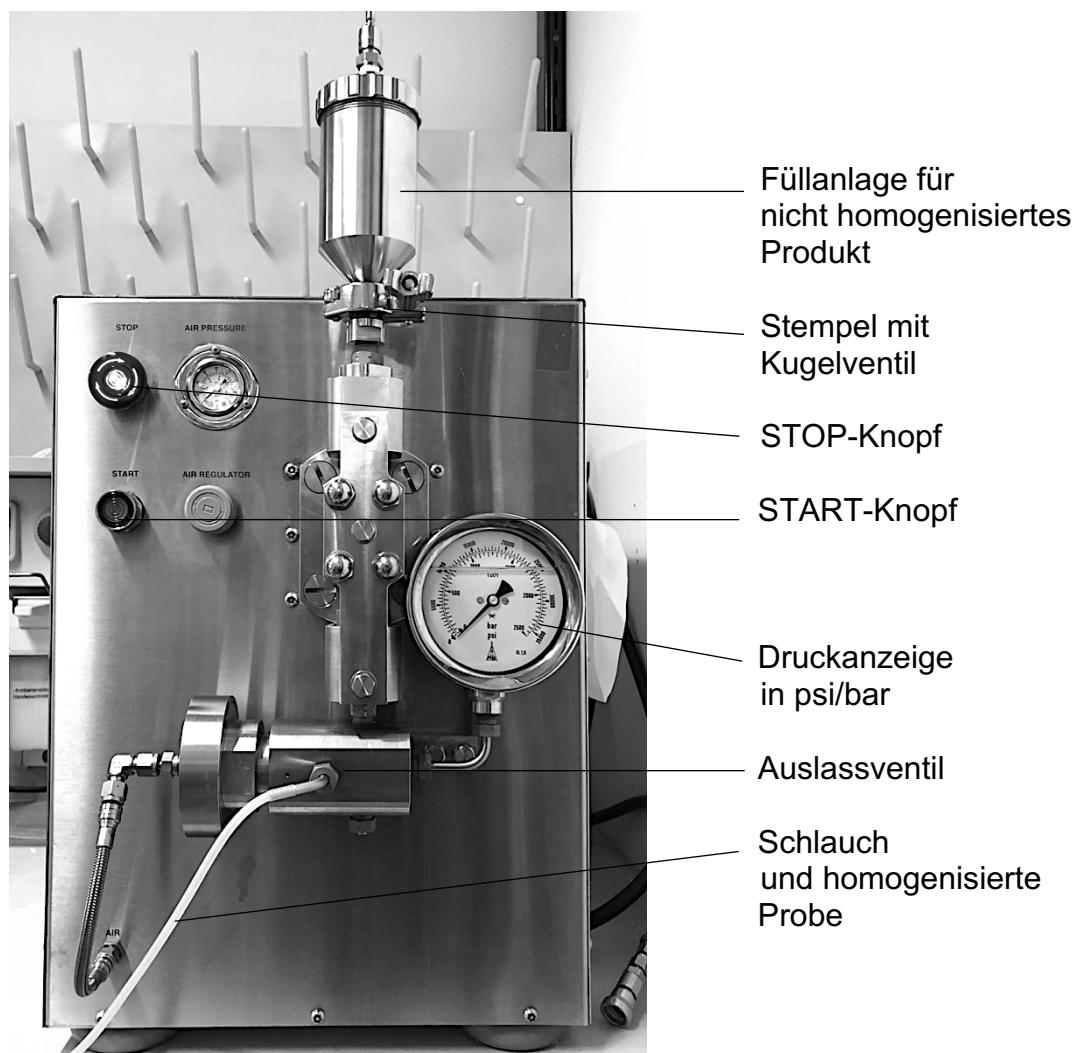


Abbildung 13: HDH, Emulsiflex C-3, Avestin

3.2. Dynamische Lichtstreuung und elektrophoretische Lichtstreuung

Die dynamische Laserstreuulicht-Technik (Photonenkorrelationsspektroskopie, Dynamische Lichtstreuung, DLS) sowie die Laser Doppler-Elektrophorese (Elektrophoretische Lichtstreuung, ELS) sind zwei Streulicht-Techniken, die zur Charakterisierung und Stabilitätsprüfung von Nanoemulsionen eingesetzt werden. Man kann damit unter anderem die durchschnittliche Partikelgröße als hydrodynamischen Durchmesser und den Polydispersitätsindex bzw. das Zetapotential messen.

Die DLS-Technik wird zur Messung der Partikelgröße angewendet. Ein Laser wird durch die Küvette mit meistens verdünnter Probe geschickt und an der Oberfläche von Partikeln gestreut. Die Teilchen bewegen sich aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung in Abhängigkeit von ihrer Größe unterschiedlich schnell und ergeben ein spezifisches Ablenkungsmuster, das in seiner Intensität schwankt. Die Fluktuationen im Streulicht werden mittels Autokorrelationsfunktion analysiert; auf diese Weise werden Erkenntnisse über den mittleren hydrodynamischen Durchmesser der Partikel erhalten, die das Beugungsmuster erzeugen [21].

Die ELS-Technik, auch Laser Doppler Anemometrie genannt, wendet man zur Messung der elektrophoretischen Mobilität von Partikeln oder Tröpfchen in Dispersion an. Hierfür wird die verdünnte Probe in spezielle Messzellen gefüllt, die eine Wanderung zwischen zwei Elektroden ermöglichen. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes kommt es zur Bewegung der geladenen Teilchen; durch Bestrahlung mit einem Laser unter Nutzung des Doppler-Effekts wird die elektrophoretische Mobilität der Teilchen ermittelt. Diese Ergebnisse werden dann in Werte für das Zetapotential konvertiert [67].

3.2.1. Hydrodynamischer Durchmesser

Wie bereits erwähnt, wird die durchschnittliche Partikelgröße als hydrodynamischer Durchmesser mit der DLS-Technik gemessen. Dieser Parameter ist für die Stabilitätsprüfung von Nanoemulsionen relevant. Während der Messung erhält man einen Peak als Mittelwert, der als durchschnittliche Partikelgröße definiert wird. Messungen zum hydrodynamischen Durchmesser werden meist auf längere Dauer durchgeführt und verglichen, um Änderungen wie Partikelwachstum durch Aggregation festzustellen. Eine stabile Formulierung zeichnet sich durch konstante Messwerte

der durchschnittlichen Teilchengröße und einen Polydispersitätsindex <0,2 über einen gewissen Zeitraum aus [21, 23]. Der Partikelgrößendurchschnitt (*particle diameter*) wird hier in der Arbeit in Nanometer nm dargestellt.

3.2.2. Zetapotential

Das Zetapotential dient, wie der hydrodynamische Durchmesser, als Maß für die Stabilität von dispersen Systemen. Es ist das elektrische Potential an der Abscherschicht von bewegenden Partikeln in einer Emulsion bzw. Dispersion. Dispergierte Partikel besitzen meist eine negative Oberflächenladung (=Nernst-Potential; Potential an der Teilchenoberfläche). An der Partikoloberfläche lagern sich positive Gegenionen (beispielsweise H⁺) aus dem umgebenden Wasser an und lassen die Partikeln neutral erscheinen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wird der Partikel in Bewegung gesetzt. Durch Reibung wird ein Teil der Ionen an der Oberfläche abgeschert. Die Partikel sind nicht mehr elektrisch neutral, sondern besitzen ein Potential. Dieses ist das Zetapotential an der Abschergrenze und es beschreibt die elektrische Stabilisierung durch die Oberflächenladung der Teilchen [68].

Die physikalische Stabilität von dispersen Systemen nimmt mit der Höhe des Zetapotentials, im negativen wie auch im positiven Zahlenbereich, zu. Das bedeutet, je höher der Absolutbetrag des gemessenen Zetapotentials, desto stabiler ist die Formulierung. Die erhöhten Werte zeigen eine Verstärkung der Abstoßungskräfte zwischen den Partikeln, sodass eine Agglomeration verhindert werden kann. Partikel mit gleicher Ladung stoßen sich ab [23, 68].

Um hohe Empfindlichkeit beim Messen zu erhalten, sollten Verdünnungen von Flüssigkeiten mit möglichst geringer Elektrolytkonzentration wie beispielsweise destilliertes Wasser oder „Leitfähigkeitswasser“, welches mit physiologischer NaCl-Lösung eingestellt wird, verwendet werden. Das Zetapotential, das eine Spannungsdifferenz darstellt, wird in Millivolt mV angegeben. Die Abstoßungsenergie zwischen zwei Partikeln wird als Zetapotential mit Werten von +80 bis -100 mV dargestellt. O/W-Emulsionen zeigen idealerweise Werte von ca. -30 mV bis -60 mV [68].

In dieser Arbeit wurde für die regelmäßige Messung der genannten Parameter das Gerät Zetasizer® Nano (Malvern Instruments Panalytical Ltd., United Kingdom) eingesetzt.

3.2.3. Polydispersitätsindex

Der Polydispersitätsindex (PDI) ist ebenso wie der hydrodynamische Durchmesser wichtig für die Qualität der Formulierung. Der PDI beschreibt die Breite der Tröpfchengrößeverteilung. Ein PDI-Wert von 0 zeigt eine theoretisch perfekte monodisperse Verteilung an, ein PDI über 0 eine polydisperse Partikelverteilung in der Emulsion. Ein PDI-Wert unter 0,2 weist auf eine enge Tröpfchengrößeverteilung hin. Ein PDI nahe 1,0 weist auf eine hochgradig polydisperse Probe hin. Das Erreichen eines PDI-Wertes unter 0,1 bei Nanoemulsionen ist häufig nur mittels Hochdruckhomogenisation möglich [23]. Ein geringer hydrodynamischer Durchmesser, ein hoher Absolutbetrag des Zetapotenzials und ein kleiner Polydispersitätsindex sind gute Merkmale für die formulierte Nanoemulsion [22]. Bleiben der hydrodynamische Durchmesser und der PDI einer Formulierung längerfristig stabil, so kann man eine gute physikalische Stabilität der Probe daraus ableiten [21].

3.3. Rheologie

3.3.1. Fließkurven

Die Rheologie beschreibt die Lehre von den Fließeigenschaften und dem Deformationsverhalten von Substanzen. Sie ist für sämtliche Dermatika ein äußerst wichtiger Teil der Produktentwicklung, da die Fließeigenschaften viele Vorgänge bei der Herstellung, Lagerung, Verpackung und Anwendung beeinflussen. Somit zählt die Analyse der Fließeigenschaften auch zu den wichtigsten Aspekten einer Charakterisierung und Stabilitätsprüfung.

Die Analyse der Fließeigenschaften beruht auf folgenden Prinzipien: Die Formulierungen werden einer äußeren Kraft ausgesetzt und setzen einen charakteristischen Widerstand entgegen. Diesen Widerstand bezeichnet man auch als dynamische Viskosität η (= "Eta").

Der Name der einwirkenden Kraft F wird als Schubspannung oder Scherkraft τ (sprich: „tau“, engl. shear stress) bezeichnet und ist umso größer, je zäher die Probe ist. Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Schergeschwindigkeit D [5, 70]. Andere Bezeichnungen für die Schergeschwindigkeit sind auch Scherfälle oder Scherrate $\dot{\gamma}$ (sprich: „gamma-punkt“, engl. shear rate) [69, 70].

Aus diesen drei Parametern ergibt sich mathematisch folgender Zusammenhang:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

Die dynamische Viskosität η wird in Pascal-Sekunde [Pa*s] oder Milipascal-Sekunde [mPa*s], die Schubspannung τ in Pascal [Pa] und die Schergeschwindigkeit D in $[s^{-1}]$ gemessen. Die Proben werden nach ihrem Fließverhalten verschiedenen rheologischen Modellen zugeordnet und unterscheiden sich anhand ihrer Rheogramme [69, 70]. Abbildung 14 zeigt die wichtigsten Arten des Fließens mit den dazugehörigen charakteristischen Rheogrammen [69].

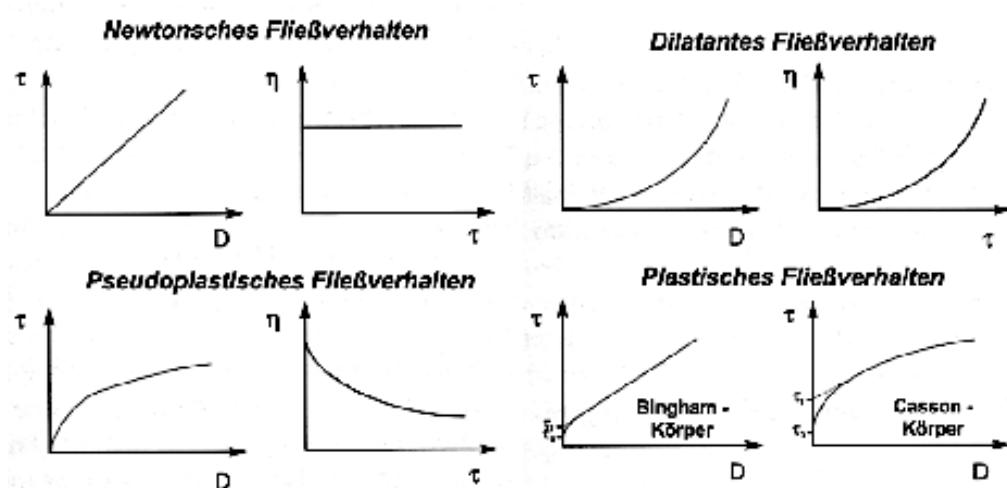


Abbildung 14: Fließverhalten und dazugehörige Rheogramme [69]

Newton'sche Flüssigkeiten sind idealviskose Systeme und sind meistens reine Lösungsmittel wie Wasser oder Ethanol. Die Viskosität ist bei diesen Systemen unabhängig von Scherrate und Schubspannung konstant.

Dilatante Systeme zeigen eine Fließverfestigung und sind manchmal bei Pasten mit einem hohen Feststoffanteil zu beobachten.

Beim pseudoplastischen Fließverhalten findet ab Einwirkung der Schubkraft eine Scherverdünnung bzw. eine Viskositätsabnahme statt. Dieses Rheogramm ist oft bei Suspensionen zu sehen.

Das plastische Fließverhalten, welches meistens bei halbfesten Emulsionen zu beobachten ist, ist bezüglich der Viskosität ähnlich der pseudoplastischen Charakteristik. Der Unterschied ist, dass beim plastischen Fließverhalten die Fließfähigkeit

und die Abnahme der Viskosität erst ab einer bestimmten Schubspannung, dem Fließpunkt, einsetzt [5, 69]. Wenn sich eine konstante Fließfähigkeit zeigt, wie bei idealviskosen Flüssigkeiten spricht man von Bingham-Körper. Falls nicht, dann bezeichnet man diese Formulierung als Casson-Körper. Cremen, Salben, Gele und die meisten Emulsionen zeigen Casson-Charakteristik [5, 69]. Sehr fluide Nanoemulsionen weisen häufig ein scherverdünnendes Fließverhalten auf.

3.3.2. Oszillationsversuche

Viskoelastisches Fließverhalten

Rheologische Untersuchungen in Bezug auf das viskoelastische Fließverhalten werden mittels Oszillationsversuchen dargestellt. Man bezeichnet diese Testmethode auch als dynamisch-mechanische Analyse.

Die wichtigsten Parameter für diese Arbeit umfassen die Begriffe Speichermodul und Verlustmodul, welche für die untersuchten Proben einmalig ermittelt wurden [70].

Das Speichermodul G' (engl. storage modulus), gemessen in Pascal [Pa], steht für die gespeicherte Deformationsenergie der Probe während dem Scherprozess. Diese Energie dient für die Rückdeformation nach dem Belastungszyklus und zeigt den elastischen Anteil der Probe.

Das Verlustmodul G'' (engl. loss modulus), ebenfalls in Pascal [Pa] gemessen, ist die verlorene Deformationsenergie während dem Scherprozess. Bei der Oszillation bzw. Reibung wird diese Energie verbraucht und an die Umgebung abgegeben. Das zeigt den viskosen Anteil der Probe.

Der Verlustfaktor ist dementsprechend der Unterschied zwischen Speicher- und Verlustmodul [70].

Hysterese

Manche Proben wie beispielsweise mit Casson-Körper Fließkurven weisen Thixotropie auf. Durch den Scherprozess werden Strukturen teilweise zerstört. Es dauert eine gewisse Zeit, bis sie wieder aufgebaut sind. Diesen Auf- und Abbauprozess der Kurven im Rheogramm bezeichnet man als Hysterese [71]. Zeigt die Probe nach der Scherung irreversibel veränderte Fließeigenschaften, dann spricht man von Rheopexie [70].

Amplitude

Der Amplitudentest oder Amplituden-Sweep (engl. amplitude sweep) beschreibt eine Veränderung der Amplitude bei konstanter Frequenz während der Messung. Dieser Test ist wichtig, um irreversible Strukturveränderung in der Probe darzustellen. Die Werte sollen im linear-viskoelastischen Bereich LVA liegen, bei der Verlust- und Speichermodul einen konstanten Plateauwert aufweisen [70].

Frequenz

Der Frequenztest oder Frequenz-Sweep (engl. frequency sweep) beschreibt die Änderung der Frequenz bei konstanter Amplitude. Hier wird das zeitabhängige Deformationsverhalten untersucht. Eine hohe Frequenz steht für schnelle Messungen des Kurzzeit-Verhaltens, eine niedrige Frequenz steht für das Langzeit-Verhalten von Proben und Belastung mit langsamer Bewegung [70].

3.3.3. Rheometer

Rheologische Untersuchen werden mit einem Rotationsviskosimeter oder Rheometer durchgeführt. Hier unterscheidet man, je nach Viskositätseigenschaften der Probe, folgende Systeme:

- Zylinder-Becher-Vorrichtung (für flüssige, sehr niedrigviskose Proben)
- Platte-Kegel-Vorrichtung (bspw. für halbfeste Zubereitungen wie Cremen, Emulsionen, Suspensionen)
- Platte-Platte-Vorrichtung (bspw. geeignet für Pasten, Gele)

Das Platte-Kegel-System, welches für die Arbeit verwendet wurde, besteht aus einer stationären unteren Platte. Auf diese wird die Probe aufgetragen. Oberhalb ist der rotierende Kegel, der einen bestimmten Durchmesser und Spaltwinkel zur Platte hat.

Bei rheologischen Messungen sind äußere Einflüsse wie Temperatur, Art und Dauer der Probenbelastung zu beachten [70].

In dieser Arbeit wurde für die rheologischen Untersuchungen der Rheometer „Modular Compact Rheometer MCR 302“ (Anton Paar GmbH, Graz, Austria) verwendet. Der Messkegel für die Vorversuche war *CP25-2 mit Part.No. 79039*. Für die weiteren Messungen und für den Vergleich im Vorversuch der Kegel *CP50-1 mit Part.No. 79040* (alle Anton Paar GmbH, Austria). Abbildung 15 zeigt das verwendete Rheometer.

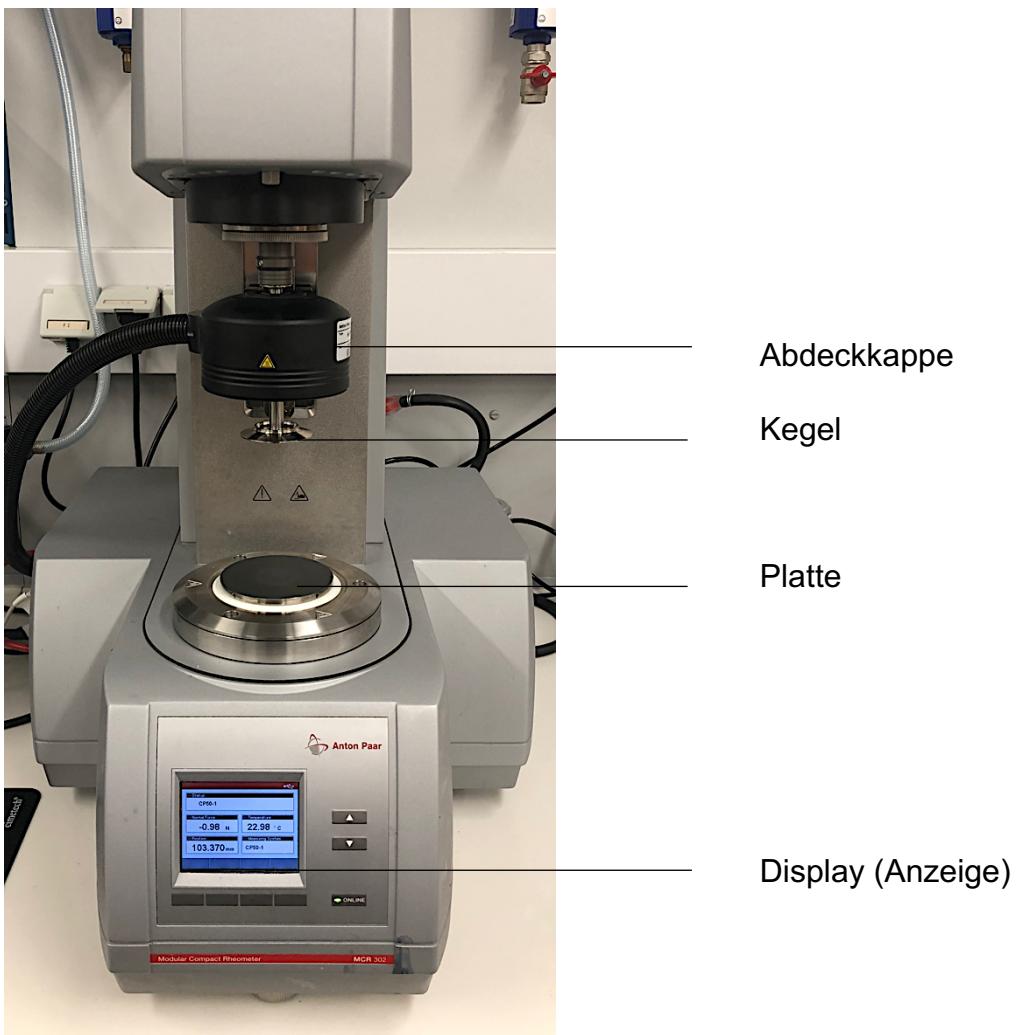


Abbildung 15: Rheometer Modular Compact Rheometer MCR 302 (Anton Paar, Austria) und eingesetzter Kegel

3.4. pH- Messung

Der pH-Wert beschreibt die Konzentration der Wasserstoff-Ionen in wässriger Lösung. Für die Zuordnung des Wertes wird eine pH-Skala verwendet. Die Messwerte bewegen sich im pH-Skalenbereich von 0-14. Ein pH von sieben beschreibt eine neutrale Lösung. pH-Werte <7 zeigen saure und >7 basische Eigenschaften. Die pH-Messung ist ebenfalls ein wichtiger Parameter bei Charakterisierung und Stabilitätsprüfung von dermalen Formulierungen. Der pH-Wert der Haut beträgt 4,2 - 5,6 und dient als „Säureschutzmantel“; der saure Hydrolipidfilm sollte nicht durch zu alkalische Produkte gestört werden [5, 72].

Der pH-Meter, der in dieser Arbeit verwendet wurde, ist das Tischmessgerät Seven-Compact™ (Mettler Toledo GmbH).

3.5. Diffusionszellen (Franz-Zellen)

Die Franz-Zelle ist eine Methode zur Untersuchung der in-vitro Arzneistoffpermeation. Die Glaszelle besteht aus zwei Kompartimenten. Im Donorkompartiment befindet sich die Probe, in der Akzeptorkammer befindet sich ein Akzeptormedium, beispielsweise eine Pufferlösung. Die beiden Kompartimente trennt man mit natürlichen oder synthetischen Membranen, welche die Hautbarriere darstellen. Als natürliche Membranen kann man sowohl Menschen- als auch Schweinehäute verwenden. Das Ergebnis stellt einen Vorversuch zur Einschätzung des Penetrationspotentials der Probe dar [73]. In Abbildung 16 ist der Aufbau einer Franz-Zelle schematisch dargestellt.

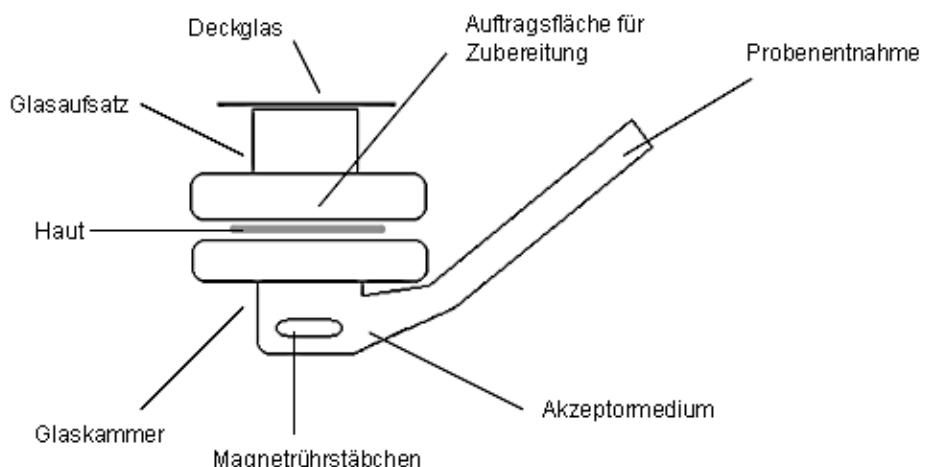


Abbildung 16: Aufbau einer Franz-Diffusionszelle [74]

Die Quantifizierung der zu untersuchenden Wirkstoffe aus der Probe in dieser Arbeit erfolgt mittels HPLC.

3.6. HPLC

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) ist eine analytische Untersuchungsmethode im chemischen Bereich. Sie dient zur Identifizierung, Quantifizierung und Auftrennung von Substanzen. Die Analyse und Quantifizierung der Ginsenoside in dieser Arbeit wurden durch die Division für Pharmakognosie der Universität Wien (Department für Pharmazeuti-

sche Wissenschaften, Division for Pharmacognosy, Phytochemistry and Biodiscovery - Analytical Analysis of Natural Products) unter Aufsicht von Dr. Ammar Tahir, MSc, durchgeführt.

Das verwendete Gerät war ein UHPLC (ultra-HPLC) von *Dionex Ultimate 3000*. Als Säule wurde *Phenomenex™ Omega™ C18, 120 Å, 2,1 x 150mm* verwendet. Die Detektion wurde mit einem Massendetektor *LTQ-XL (linear ion trap mass spectrometer)* von *Thermo Fisher Scientific* durchgeführt.

4. Experimenteller Teil und Ergebnisse

4.1. Herstellung von Nanoemulsionen

4.1.1. Vorversuche zur Herstellungsmethode und Evaluierung

Zu Beginn der Arbeit wurden Vorversuche durchgeführt, um die Produktionsbedingungen für Nanoemulsionen basierend auf Zuckerestern zu optimieren. Zwei unterschiedliche Produktionsvarianten wurden verglichen.

Für die Formulierung wurden die in *Kapitel 2.3.* beschriebenen Hilfsstoffe verwendet. Die Zusammensetzung der Nanoemulsion Typ A wurde für die Evaluierung der Herstellungsmethode gewählt. Die Rezeptur sah wie folgt aus:

Basisrezeptur Nanoemulsion Typ A mit Zuckertensid D1809

<u>Emulsion Typ A:</u>	Zusammensetzung in % m/m	2 Ansätze à 20 g
MCT	20 %	4,0 g
D1809 (HLB 9)	3 %	0,6 g
Kaliumsorbat	0,1 %	0,02 g
Aqua dest.	ad 100 %	15,38 g

Herstellung Variante 1:

Variante 1 bestand aus der Herstellung einer groben Vor-Emulsion durch langes Rühren auf der beheizten Magnetrührplatte¹. Die Probe wurde mit 530 rpm (rounds per minute) oder U/min (Umdrehungen pro Minute) auf 60°C für 60 Minuten erwärmt.

Die Wasserphase, die neben Aqua destillata das Zuckertensid und Kaliumsorbat beinhaltete, wurde in einem Becherglas mit Magnetrührstäbchen separat gerührt. Die Ölphase mit den mittelkettigen Triglyceriden wurde ebenso in einem Becherglas daneben erhitzt und alle Bechergläser wurden mit Parafilm® bedeckt, um Siedeverzug zu verhindern. Beide Phasen wurden zeitgleich auf 60°C erwärmt. Es dauerte ungefähr 15 Minuten, bis die Komponenten in der hydrophilen Phase gelöst waren.

¹ Magnetrührplatte Heidolph MR 3001 K

Als die Substanzen in der Wasserphase gelöst waren, vereinte man die beiden Phasen und rührte 60 Minuten lang.

Herstellung Variante 2:

Variante 2 bestand aus der Herstellung einer groben Vor-Emulsion durch kürzeres Rühren auf der beheizten Magnetrührplatte. Ebenso mit 530 rpm (Umdrehungen pro Minute) wurde bei 60°C für 15 Minuten gerührt. Wie bei Variante 1 wurden auch hier die beiden Phasen separat erwärmt. Nach 15 Minuten waren die Komponenten der Wasserphase gelöst. Beide Phasen wurden vereint und hier 15 Minuten gemeinsam gerührt.

Anschließend wurde mit einem Rotor-Stator-Labormixer² vier Minuten lang bei 2500 U/min (Umdrehungen pro Minute) vorhomogenisiert und erneut auf 60°C unter Rühren erhitzt. Das erneute Erhitzen war hierbei besonders wichtig, da die Emulsion aufgrund der Quellfähigkeit der verwendeten Zuckerester ansonsten eine halbfeste Konsistenz anzunehmen begann. Dies hätte ein Verarbeiten im Hochdruckhomogenisator unmöglich gemacht. Erneutes Erhitzen und Rühren für ca. 10 Minuten versetzte die Formulierung wieder in eine fluide Konsistenz für die weitere Verarbeitung.

Hochdruckhomogenisation

Als nächstes wurde der Hochdruckhomogenisator³ durch Spülen mit Ethanol und danach mit destilliertem Wasser gereinigt und auf Betriebstemperatur gebracht. Die beiden Proben wurden im Anschluss an das Vorhomogenisieren mittels Hochdruckhomogenisation verarbeitet.

Während der Herstellung der ersten beiden Nanoemulsionen wurden vorab und während der Verarbeitung alle zwei Minuten Proben von 200 µl gezogen. Dabei wurden folgende Parameter gewählt: Druck von 1000 bar, Homogenisationsdauer 10 Minuten.

² UltraTurrax Omni 5000 International

³ Emulsiflex C3, Avestin, Kanada (siehe Kapitel 3.1)

Zetasizer

Für die Vorversuche wurden die gezogenen Proben im Verhältnis 1:100 (50 µl Probe + 5 ml Verdünnungsmedium, mittels Eppendorf®-Pipette) mit 0,01 mM NaCl-Lösung verdünnt. Danach wurde mittels Zetasizer⁴ vermessen. Die Parameter, die dabei bestimmt wurden, waren Zetapotential, PDI und hydrodynamischer Durchmesser (siehe Kapitel 3.2.). Es zeigte sich, dass bei diesen ersten Messungen die Leitfähigkeit der verdünnten Proben stark schwankte. Entsprechend waren die Ergebnisse der Zetapotential-Messungen wenig aussagekräftig. Die Werte lagen etwa zwischen -25 und -55 mV. Der Einfluss der Homogenisationsdauer auf die mittlere Tröpfchengröße der Emulsionen wurde im Zuge der ersten Versuche analysiert. Ein Homogenisations-Zyklus dauerte etwa 15 Sekunden. Probe 1 und Probe 2, die mit verschiedenen Herstellungsvarianten vorhomogenisiert worden waren, waren letztendlich gleichermaßen zufriedenstellend in Bezug auf die wichtigen Formulierungsparameter. Beide Methoden waren daher für die Erzeugung von Nanoemulsionen geeignet. Die hergestellten Proben wiesen über eine Homogenisierdauer von 10 Minuten (40 Zyklen) hinweg eine äußerst vergleichbare durchschnittliche Partikelgröße auf (Abbildung 17).

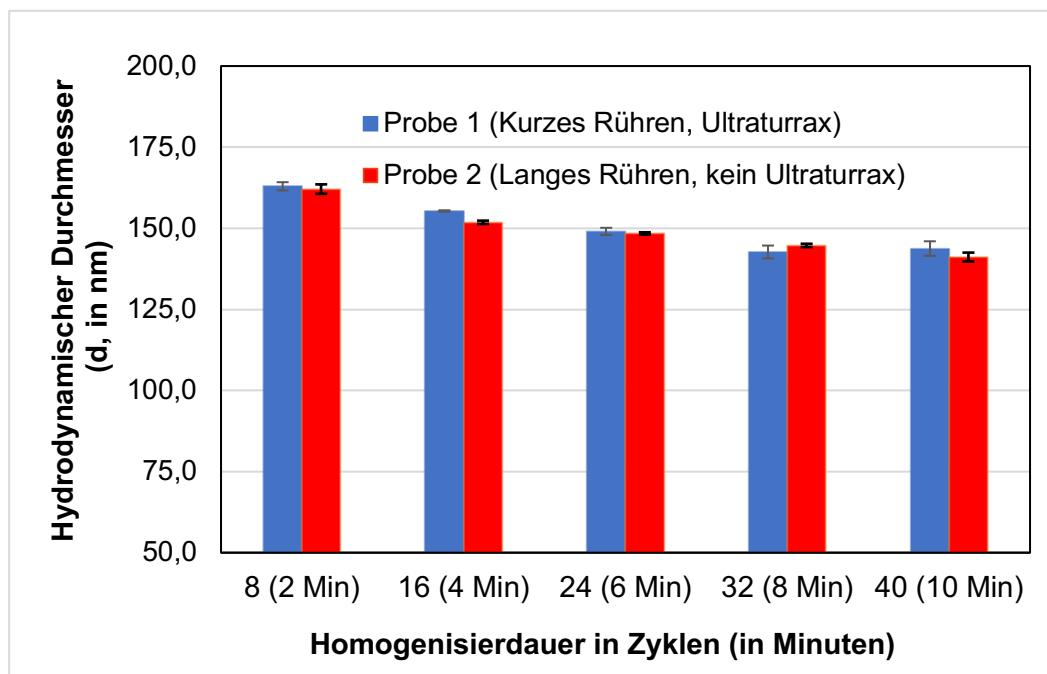


Abbildung 17: Einfluss der Vorhomogenisationsart und der Homogenisationsdauer auf eine Zuckerester-Nanoemulsion mit 3% Sucrosestearat D1809

⁴ Zetasizer Nano ZS, Malvern, GB (siehe Kapitel 3.2)

Die Werte wurden an einer Probe in dreifacher Ausführung ermittelt (n=1, Werte = Mittelwert von drei Einzelmessungen mit Standardabweichung (Stabw)).

Die ermittelten Polydispersitätsindices (PDIs) waren für die beiden Proben mit Werten rund um 0,1 ebenfalls weitgehend vergleichbar. Das Zetapotential schwankte in diesem ersten Versuch stark (Werte zwischen -27 und -55 mV), was mit einer variablen Leitfähigkeit der verdünnten Messlösungen erklärbar war. Daher war hier keine Aussage möglich. Es wurden weitere Versuche durchgeführt.

Auf Basis der Erkenntnisse der Tröpfchengrößenmessung und dem Zeitaufwand wurde für weitere Herstellungen die Variante 2 mit dem Ultraturrax gewählt. Diese wurde im Laufe der Arbeit entsprechend der Erfahrungswerte angepasst.

4.1.2. Vorversuche zur Zetapotentialbestimmung & Evaluierung

Um konstante Bedingungen zu schaffen, sollte eine gleichbleibende Leitfähigkeit des Lösungsmittels gegeben sein [23]. Aufgrund der schwankenden Werte des Zetapotentials bei den Vorversuchen zur Herstellungsmethode wurden nun unterschiedliche Verdünnungsreihen mit Aqua destillata und 0,01 mM NaCl-Lösung hergestellt. Man wählte für die Untersuchungen die Zusammensetzung der Nanoemulsion Typ A mit dem 3% Zuckertensid D1809 als Probe. Es wurden drei Ansätze (n=3) von der NE Typ A nach der vorher evaluierten Variante 2 hergestellt. Die Wasserphase mit den entsprechenden Komponenten wurde 15-20 Minuten lang gerührt, danach mit der Ölphase vereint und weitere 10 Minuten bei 60°C und 530 U/min gerührt. Anschließend wurden die Proben vier Minuten bei 2500 U/min mit dem Ultraturrax behandelt. Folgende Verdünnungsstufen wurden hergestellt:

Aqua destillata	1:2	2,5 ml Probe	2,5 ml Aqua destil.
	1:10	0,5 ml Probe	4,5 ml Aqua destil.
	1:100	50 µl Probe	4,95 ml Aqua destil.
	1:500	10 µl Probe	4,90 ml Aqua destil.
	1:1000	5 µl Probe	4,995 ml Aqua destil.
		10 µl Probe	9,99 ml Aqua destil.

NaCl	1:2	2,5 ml Probe	2,5 ml NaCl 0,01mM
	1:10	0,5 ml Probe	4,5 ml NaCl 0,01mM
	1:100	50 µl Probe	4,95 ml NaCl 0,01mM
	1:500	10 µl Probe	4,90 ml NaCl 0,01mM
	1:1000	5 µl Probe	4,995 ml NaCl 0,01mM
		10 µl Probe	9,99 ml NaCl 0,01mM

In Abbildung 18a und 18b sind die Verdünnungen dargestellt:



Abb. 18a: Verdünnungsreihe Aqua destillata

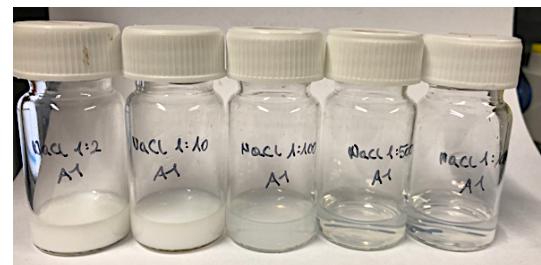


Abb.18b: Verdünnungsreihe NaCl-Lösung

Für die Messung wurden im entsprechenden Verdünnungsverhältnis insgesamt 5,0 ml Probe hergestellt. Diese wurden mit der Eppendorf®-Pipette (Abbildung 19a) in Schraubengefäße pipettiert.

Für die Partikelgrößenmessung entnahm man 1,0 ml in die Küvette (Abbildung 19b) und für die Zetapotentialmessung 1,0 ml luftblasenfrei in die Zetaküvette mit Stöpsel (Abbildung 19c).



Abb.19a: Eppendorf®- Pipette



Abb.19b: Glasküvette [75]



Abb.19c: Zetazelle [76]

Die Evaluierung brachte folgende Ergebnisse (Abbildungen 20-28):

Die Verdünnungsstufe 1:2 mit Aqua destillata ergab sehr hohe PDI-Werte. Wie in Kapitel 3.2.3. bereits erläutert, stellen PDI-Werte die Breite der Tröpfchengröße-Verteilung dar. Bei der geringen Verdünnung von 1:2 kommt es zu einer Mehrfachstreuung des Laserlichts an den gemessenen Tropfen in Dispersion; das Messergebnis ist daher nicht aussagekräftig. Auch bei der Verdünnungsstufe 1:10 mit destillata war die Probenkonzentration noch zu hoch und daher der gemessene PDI sehr groß.

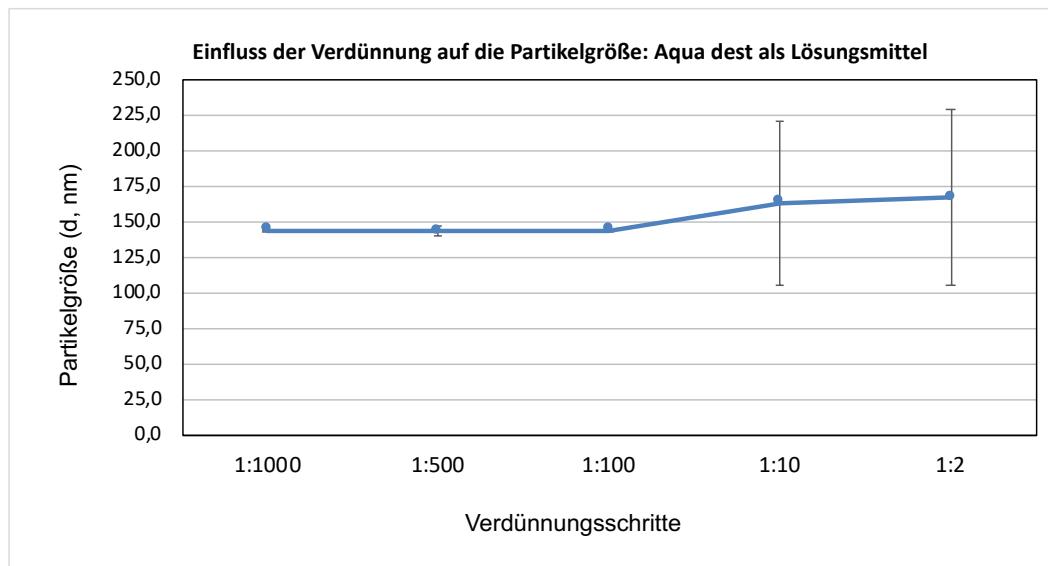


Abbildung 20: Zusammenhang zwischen Verdünnungsstufe und gemessener Partikelgröße (Aqua dest., NE Typ A)

Abbildung 20 zeigt, dass ab der Verdünnungsstufe 1:100 eine relativ gleichbleibende durchschnittliche Partikelgröße gemessen wurde. Diese Erkenntnis in Bezug auf die Verdünnung ist auch in allen anschließenden Abbildungen für die gemessenen Parameter sichtbar (Abb. 21-23).

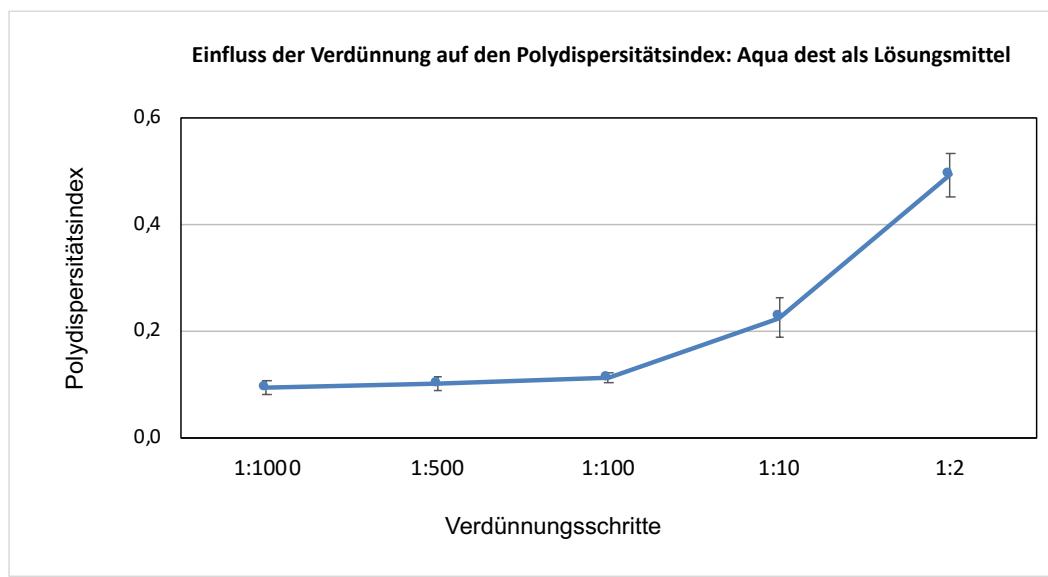


Abbildung 21: Zusammenhang zwischen Verdünnungsstufe und gemessenem PDI (Aqua dest., NE Typ A)

Abbildung 21 zeigt, dass ab der Verdünnungsstufe 1:10 zufriedenstellende PDI-Werte unter 0,3 gemessen wurden. Ab der Verdünnungsstufe 1:100 liegt der PDI konstant unter 0,2.

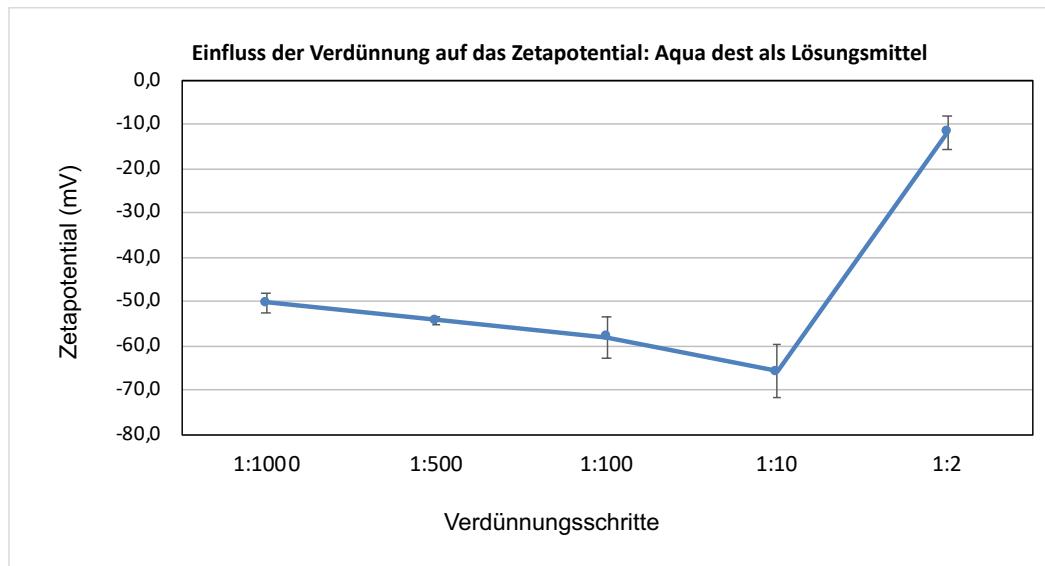


Abbildung 22: Zusammenhang zwischen Verdünnungsstufe und gemessenem Zetapotential (Aqua dest., NE Typ A)

Abbildung 22 zeigt die Zetapotential-Messergebnisse in mV in Bezug auf dieselbe Verdünnungsreihe. Auch hier weichen die Messergebnisse bei zu konzentrierter Probe stark ab. Interessanterweise sind die Zetapotential-Werte ab der Verdünnung 1:100 weniger konstant. Dies ist dadurch erklärbar, dass sich die Ionenstärke und damit die Leitfähigkeit bei unterschiedlicher Verdünnung weiterhin ändert. Das gemessene Zetapotential ist daher immer auch von der verwendeten Verdünnung abhängig. Es ist dadurch klar, dass eine exakt reproduzierbare Verdünnung bei langfristigen ZP-Messungen sehr wichtig ist.

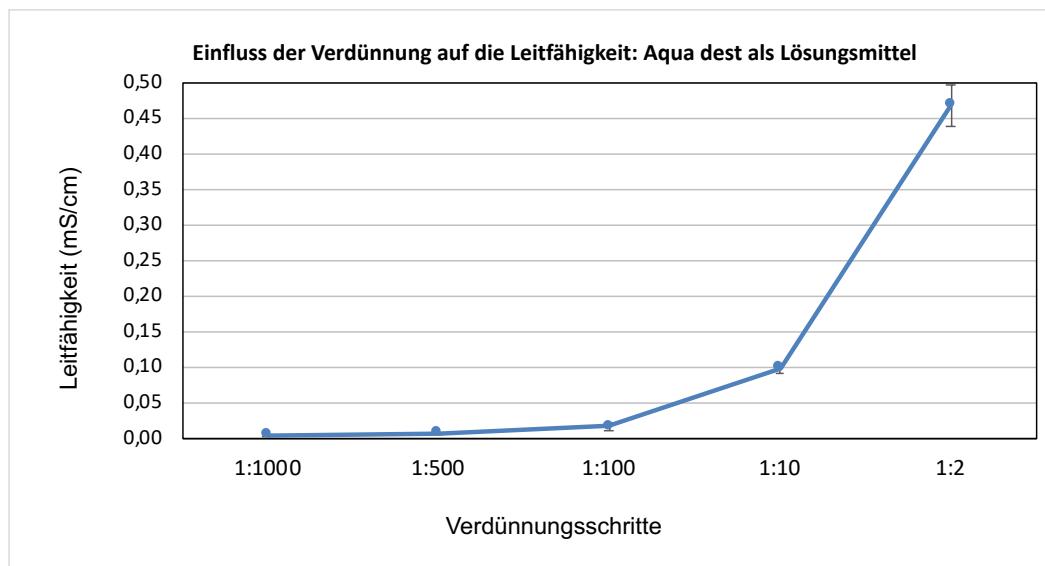


Abbildung 23: Zusammenhang zwischen Verdünnungsstufe und gemessener Leitfähigkeit (Aqua dest., NE Typ A)

In Abbildung 23 ist klar zu sehen, dass die Leitfähigkeit der Messlösungen sich auch im Bereich der starken Verdünnungen weiterhin leicht unterscheidet, wenn auch nicht so stark wie im konzentrierteren Bereich.

Zum Vergleich wurde dieselbe Messreihe analog mit NaCl-Lösung durchgeführt; die Ergebnisse sind in den Abbildungen 24-28 zu sehen.

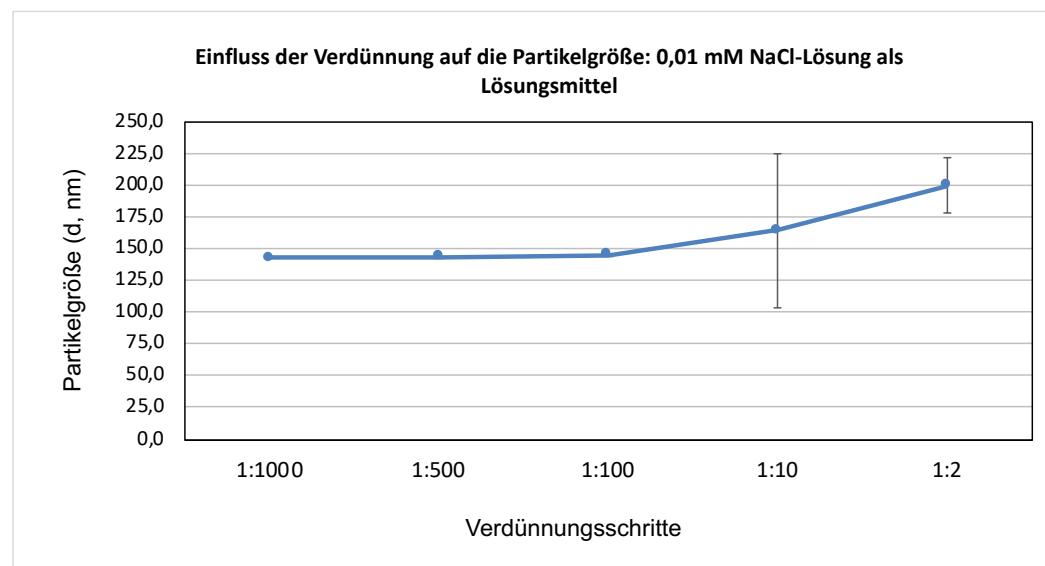


Abbildung 24: Zusammenhang zwischen Verdünnungsstufe und gemessener Partikelgröße (NaCl-Lösung, NE Typ A)

Abbildung 24 zeigt die Messergebnisse des hydrodynamischen Durchmessers in Nanometer in Bezug auf die Verdünnungsstufen. Auch hier ist zu sehen, dass zu konzentrierte Messlösungen zu Mehrfachstreuung und damit zu falschen Partikelgrößenangaben führen. Dieselbe Tendenz ist beim PDI zu sehen (Abb. 25).

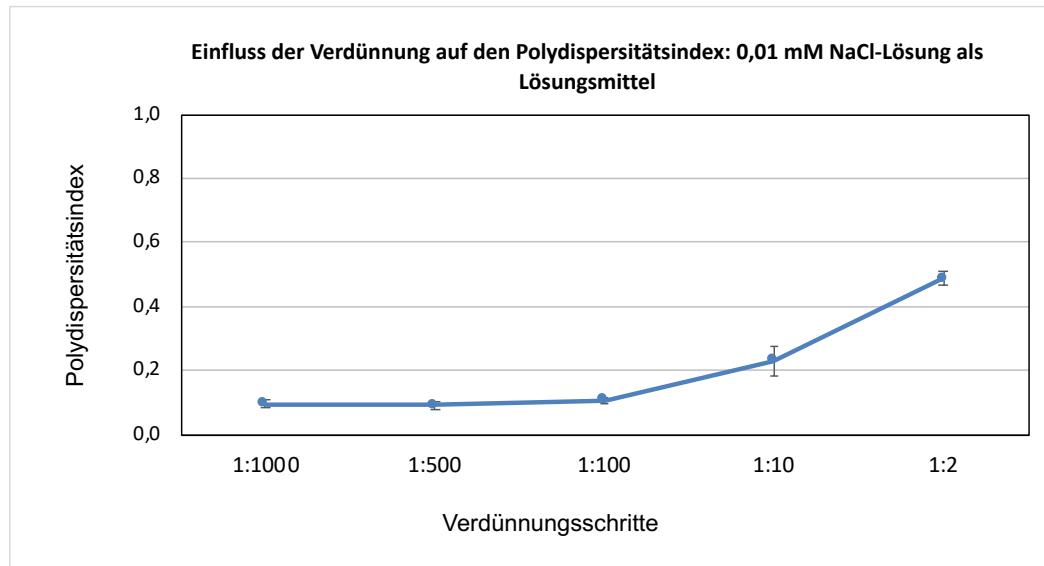


Abbildung 25: Zusammenhang zwischen Verdünnungsstufe und gemessenem PDI (NaCl-Lösung, NE Typ A)

Auch die Messergebnisse der Zetapotential-Messung mit NaCl-Lösung entsprechen den mit Aqua destillata beobachteten Trends (Abb. 26).

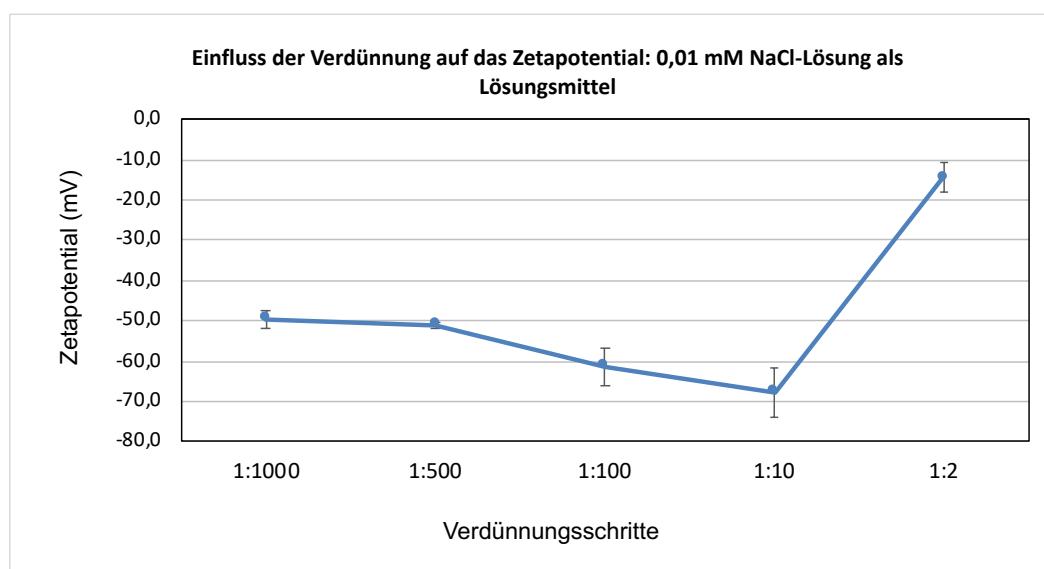


Abbildung 26: Zusammenhang zwischen Verdünnungsstufe und gemessenem Zetapotential (NaCl-Lösung, NE Typ A)

Die Beurteilung der jeweiligen Messqualität wird in der Messsoftware über das Tool „Expert advice“ angezeigt. Um die besten Messparameter für die Zetapotentialmessung zu finden, wurde diese Beurteilung ebenfalls berücksichtigt. In Abbildung 27 ist zu sehen, dass bei der Messung des Zetapotentials der Probe mit dem Verdünnungsverhältnis 1:500 mit NaCl-Lösung ein äußerst scharf begrenzter, klarer Peak auftritt. Dies spricht für eine gute Messqualität.

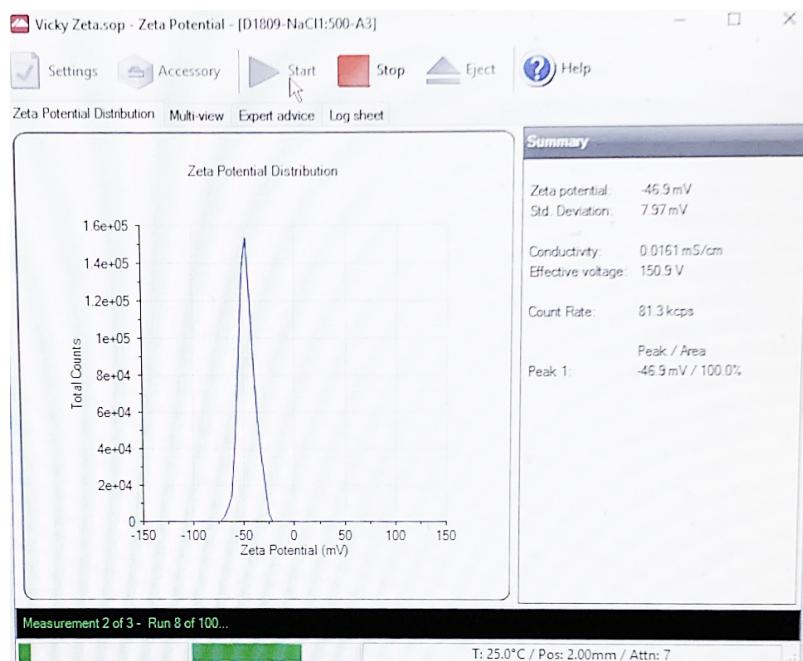


Abbildung 27: Expert Advice bei der Zetapotentialmessung
(Verdünnung 1:500 mit NaCl-Lösung, NE Typ A)

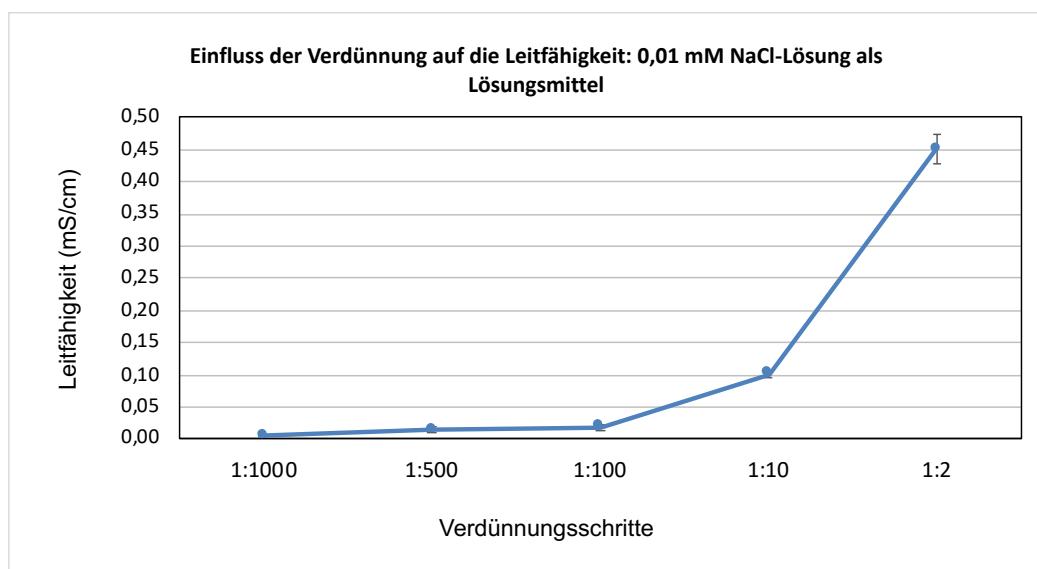


Abbildung 28: Zusammenhang zwischen Verdünnungsstufe und gemessener Leitfähigkeit (NaCl-Lösung, NE Typ A)

Die besten Peaks und Ergebnisse ergaben die Verdünnungsstufen 1:100, 1:500 und 1:1000 sowohl mit Aqua destillata als auch mit 0,01mM NaCl-Lösung. Diese Verdünnungsverhältnisse ergaben bei den Messungen der Proben einheitliche Ergebniswerte. Eine konstante Leitfähigkeit mit einem Zielwert von 0,05 mS/cm wie in der Literatur empfohlen [77] konnte ebenfalls bei diesen Verdünnungen beobachtet werden.

Auf Basis der oben genannten Ergebnisse der Vorversuche wurde ein einheitliches Messprotokoll für die Charakterisierung und Stabilitätsuntersuchung der geplanten Formulierungen beschlossen. Sämtliche weitere Messungen wurden in der Verdünnungsstufe 1:200 mit 0,01 mM NaCl-Lösung durchgeführt.

4.1.3. Charakterisierung und Evaluierung der Nanoemulsionen

Nachdem die grundlegende Herstellungsmethode der Zuckester-basierten Nanoemulsionen evaluiert und optimiert worden war, wurden verschiedene Rezepturen hergestellt, um den Einfluss unterschiedlicher Tensidmischungen auf das Endprodukt zu vergleichen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Zuckestertermischungen mit verschiedener Hydrophilie/Lipophilie-Balance bzw. verschiedenem HLB-Wert ausgewählt. Die Ölphase bestand stets aus mittelkettigen Triglyceriden, die Wasserphase aus destilliertem Wasser mit Kaliumsorbat als Konservierungsmittel. Die Saccharoseester als Tenside wurden während der Herstellung zur passenden Phase gemischt. Die Löslichkeit und damit die Art der Einarbeitung richtete sich hierbei nach dem HLB-Wert. Es wurden vier verschiedene Formulierungen hergestellt und charakterisiert. Pro Formulierungstyp wurden drei Ansätze nach Herstellungsmethode Variante 2 (*Kapitel 4.1.1.*) hergestellt. Die Zusammensetzung der Formulierungen A bis D ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Emulsionstypen und ihre Zusammensetzung

<u>Emulsion Typ A:</u>	Zusammensetzung in % m/m	3 Ansätze à 20gr
MCT	20 %	4,0 gr
D1809 (HLB 9)	3 %	0,6 gr
Kaliumsorbitat	0,1 %	0,02 gr
Aqua ad	100 %	15,38 gr
<u>Emulsion Typ B:</u>	Zusammensetzung in % m/m	3 Ansätze à 20gr
MCT	20 %	4,0 gr
D1809 (HLB 9)	1,5 %	0,3 gr
D1811 (HLB 11)	1,5 %	0,3 gr
Kaliumsorbitat	0,1 %	0,02 gr
Aqua ad	100 %	15,38 gr
<u>Emulsion Typ C:</u>	Zusammensetzung in % m/m	3 Ansätze à 20gr
MCT	20 %	4,0 gr
D1809 (HLB 9)	1,5 %	0,3 gr
D1815 (HLB 15)	1,5 %	0,3 gr
Kaliumsorbitat	0,1 %	0,02 gr
Aqua ad	100 %	15,38 gr
<u>Emulsion Typ D:</u>	Zusammensetzung in % m/m	3 Ansätze à 20gr
MCT	20 %	4,0 gr
D1803 (HLB 3)	1,5 %	0,3 gr
D1815 (HLB 15)	1,5 %	0,3 gr
Kaliumsorbitat	0,1 %	0,02 gr
Aqua ad	100 %	15,38 gr

Die Herstellung erfolgte wie im Folgenden beschrieben: Bei den Proben A, B und D wurde die Wasserphase 15-20 Minuten lang unter Erwärmen gerührt, bis keine sichtbaren Partikel mehr zu sehen waren. Danach wurde die Wasserphase mit der Ölphase bei gleicher Temperatur vereint und es wurde weitere 10 Minuten bei 60°C und 530 U/min gerührt. Anschließend wurde vier Minuten bei 2500 U/min mit dem Ultraturrax vorhomogenisiert. Der Ansatz betrug stets 20,0 g, um eine praktikable Füllmenge für den Hochdruckhomogenisator zu gewährleisten. Zudem sollten im weiteren Studienverlauf längerfristig Proben gezogen werden, um Vergleichs- und Stabilitätsdaten zu erheben. Nach der Vorhomogenisation wurde der Hochdruckhomogenisator durch Reinigungszyklen mit Wasser und 70% v/v Ethanol innerhalb von 4 bis 5 Vorzyklen auf Betriebstemperatur gebracht (leichte Erwärmung, um ein

Erstarren der Probe im Gerät zu verhindern). Die Proben wurden anschließend innerhalb von 20 Zyklen mittels 1000 bar Druck zu einer Nanoemulsion homogenisiert.

Im Zuge der Herstellung zeigte sich, dass Formulierung C problematische Fließeigenschaften aufwies, die das Verarbeiten erschwerten. Beim Abkühlen nach der Ultraturrax-Behandlung kam es stets zu einer Gelierung bzw. Eindickung, sodass der Homogenisationsprozess zwei Mal durchgeführt werden musste. Bei Formulierung C wurden daher zu Vergleichszwecken folgende Proben hergestellt: Probe C1, die teilweise homogenisiert wurde, bis Gelierung eintrat; Probe C2, die komplett nach der obigen Vorschrift homogenisiert wurde, wofür zwei Anläufe notwendig waren; Probe C3, die nur mittels Ultraturrax behandelt wurde.

Alle Proben A bis D wurden nach dem Abkühlen im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Am Tag nach der Herstellung wurden pH-Wert, Zetapotential, Partikelgröße und PDI vermessen, um eine Basischarakterisierung zu ermöglichen. Für die Messungen mit dem Zetasizer® wurde die Verdünnungsstufe 1:200 gewählt. Es wurden 5,0 ml Messlösung hergestellt, wofür 25 µl Probe und 4,975 ml 0,01mM NaCl-Lösung gemischt wurden.

Die 0,01mM NaCl-Lösung für die Messungen wurde frisch hergestellt. Auf Basis der molaren Masse von Natriumchlorid, welche 58,44 g/mol beträgt, wurde die nötige Einwaage für 0,01 Mol/L (Molzahl oder Stoffmenge n) NaCl-Lösung berechnet. Es ergaben sich nach $m = n \times M$ somit 0,5844 g/L und daher 584,4 mg/L NaCl. Dieses Gewicht wurde mit einer Analysenwaage eingewogen und in einen Messkolben überführt. Man füllte mit Aqua destillata bis zur Kapillare auf. Danach verdünnte man im Verhältnis 1:1000. Man nahm 1,0 ml der 0,01M NaCl-Lösung und füllte auf 1000 ml (=1Liter) mit Aqua destillata auf, um letztlich 0,01mM NaCl-Lösung zu erhalten. Die herstellten Formulierungen wurden 12 Wochen lang auf ihre Stabilität geprüft. Hierfür wurden alle wichtigen Parameter in regelmäßigen Abständen charakterisiert.

Makroskopische Beurteilung zum Herstellungszeitpunkt

Alle Proben hatten ein milchig-weißes Aussehen und zeigten keine Phasentrennung nach dem Herstellungsprozess. Die Proben waren geruchsneutral. Die Proben A, B und D waren relativ dünnflüssige Emulsionen (Abbildung 29). Es ist zu bedenken, dass die Temperatur bei der Verarbeitung der Zuckertenside eine wichtige Rolle

spielt. Probe C gelierte durch das Abkühlen während der Behandlung mit dem Ulturrax. Sie verdickte zu einer halbfesten Formulierung ähnlich einer herkömmlichen Creme (Abbildung 30).

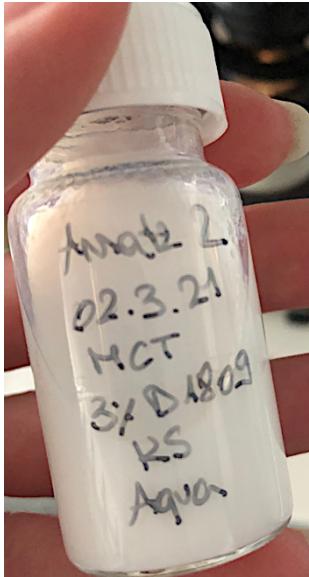


Abbildung 29: Probe A
milchig-weiße dünnflüssige Emulsion



Abbildung 30: Probe C
cremig-weiße halbfeste Emulsion

Ergebnisse für weitere Stabilitätsuntersuchungen

Alle Proben wurden nach der Produktion über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurden sie vermessen. Da das Ziel der Arbeit die Findung einer optimierten Formulierung zur Einarbeitung von Ginsengextrakt war, wurden die viel-versprechendsten Formulierungen (B und D) ausgewählt und für volle 12 Wochen vermessen. Probe A diente als Vergleichsprobe in den Vorversuchen, da diese Formulierung bereits in früheren Studien hinreichend charakterisiert worden war und quasi als Modellprobe diente. Probe C wurde aufgrund des schlecht standardisierbaren Herstellungsprozesses und der schlecht reproduzierbaren Produkteigenschaften nur direkt nach der Herstellung zu Vergleichszwecken charakterisiert.

4.1.3.1. Ergebnisse der Zetasizer-Messungen

Partikelgröße als mittlerer hydrodynamischer Durchmesser

Alle Proben wurden direkt nach der Herstellung charakterisiert. Abbildung 31 zeigt die Messergebnisse als hydrodynamischen Durchmesser in Woche 0 sowie im Ver-

lauf der Lagerung für Probe B und D. Probe B zeigte eine konstant stabile Partikelgröße. Die Werte bewegten sich stets im Rahmen von 140 bis 152 nm. Probe D zeigte zu Beginn eine durchschnittliche Partikelgröße von 180 nm, die jedoch im Laufe des Beobachtungszeitraums schwankte und letztlich bis zu 350 nm zunahm. Die Schwankungen innerhalb Woche 8 bis 12 weisen auf inhomogenere Formulierungseigenschaften hin. Erhöhte Viskosität während der Lagerung könnte zu einer ungenauerer Einwaage bei der Probenvorbereitung für die Messungen geführt haben. Es war ab Woche 8 schwieriger, die Probenmenge exakt zu pipettieren, da die Viskosität der Formulierung D zunahm.

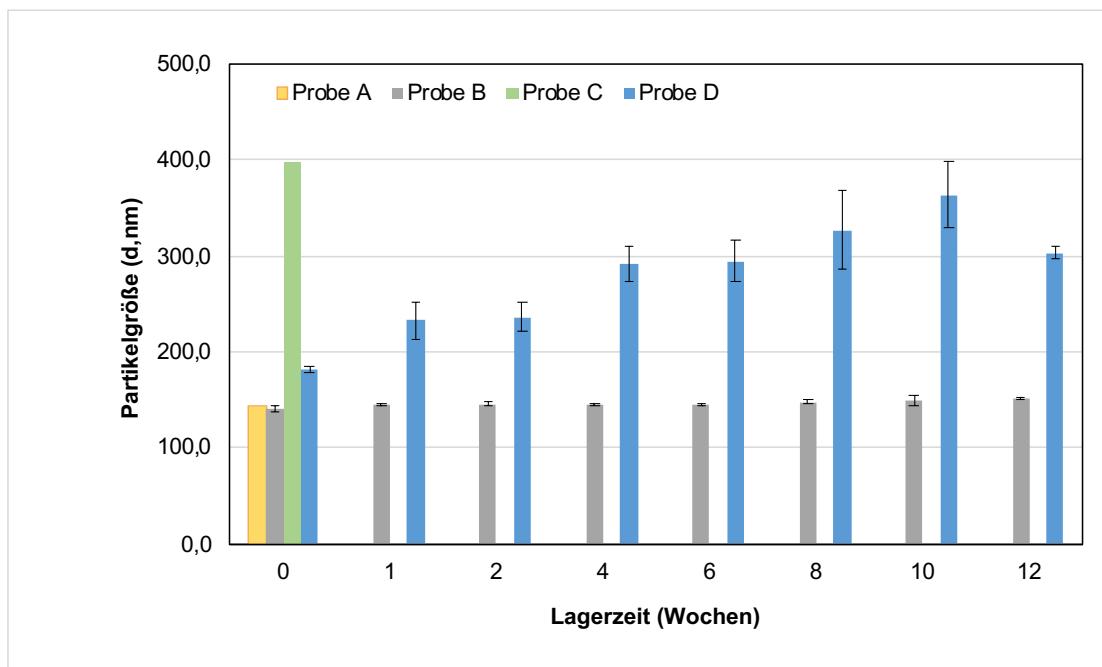


Abbildung 31: Partikelgrößen der Nanoemulsionen nach Herstellung (Woche 0) und im Verlauf der Lagerung

Zetapotential

Die Werte für das Zetapotential zeigten gewisse Schwankungen im Verlauf der Lagerung, blieben jedoch in einem hohen negativen Bereich. Abbildung 32 zeigt die Zetapotential-Messungen der Nanoemulsionen B und D nach Herstellung (Woche 0) sowie während der Lagerung über 12 Wochen, stets durchgeführt mit der Verdünnungsstufe 1:200 mit 0,01 mM NaCl-Lösung.

Nanoemulsion B war mit Werten von -50 bis -80 mV als stabil zu betrachten. Nanoemulsion D zeigte niedrigere Absolutwerte im negativen Bereich von -35 bis -50 mV. Beide Nanoemulsionen zeigten während des Messzeitraums Schwankungen, die

analog auftraten. Dies könnte an der Vorbereitung der Proben liegen oder an den verwendeten Zetazellen. Laut Hersteller sind diese für eine Einmalanwendung vorgesehen. In dieser Arbeit wurden die Zetazellen und Küvetten aus Kostengründen öfters verwendet. Sie wurden nach den Messungen mit Wasser und Ethanol gespült und getrocknet.

Als Fazit kann man sagen, dass beide Nanoemulsionen in Bezug auf die elektro-chemische Stabilisierung gutes Potential zeigen, da die gemessenen Werte im hohen negativen Bereich liegen. Probe B weist höhere Zetapotentialwerte auf, was in guter Übereinstimmung mit der weitaus stabileren gemessenen Partikelgröße der Probe B während der Lagerung ist.

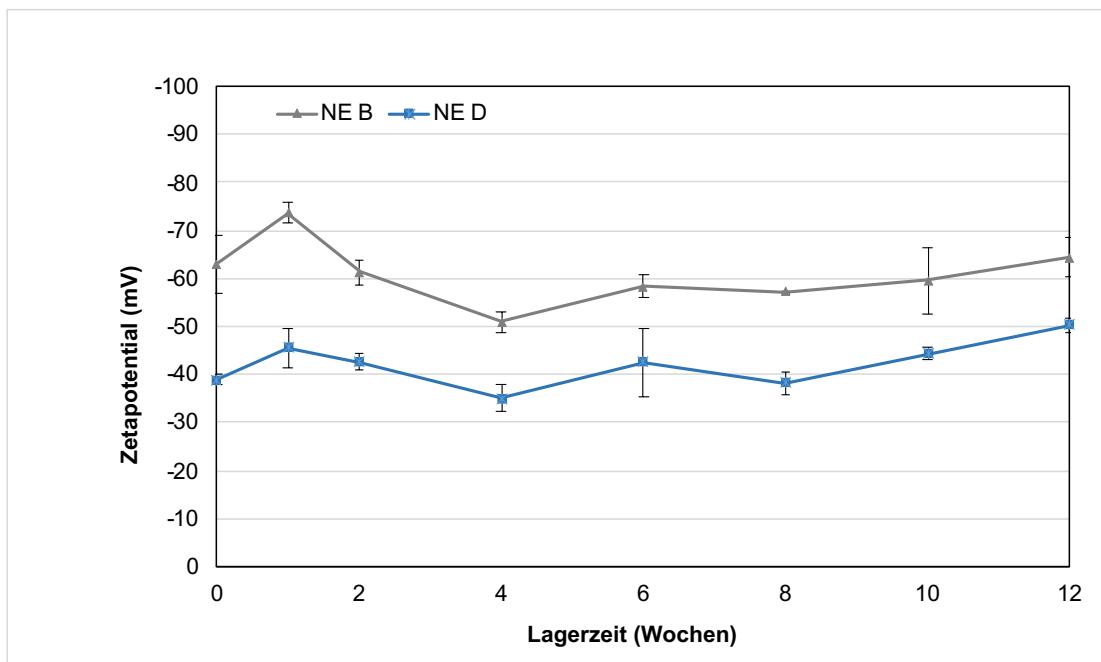


Abbildung 32: Zetapotential der Nanoemulsionen B und D nach Herstellung (Woche 0) und über 12 Wochen

Polydispersitätsindex

Auch in Bezug auf den PDI war die Probe B der Probe D überlegen. Abbildung 33 zeigt den PDI-Wert der Nanoemulsionen B und D nach Herstellung und im Verlauf der 12 Wochen. Man erkennt gut, dass der PDI bei Probe B zwischen 0,1 und 0,2 lag. Das zeigt eine enge Tröpfchengrößenverteilung. Da der PDI unter 0,2 über einen längeren Zeitraum relativ konstant bleibt, kann man auf eine gute Lagerstabilität der Probe B schließen. Bei Nanoemulsion D bewegte sich der PDI zwischen 0,2

und 0,3. Im Verlauf der 12 Wochen zeigte sich Probe B als die physikalisch stabilere Formulierung.

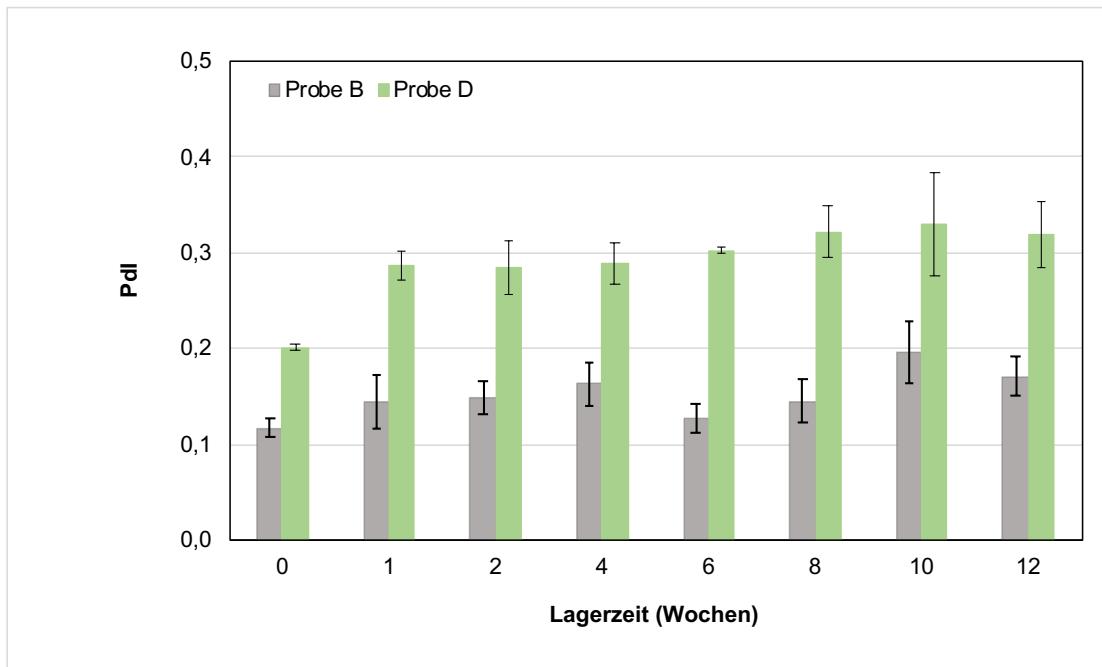


Abbildung 33: PDI der Nanoemulsionen B und D nach Herstellung (Woche 0) und über 12 Wochen

4.1.3.2. Ergebnisse der pH-Wert-Messungen

Die pH-Werte der Formulierungen A bis D lagen nach der Herstellung stets im Bereich 6,65 bis 6,75. Die Bestimmung des pH-Wertes wurde für die Stabilitätsprüfung über 12 Wochen bei Formulierung B und D herangezogen. Abbildung 34 zeigt den Verlauf der pH-Werte während der Lagerung über 12 Wochen. Es wurden immer drei Einzelmessungen pro Probe durchgeführt und daraus der Mittelwert gebildet, um aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten. Diese Mittelwerte wurden bei Nanoemulsion B als B1, B2 und B3 eingetragen. Hieraus wurde der Mittelwert mit Standardabweichung für Formulierung B berechnet. Es wurde immer bei Raumtemperatur (25°C) gemessen, um Ungenauigkeiten zu vermeiden.

Zu Beginn zeigte die Nanoemulsion B einen pH-Wert von 6,72. Dieser hielt sich über vier Wochen stabil und nahm danach geringfügig ab. Nanoemulsion D zeigte zu Beginn einen ähnlichen pH-Wert von 6,68, der im Verlauf der 12 Wochen auf 6,37 abnahm. Die Emulsionen liegen mit diesen pH-Werten nicht im physiologi-

schen Bereich der Haut, dennoch wären sie für eine dermale Anwendung akzeptabel. Die beobachtete Abnahme des pH-Werts während der Lagerung kann auf Abbauprozesse der verwendeten Lipide und Tenside zurückgeführt werden, die zur Freisetzung freier Fettsäuren führen.

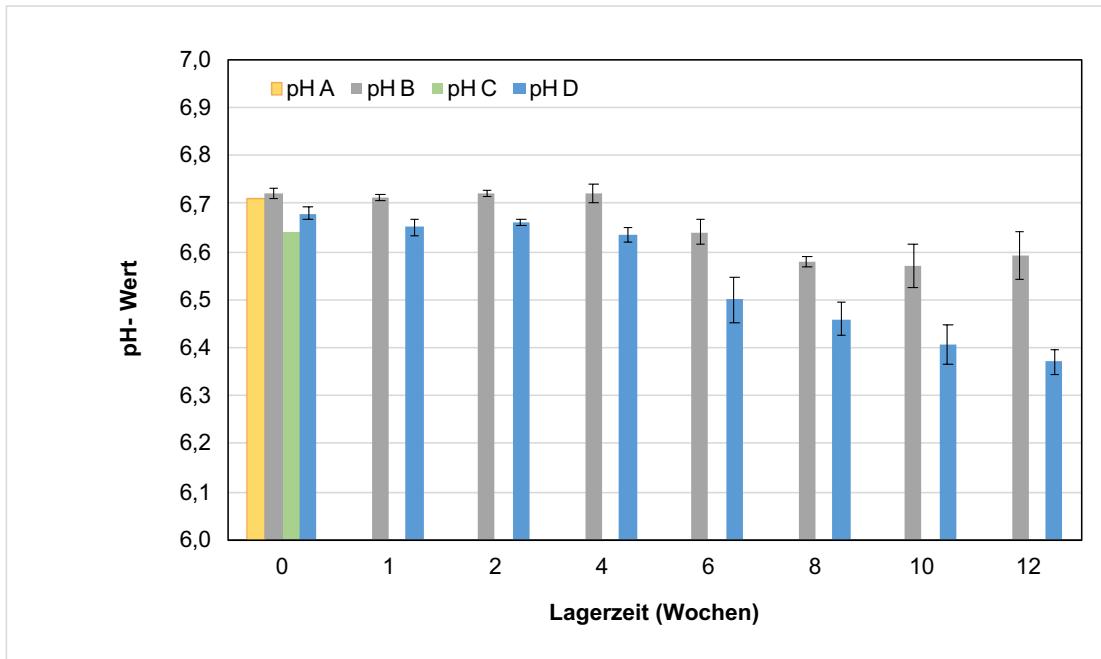


Abbildung 34: pH-Wert der Nanoemulsionen B und D nach Herstellung (Woche 0) und über 12 Wochen

4.1.3.3. Ergebnisse der rheologischen Messungen

Vor den Messungen wurde die Messmethode für die Rheologie ausgearbeitet und optimiert (siehe Kapitel 4.1.4). Alle Versuche wurden bei einer Temperatur von 23°C und mit dem Kegel-Platte-Rheometer⁵ (Anton Paar GmbH, Germany) durchgeführt. Die Proben wurden langsam mittig auf die Platte pipettiert, um unerwünschte Deformierung zu vermeiden. Man verwendete dabei eine Eppendorf®-Pipette mit einer Probenmenge von 800 µl. Damit konnte die Probe durch Absenken des Messkegels luftdicht exakt auf die Platte gedrückt werden. Da die Probe C viskoser war als die Proben A, B und D wurde sie auf die Platte gestrichen und - ebenso wie Probe A - nur zum Vergleich einmal vermessen. Als Kegel-Messsystem nahm man CP50-1 mit einem Durchmesser von $d=49.985$ mm und einem Winkel/Messspalt von 1.003°.

⁵ Rheometer Anton Paar GmbH, MCR 302- Modular Compact Rheometer

Fließkurven

Für die Untersuchungen wurden zuerst die Fließkurven der Nanoemulsionen A bis D analysiert. Abbildungen 35-42 zeigen die Fließ- und Viskositätskurven. Die Nanoemulsionen A, B und D zeigten eine relativ geringe Viskosität und scherverdünnendes Fließverhalten. Formulierung C wurde in drei verschiedenen Ausführungen zu Vergleichszwecken vermessen.

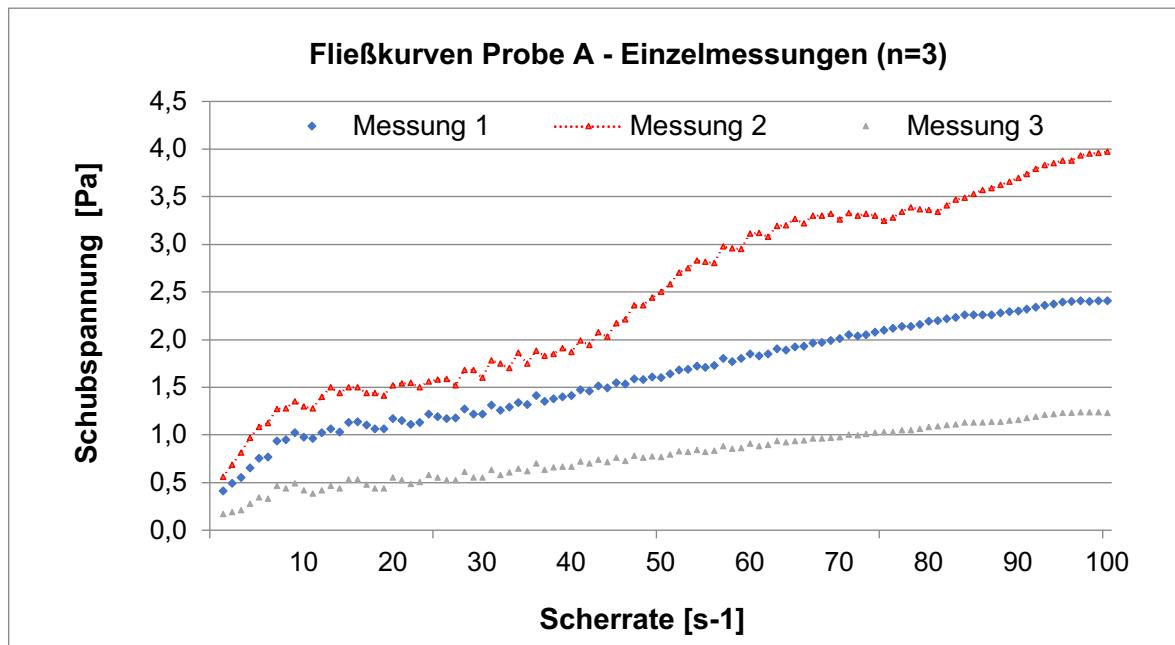


Abbildung 35: Fließkurve der NE A: Zunahme der Schubspannung (Kraft) bei steigender Scherbeanspruchung (Scherrate)

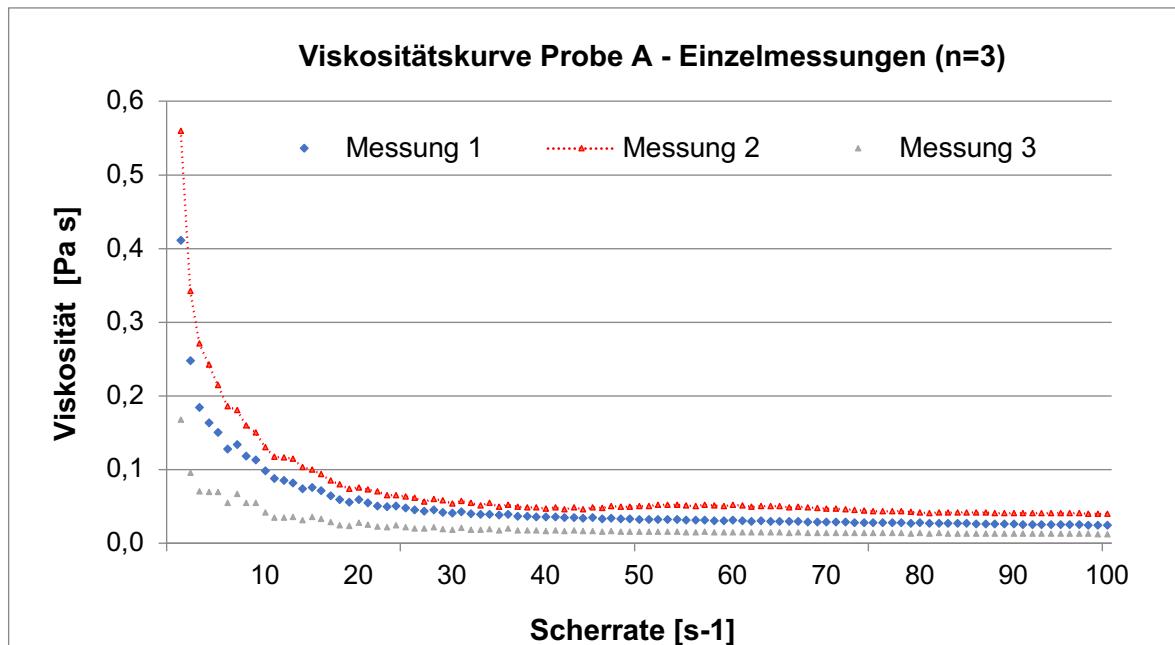


Abbildung 36: Viskositätskurve der NE A: bei steigender Scherbeanspruchung (Scherrate) sinkt die Viskosität (Scherverflüssigung)

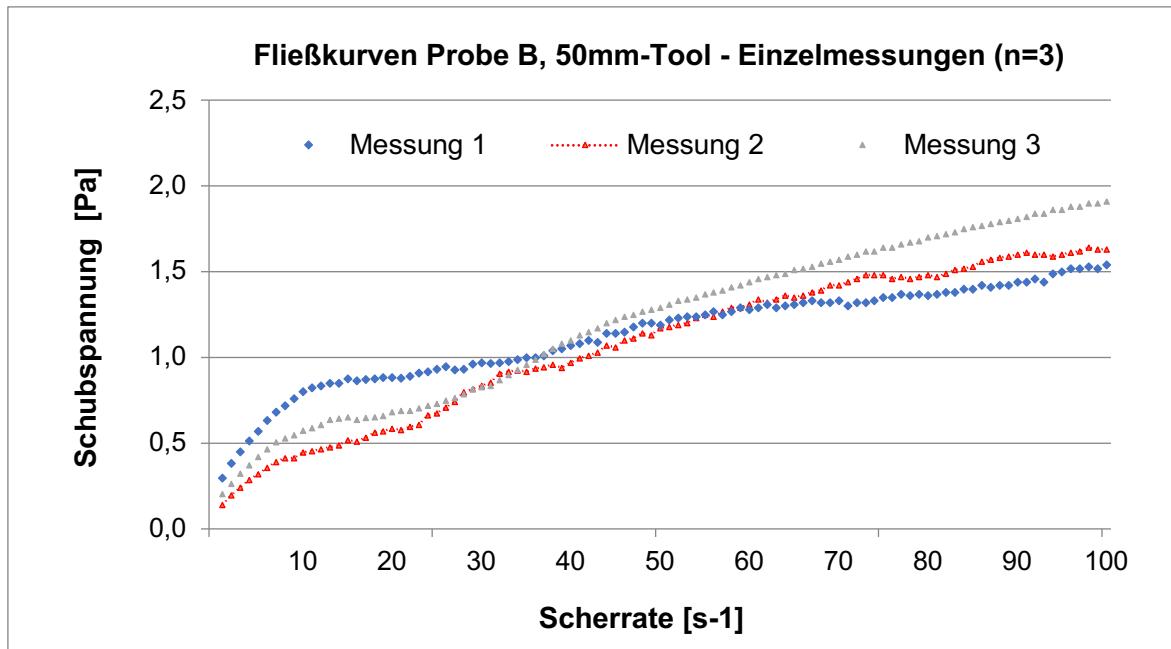


Abbildung 37: Fließkurve der NE B: Zunahme der Schubspannung (Kraft) bei steigender Scherbeanspruchung (Scherrate)

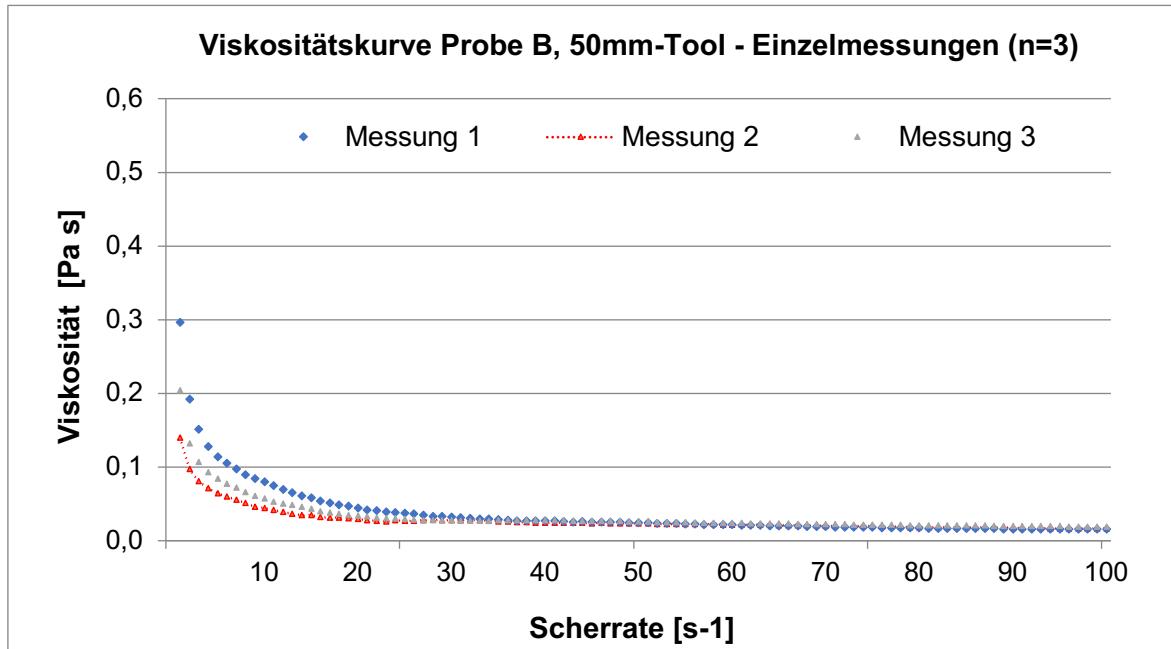


Abbildung 38: Viskositätskurve der NE B: bei steigender Scherbeanspruchung (Scherrate) sinkt die Viskosität (Scherverflüssigung)

Formulierung C wurde in drei verschiedenen Ausführungen zu Vergleichszwecken vermessen. Diese ist in Abbildung 39 dargestellt.

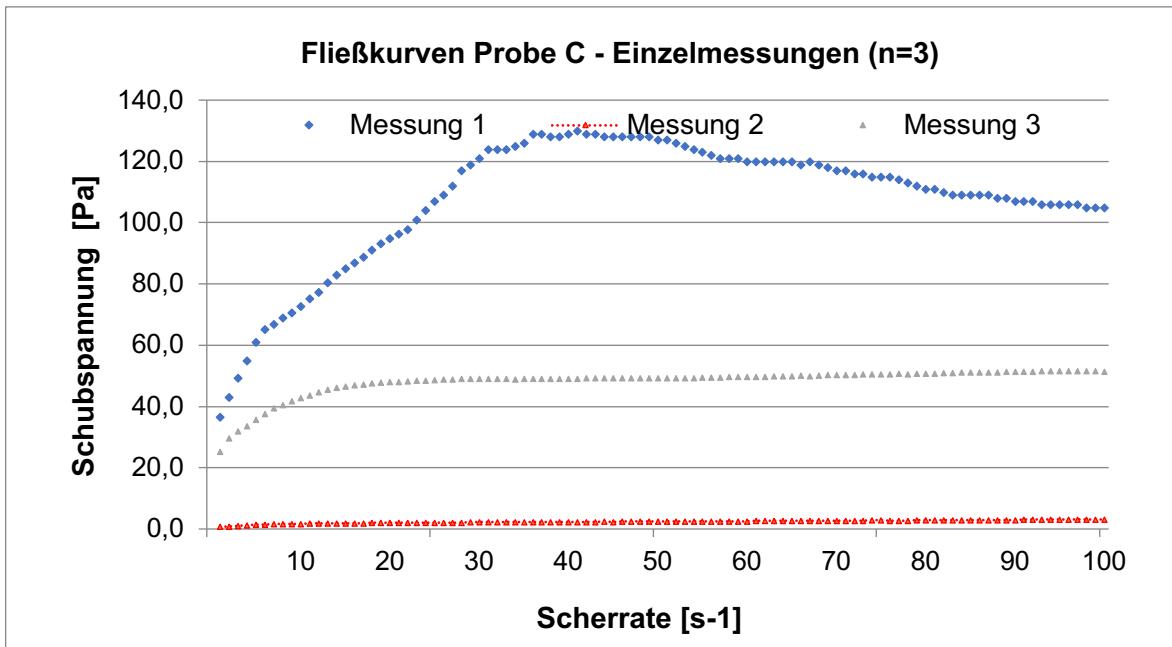


Abbildung 39: Fließkurve der NE C: Zunahme der Schubspannung (Kraft) bei steigender Scherbeanspruchung (Scherrate)

Messung 1 stellt die nicht homogenisierte Probe mit halbfesten Charaktereigenschaften dar. Messung 2 repräsentiert die doppelt homogenisierte Probe (kleinste Messwerte). Messung 3 stellt die teilhomogenisierte Probe dar, deren Messwerte im mittleren Bereich liegen. Auch in Abbildung 40 sieht man die äußerst unterschiedlichen Ausgangsviskositäten der drei unterschiedlichen Proben der Formulierung C.

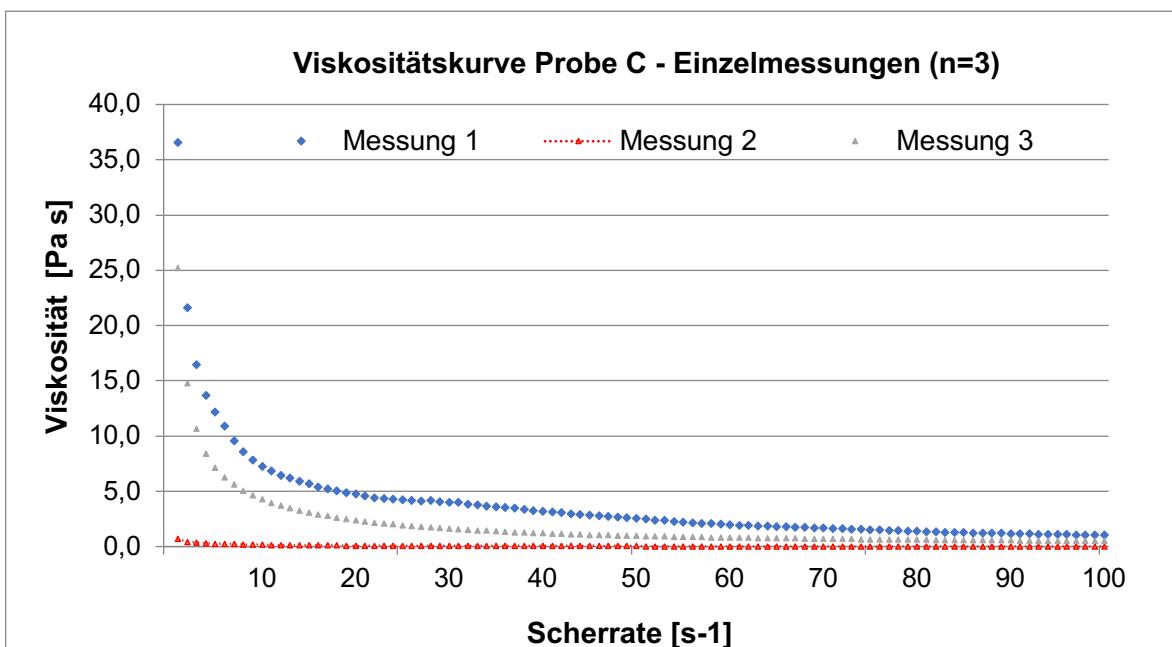


Abbildung 40: Viskositätskurve der NE C: bei steigender Scherbeanspruchung (Scherrate) sinkt die Viskosität (Scherverflüssigung)

Die Grafiken zeigen, dass die Viskosität mit Erhöhung der Scherrate stets abnimmt. Die Werte zu Beginn sind höher und auch die Standardabweichung ist zu Beginn höher, nimmt aber dann ab der Scherrate von ca. 10/s langsam ab und die Messschwankung wird kleiner. Aus Gründen der Übersicht wurde die Standardabweichung in den Diagrammen nicht dargestellt.

Die Fließkurven zeigen generell ein Nicht-Newtonsches Verhalten und weisen auf scherverdünnende Formulierungen hin. Dies heißt, dass mit Zunahme der Scherrate die Viskosität abnimmt und die Zubereitung dünnflüssiger wird.

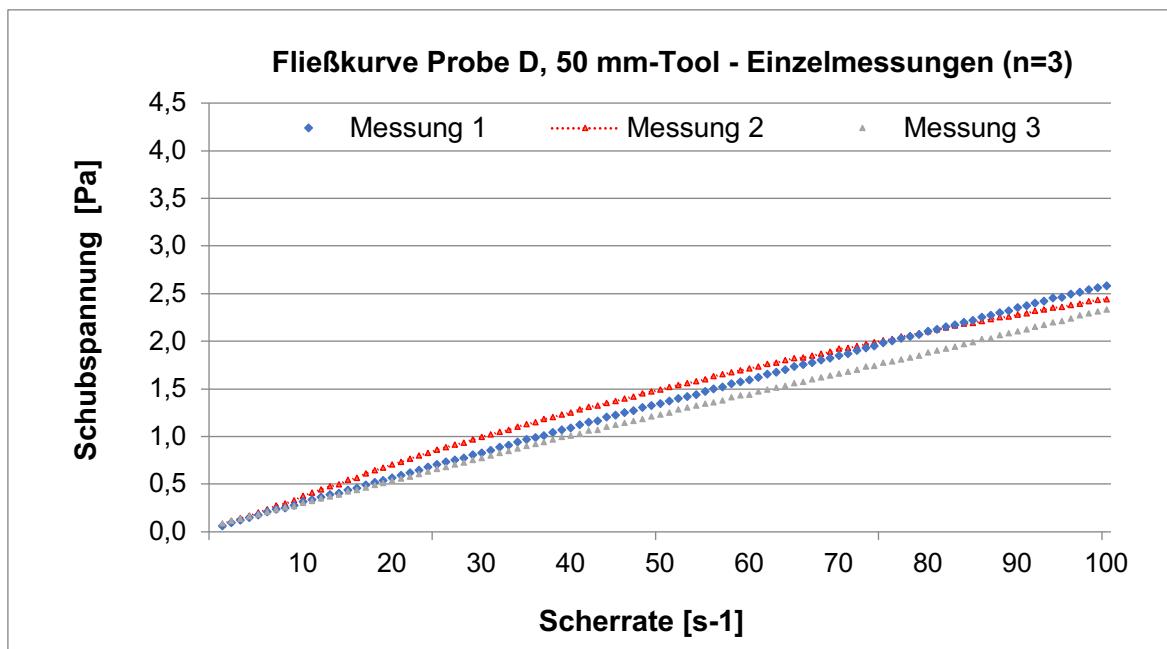


Abbildung 41: Fließkurve der NE D: Zunahme der Schubspannung (Kraft) bei steigender Scherbeanspruchung (Scherrate)

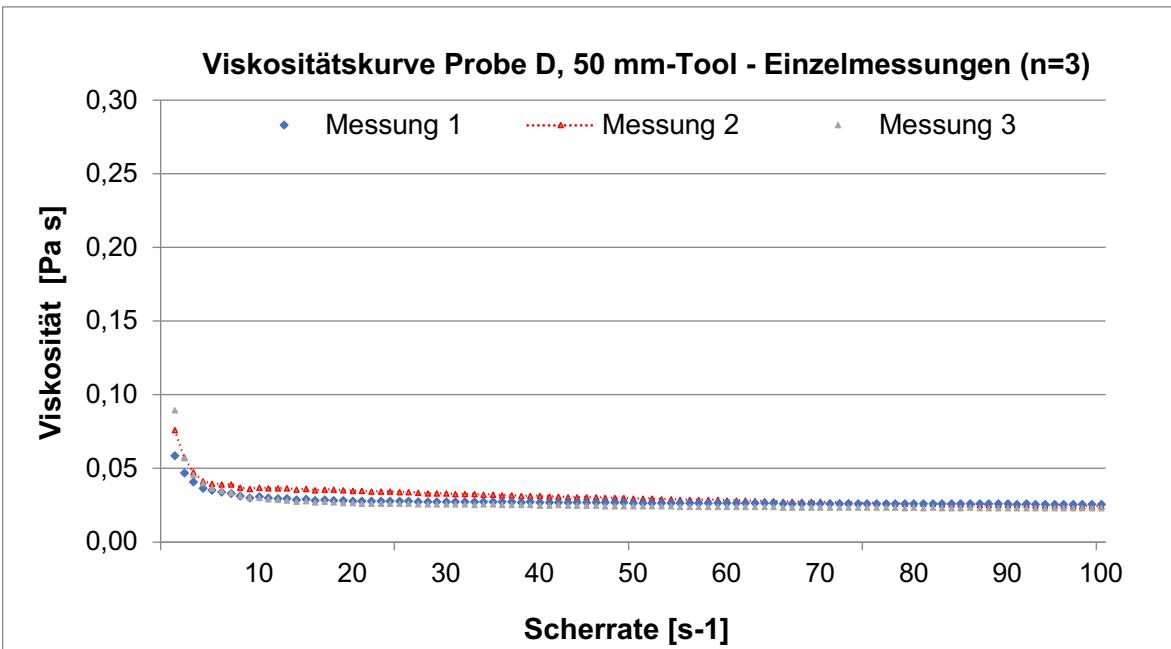


Abbildung 42: Viskositätskurve der NE D: bei steigender Scherbeanspruchung (Scherrate) sinkt die Viskosität (Scherverflüssigung)

Für die Stabilitätsuntersuchungen über 12 Wochen wurden hier wie bei den Zetaziner-Messungen nur die Proben B und D herangezogen. Es wurden die Fließ- und Viskositätskurven der beiden Emulsionen (Mittelwert aus n=3, mit STABW) ermittelt. In Abbildung 43 und 44 sind die Viskositätskurven mit einer Scherrate von 1-100/s als 100 Messpunkte der Proben B und D dargestellt. Man erkennt bei beiden Formulierungen, dass die Viskosität mit Zunahme der Scherung abnimmt. Bei Probe B nimmt die Viskosität bis zur Scherrate von ca. 10/s stärker ab und ab 15/s bleibt die Abnahme relativ unverändert. Bei Probe D nimmt die Viskosität bis zur Scherrate 5/s ab und ab 10/s pendelt sich hier die ziemlich unveränderte Abnahme ein. Für die Auswertung wurde der Mittelwert von drei Messungen pro Probe herangezogen.

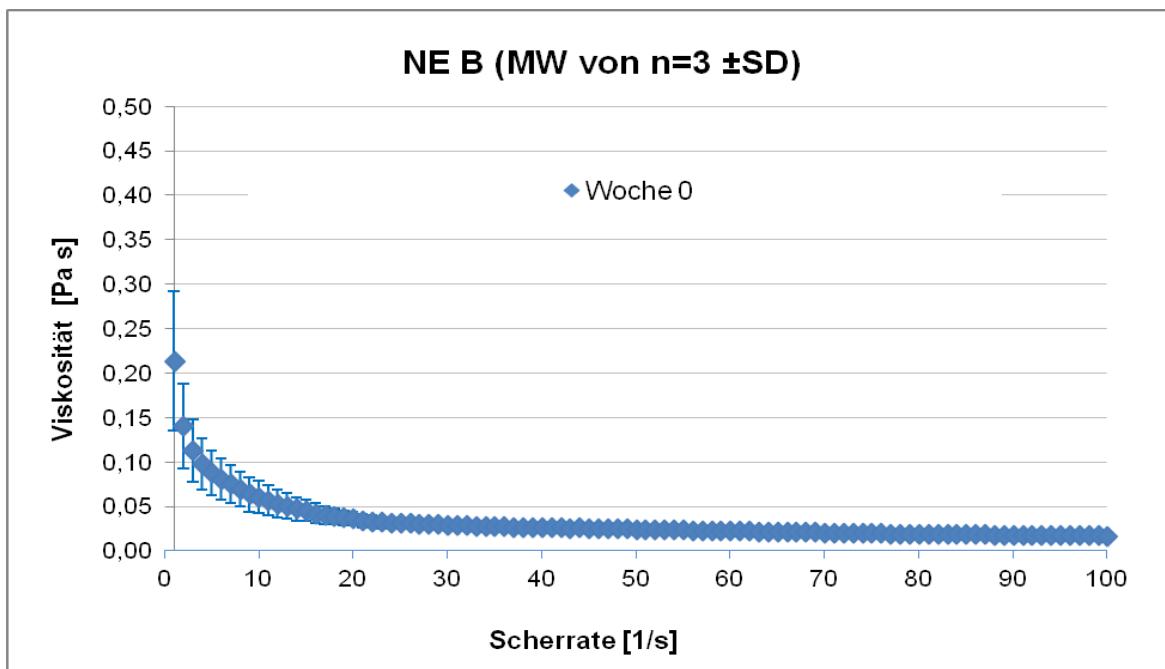


Abbildung 43: Viskositätskurve der Nanoemulsion B (Scherrate 1-100/s, n=3 mit STABW)

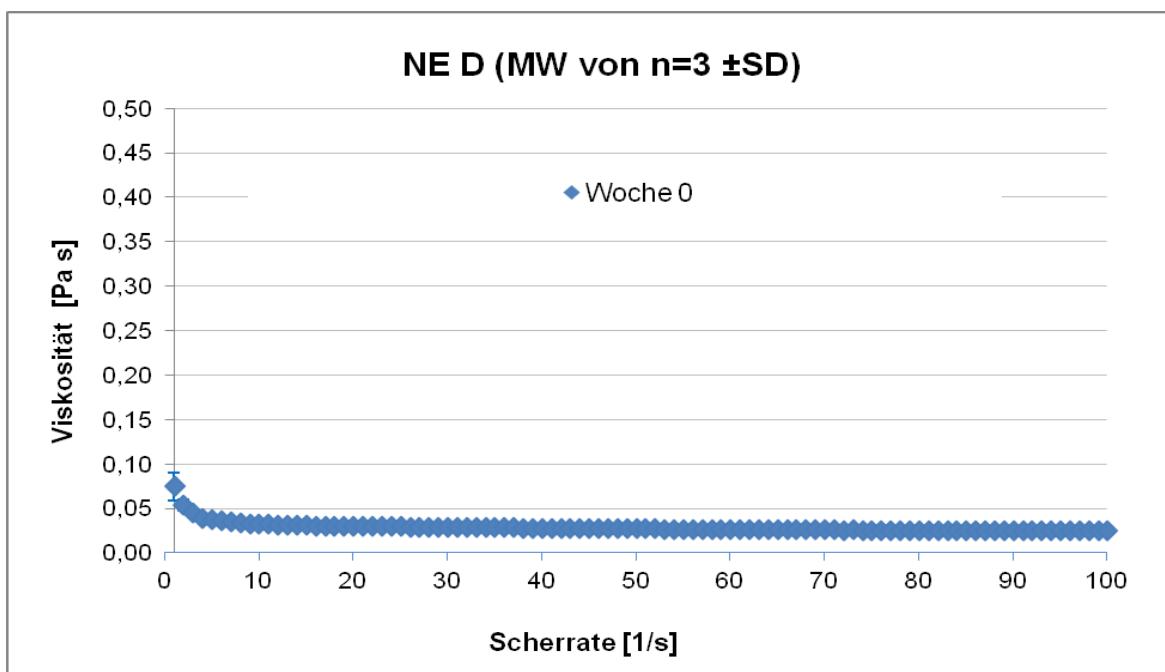


Abbildung 44: Viskositätskurve der Nanoemulsion D (Scherrate 1-100/s, n=3 mit STABW)

Um einen direkten Vergleich der Viskosität bei einer bestimmten Scherrate zu ermöglichen, wurde ein Messwert gewählt und die Ergebnisse im Balkendiagramm dargestellt (Abb. 45 und 46). Hier wurde der Wert der dynamischen Viskosität in

Pa*s bei einer Scherrate von 10/s zum Vergleich herangezogen. Dieser Wert wurde für die Formulierungen B und D im Zeitraum von 12 Wochen verglichen.

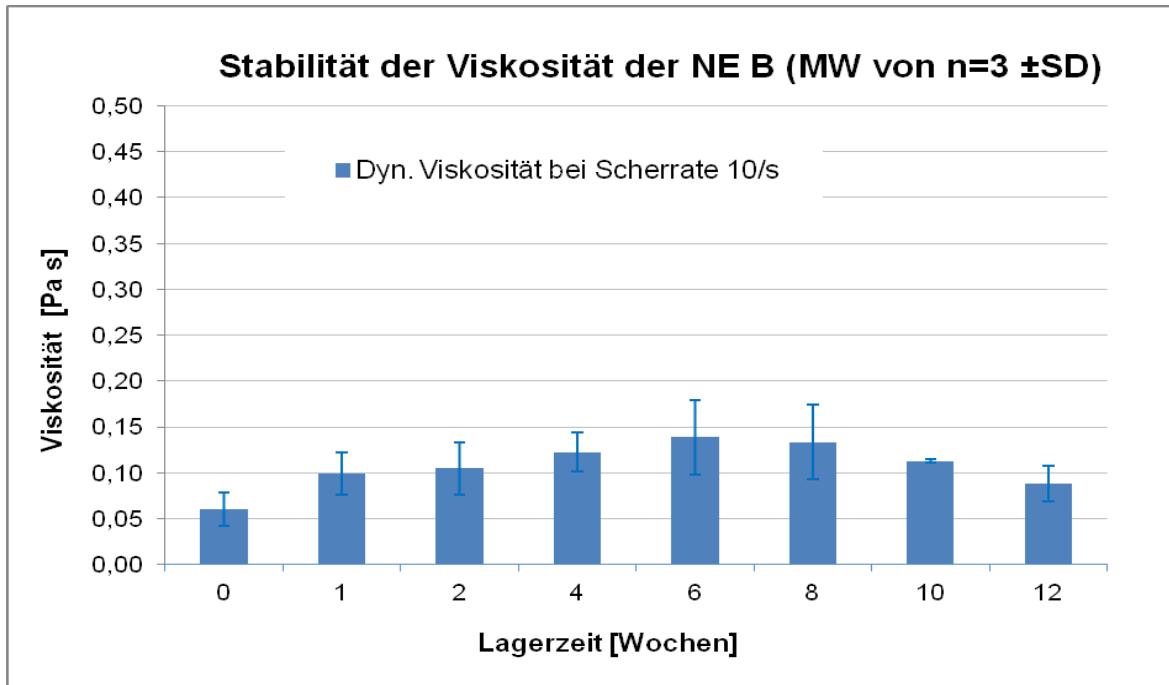


Abbildung 45: Dynamische Viskosität von NE B über 12 Wochen bei einer Scher-rate von 10/s

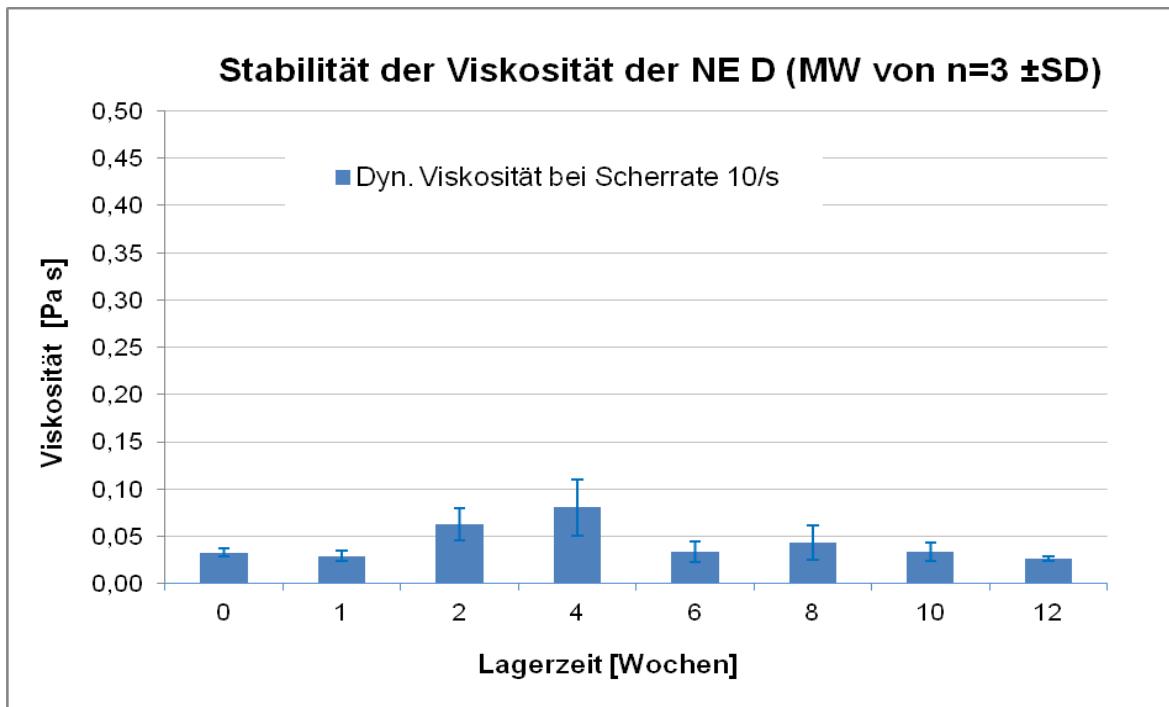


Abbildung 46: Dynamische Viskosität von NE D über 12 Wochen bei einer Scher-rate von 10/s

Beide Formulierungen zeigen scheinbar Schwankungen in den Messergebnissen auf. Diese sind vermutlich auf Messfehler am Gerät bzw. bei der Probenentnahme zurückzuführen. Da die Nanoemulsionen kühl bei 4°C gelagert wurden, wurden sie vor den Messungen auf Raumtemperatur 23°C gebracht. Durch die Kühlung gelerten die Proben teilweise und es dauerte, bis sie ihre ursprüngliche flüssigere Konsistenz annahmen. Inwieweit dieses Prozedere einen Einfluss auf die Messergebnisse hat, wird in kommenden Studien gesondert untersucht werden.

In Abbildung 47 und 48 sind die kompletten Viskositätskurven der Formulierungen B und D im Wochenvergleich nebeneinander dargestellt.

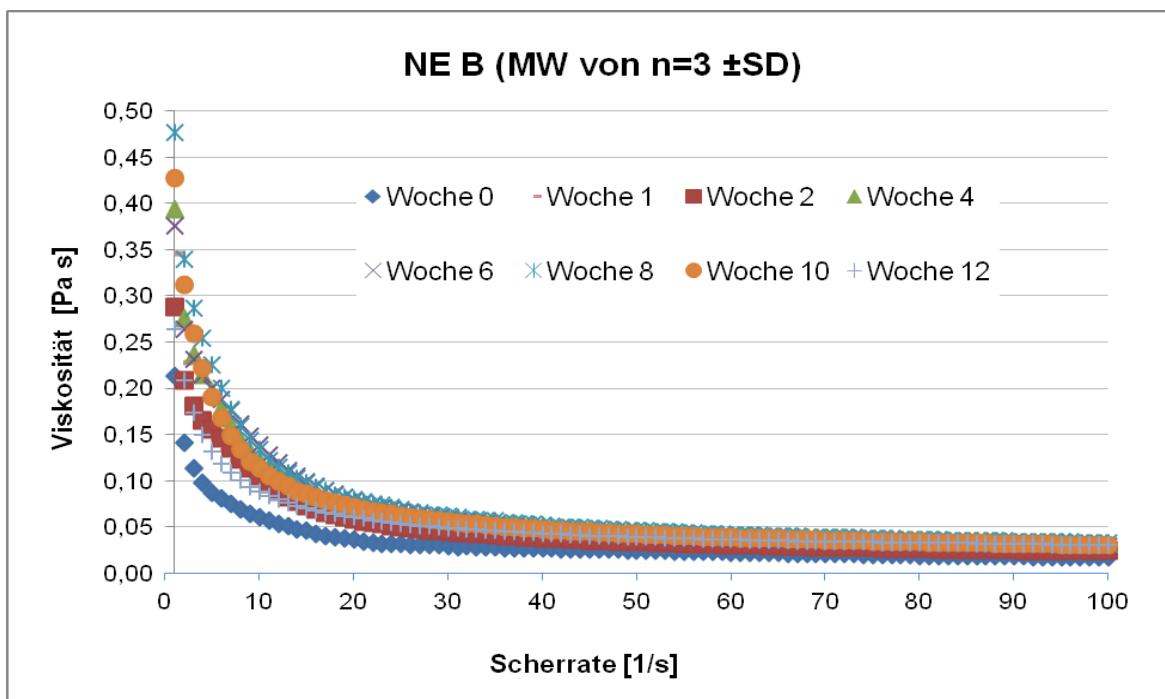


Abbildung 47: Viskositätskurven der Nanoemulsion B über 12 Wochen (Scherrate 1-100/s)

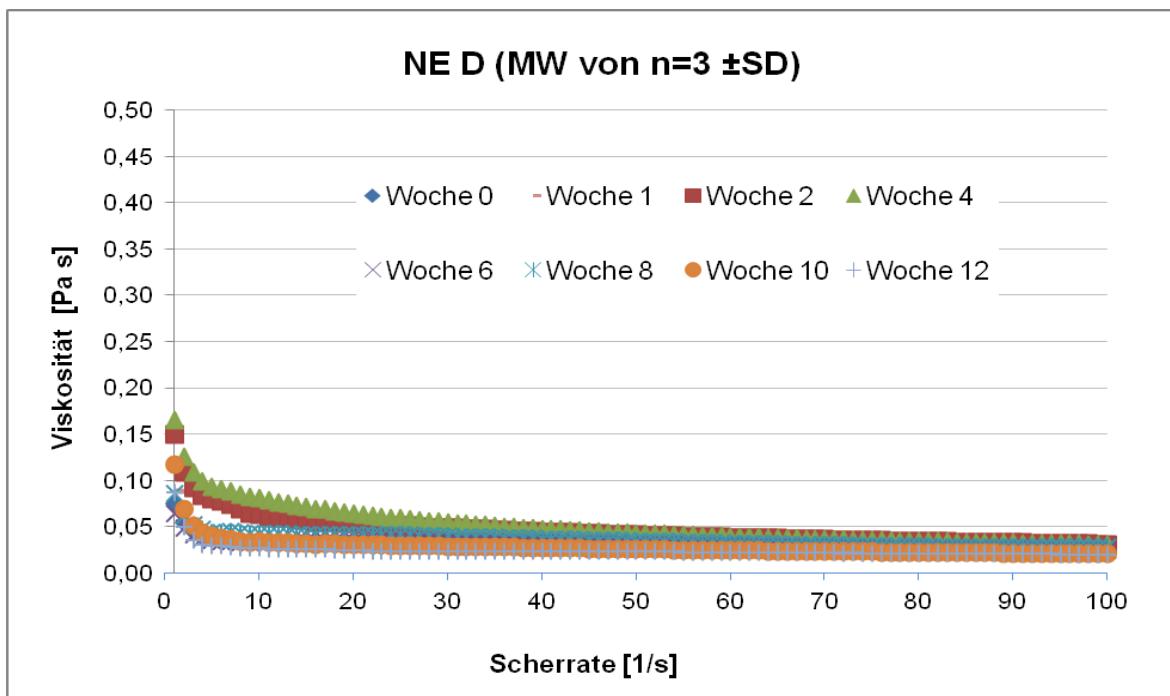


Abbildung 48: Viskositätskurven der Nanoemulsion D über 12 Wochen (Scherrate 1-100/s)

Oszillation

Direkt nach der Herstellung wurden für alle Formulierungen auch Oszillationsmessungen durchgeführt. Der Fokus lag hierbei auf der Bestimmung des elastischen und viskosen Modulus, um die Formulierungen besser in Bezug auf ihre Fließeigenschaften vergleichen zu können. Hierfür wurde zuerst der linear-viskoelastische Bereich (LVE-Bereich) bestimmt. In diesem zerstörungsfreien Bereich wurden dann weitere Messungen mit oszillierendem Messkörper durchgeführt.

Der Vollständigkeit halber sind im Folgenden auch die miterhobenen Daten zur Viskosität im Oszillationsmodus angeführt, um ablesen zu können, ob sich die Viskosität bei Messung einer aufwärts/abwärts-Rampe irreversibel verändert. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert von n=3 Proben mit STABW dar.

Probe A zeigt in Abbildung 49 bei Zunahme der Schubspannung eine Abnahme der dynamischen Viskosität. Beim Senken der Schubspannung geht die Formulierung in ihre ursprüngliche Form zurück. Diese Ergebnisse zeigen ein thixotropes Verhalten der Probe A. Probe B zeigt in Abbildung 50 keinen vollständigen Wiederaufbau der Struktur. Probe D zeigt in Abbildung 51 eine Abnahme der Viskosität durch Zunahme der Schubspannung. Beim Senken der Schubspannung nimmt auch diese Formulierung an Viskosität wieder zu.

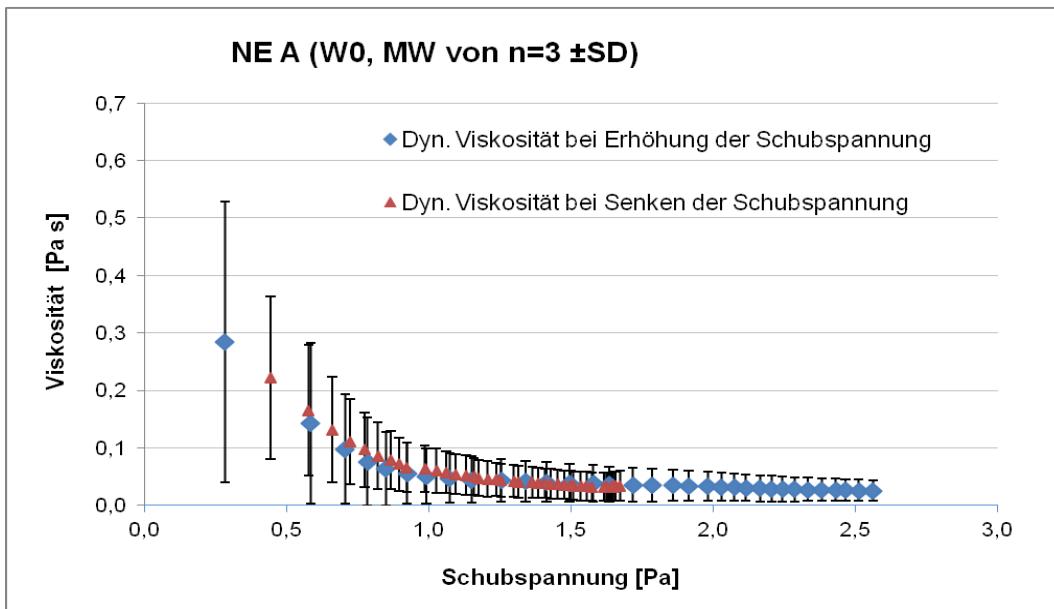


Abbildung 49: Viskosität der NE A bei Erhöhung und Senkung der Schubspannung

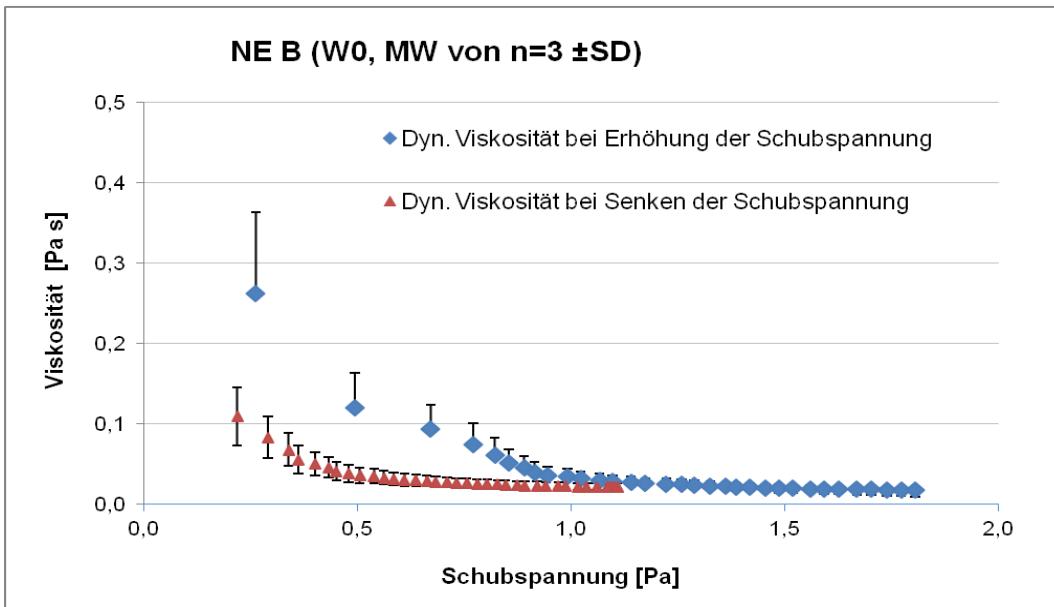


Abbildung 50: Viskosität der NE B bei Erhöhung und Senkung der Schubspannung

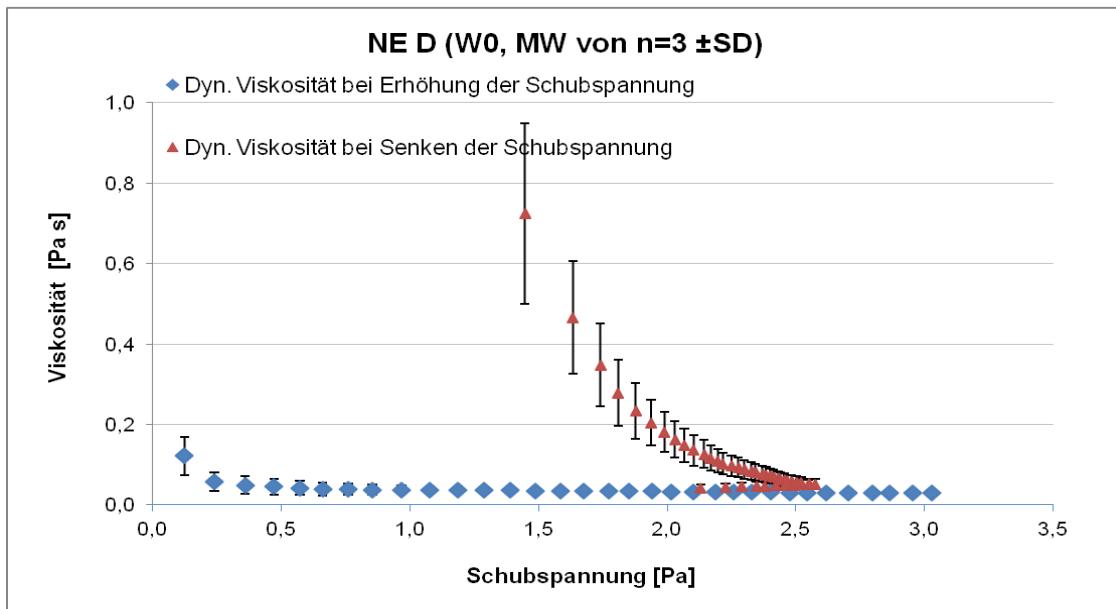


Abbildung 51: Viskosität der NE D bei Erhöhung und Senkung der Schubspannung

Abbildung 52-54 zeigen die Werte für Speicher- und Verlustmodul der Proben A, B und D in Abhängigkeit von der Schubspannung im Vergleich. Es ist zu sehen, dass Probe D hier stets die niedrigsten Werte aufweist, gefolgt von Probe A und zuletzt Probe B. Probe D weist sowohl bei elastischem als auch viskosem Modulus die geringsten Werte auf.

In Abbildung 52 und 53 ist ersichtlich, dass bei den Proben A und B das Speichermodul generell höher ist als das Verlustmodul. Das bedeutet, dass bei diesen Formulierungen der elastische Teil überwiegt. Bei Nanoemulsion D, welche in Abbildung 54 dargestellt ist, überwiegt bis zur Schubspannung von 50 mPa der elastische Teil, danach nähern sich die Werte innerhalb einer gewissen Schwankungsbreite an bzw. überwiegt sogar der viskose Teil.

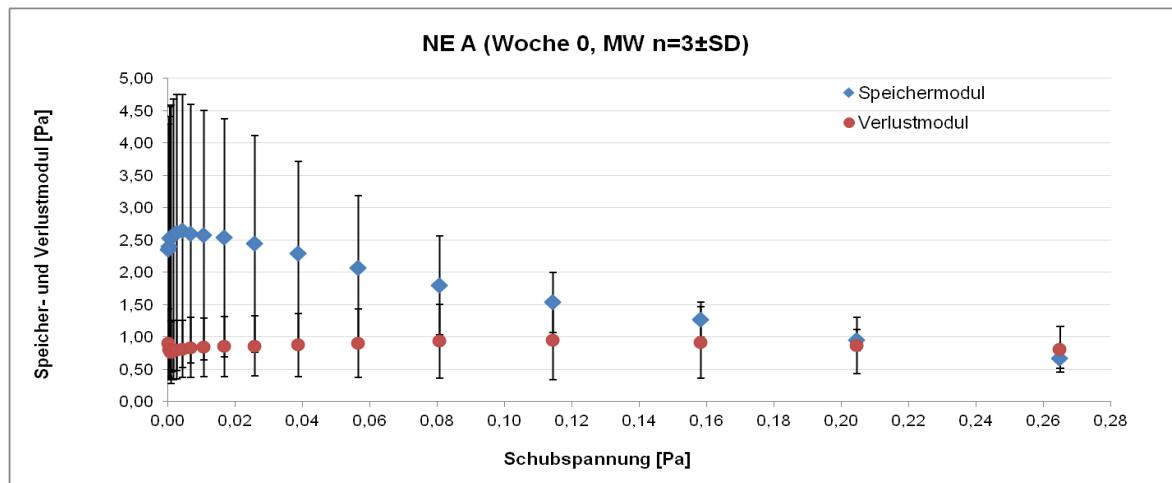


Abbildung 52: Speicher- und Verlustmodul der NE A in Pa in Abhängigkeit von der Schubspannung

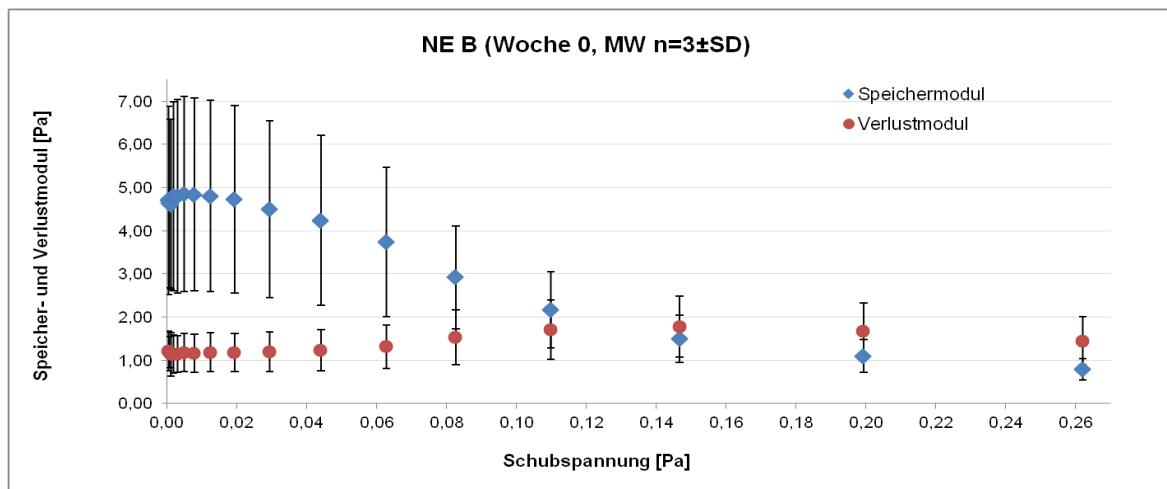


Abbildung 53: Speicher- und Verlustmodul der NE B in Pa in Abhangigkeit von der Schubspannung

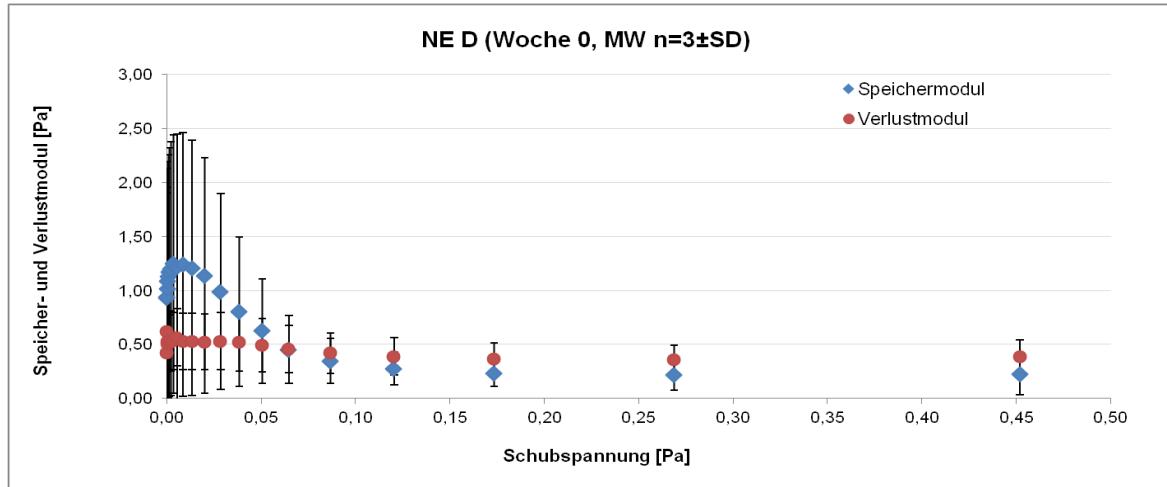


Abbildung 54: Speicher- und Verlustmodul der NE D in Pa in Abhangigkeit von der Schubspannung

Die Messergebnisse fur Speicher- und Verlustmodul der Formulierungen A, B und D sind im Folgenden auch in Abhangigkeit von der Deformation dargestellt (Abb. 55-57). Diese Messergebnisse zeigen, in welchem Deformationsbereich die Flie-eigenschaften der Formulierungen konstant sind. Der Kreuzungspunkt der beiden Kurven stellt den Fliepunkt der Formulierungen dar.

Alle Formulierungen zeigen im Bereich niedriger Deformation einen stabilen Verlauf, da die beiden Kurven des Verlust- und Speichermoduls linear parallel verlaufen. Der LVE endet bei allen Formulierungen im Bereich zwischen 5 und 10% Deformation. Nur bis zu diesem Bereich findet unter Belastung eine reversible Deformation statt. Es ist anzumerken, dass Formulierung D bei diesen Messungen die geringste Schwankungsbreite innerhalb der Einzelmessungen aufweist.

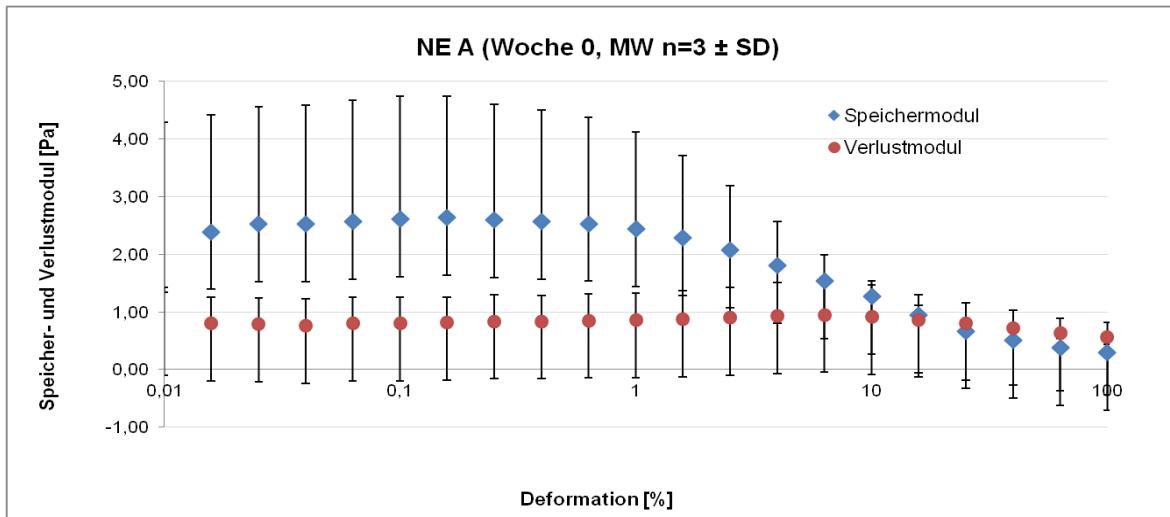


Abbildung 55: Speicher- und Verlustmodul der NE A in Pa in Abhangigkeit von der Deformation

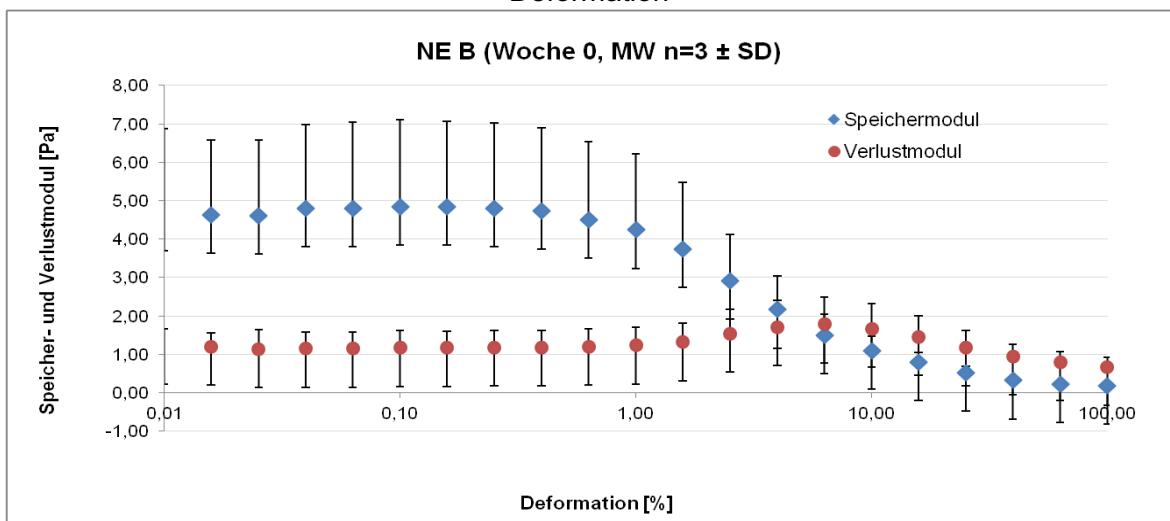


Abbildung 56: Speicher- und Verlustmodul der NE B in Pa in Abhangigkeit von der Deformation

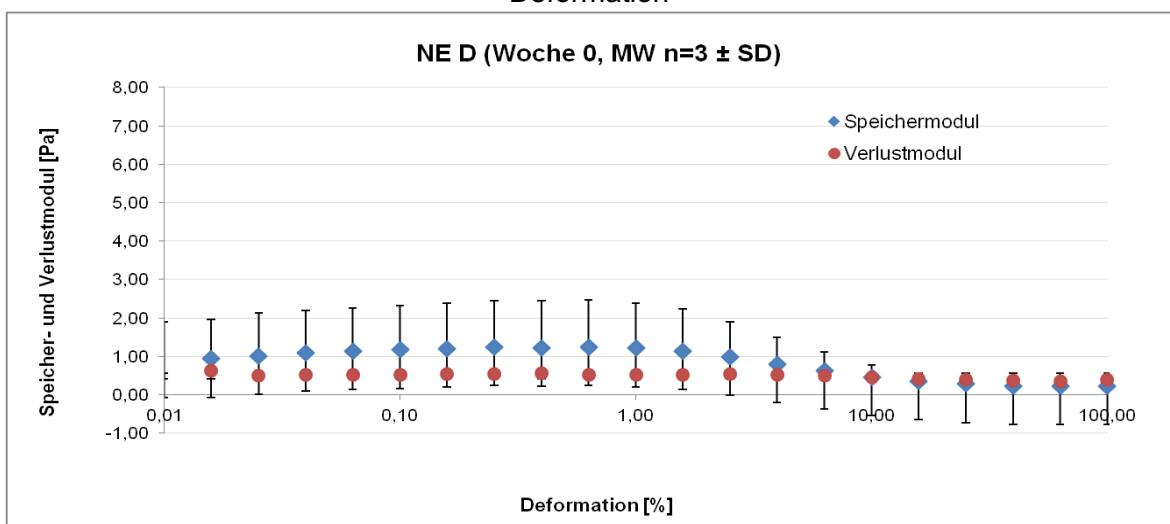


Abbildung 57: Speicher- und Verlustmodul der NE D in Pa in Abhangigkeit von der Deformation

Zuletzt sind in Abbildung 58-60 die Ergebnisse zum Verlust- und Speichermodul sowie zur Viskosität im Absolutbetrag in Bezug auf die Kreisfrequenz 1-100/s für Formulierung A, B und D dargestellt. Man sieht, dass die Proben A und B die höchste Ruhestrukturstärke aufweisen. Alle drei Proben zeigen relativ konstante Kurven bis zu einem Frequenzbereich von 10/s. Im Hochfrequenzbereich kommt es zu Strukturveränderungen und Instabilität bei allen drei Proben.

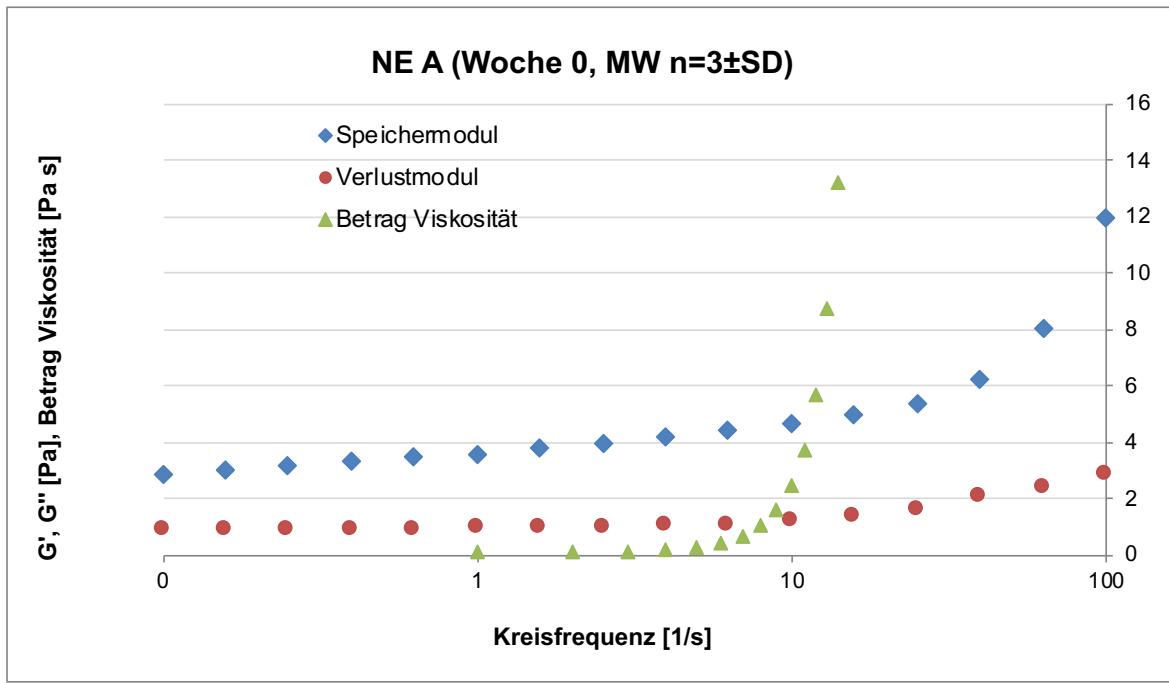


Abbildung 58: Speichermodul, Verlustmodul und Viskosität der NE A in Abhängigkeit von der Kreisfrequenz

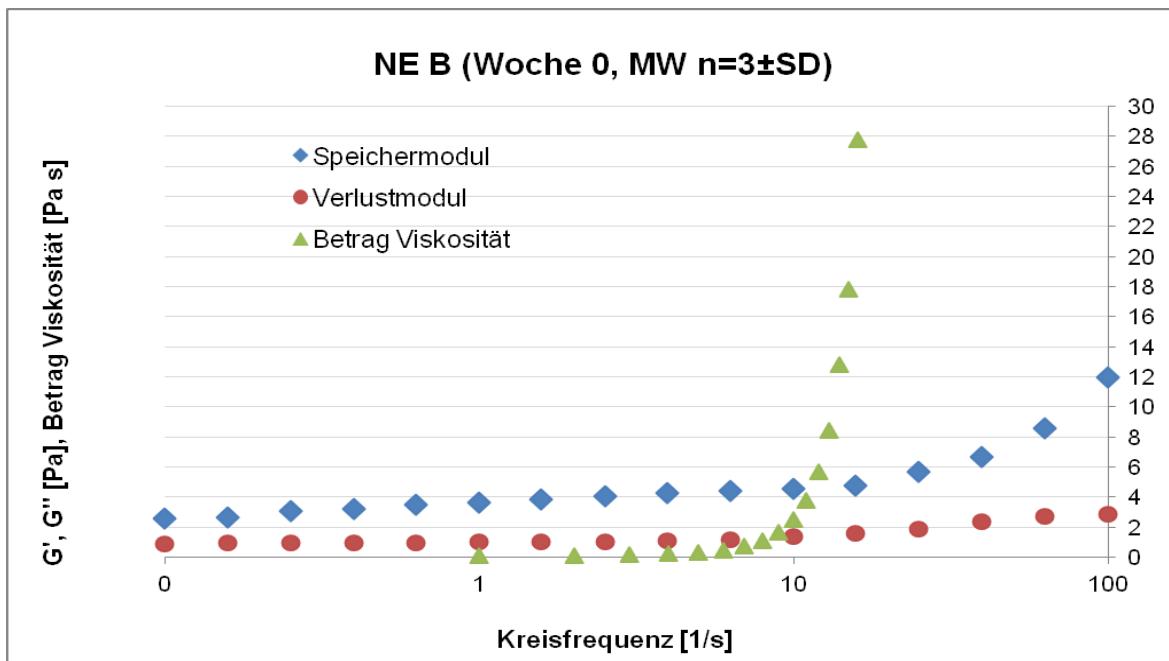


Abbildung 59: Speichermodul, Verlustmodul und Viskosität der NE B in Abhängigkeit von der Kreisfrequenz

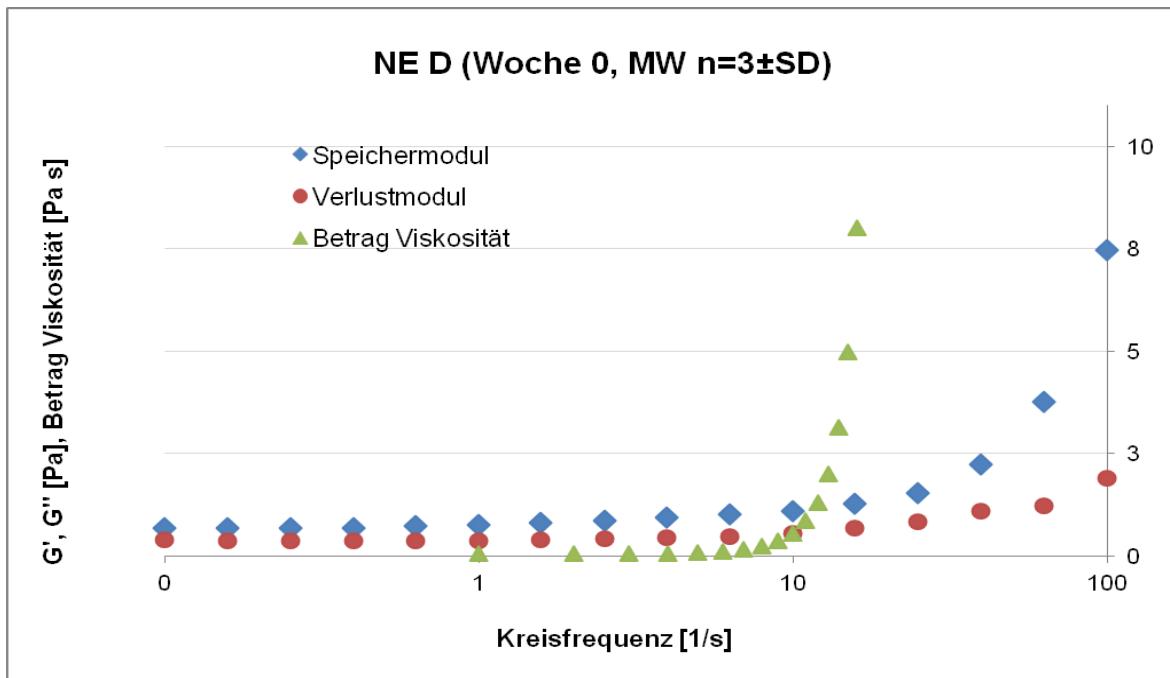


Abbildung 60: Speichermodul, Verlustmodul und Viskosität der NE D in Abhängigkeit von der Kreisfrequenz

4.1.4. Evaluierung der Messmethode für die Rheologie

Zu Beginn der rheologischen Untersuchungen wurden zwei unterschiedliche Messmethoden untersucht. Vor Inbetriebnahme wurde das Gerät auf Raumtemperatur (23°C) eingestellt. Das Rheometer von Anton Paar GmbH ist mit der Software „Rheoplus“ ausgestattet. Vor den Messungen wurde ein Motorabgleich mit dem entsprechenden Messsystem der Kegel-Platte-Methode gemacht. Dann musste man den Nullpunkt setzen. Anschließend wurde der Kegel in Hebeposition bewegt und die Probe luftblasenfrei auf die Platte aufgetragen. Danach wird auf Messposition gestellt und die Temperaturschutzkappe befestigt. Während der Messungen durfte das Rheometer keinen Erschütterungen ausgesetzt werden, da dies zu Messverzerrungen führen könnte.

Zur Methodenfindung wurden zwei Messwerkzeuge vermessen: der Messkegel CP50-1, Diameter 49.985 mm sowie der Messkegel CP25-2, Diameter 24.975 mm. Für diesen Vergleich wählte man die Proben B und D und erstellte Fließkurven; einerseits mit dem 25 mm-Tool und anderseits mit dem 50mm-Tool.

Die Abbildungen 61-68 zeigen den Vergleich der beiden Messmethoden in Bezug auf Fließ- und Viskositätskurven der Proben B und D. Wenn man die beiden Abbildungen miteinander vergleicht, kann man gut erkennen, dass die Fließ- und Viskositätskurven mit dem 50 mm-Tool weniger Schwankungen zeigen. Die Kurven-Darstellung ist präziser und zeigt weniger Unterbrechungen im linearen Verlauf. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde für alle rheologischen Untersuchungen der Nanoemulsionen die Kegel-Platte-Methode mit dem Messkegel mit dem größeren Durchmesser (49,975 mm) gewählt.

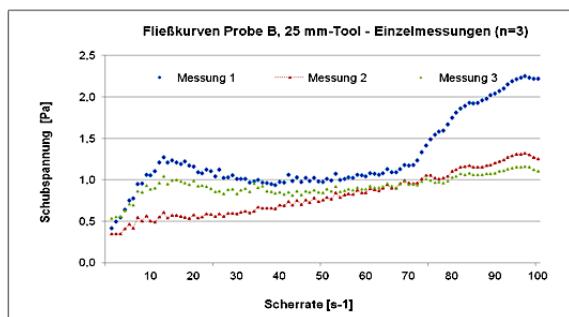


Abb.61: Fließkurve NE B (25 mm-Tool)

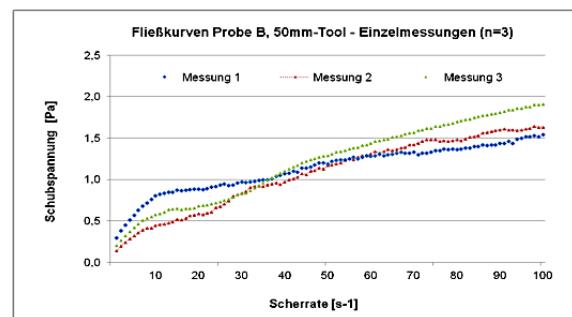


Abb.62: Fließkurve NE B (50 mm-Tool)

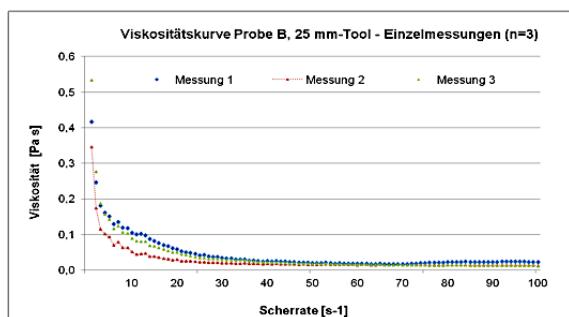


Abb.63: Viskositätskurve NE B (25 mm-Tool)

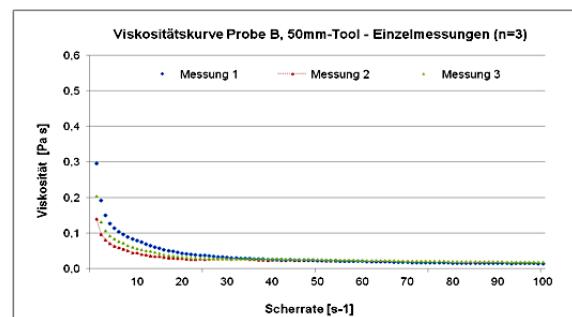


Abb.64: Viskositätskurve NE B (50 mm-Tool)

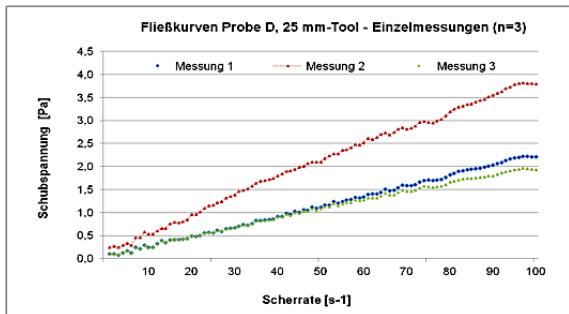


Abb.65: Fließkurve NE D (25mm-Tool)

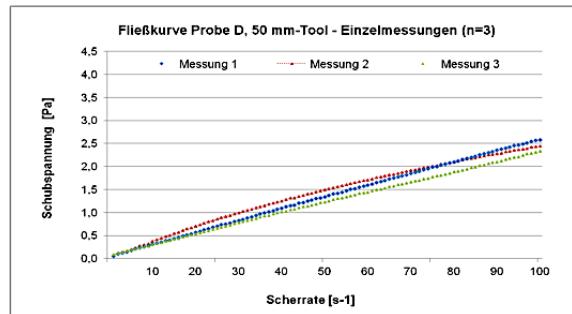


Abb.66: Fließkurve NE D (50mm-Tool)

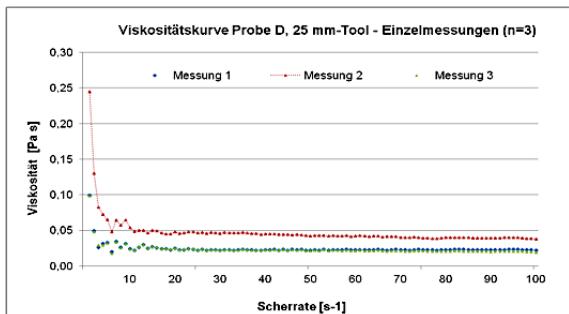


Abb.67: Viskositätskurve NE D (25mm-Tool)

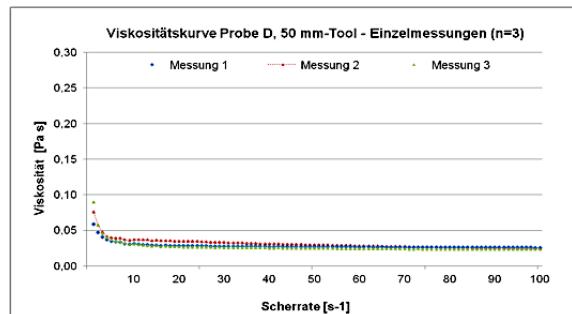


Abb.68: Viskositätskurve NE D (50mm-Tool)

4.2. Herstellung von Nanoemulsionen mit Ginseng-Extrakt

4.2.1. Herstellung der NE

Für die Herstellung der Nanoemulsionen mit Ginsengextrakt wurde aufgrund der Erkenntnisse der Vorversuche die Formulierung B gewählt, da sich diese in Bezug auf Partikelgröße, PDI und Zetapotential über 12 Wochen als stabilere Formulierung im Vergleich zu Nanoemulsion D gezeigt hatte.

Die Formulierung wurde wie gefolgt hergestellt:

Emulsion Typ B:	Zusammensetzung in % m/m	5 Ansätze à 20 g
MCT	20 %	4,0 g
D1809 (HLB 9)	1,5 %	0,3 g
D1811 (HLB 11)	1,5 %	0,3 g
Kaliumsorbat	0,1 %	0,02 g
Ginsengextrakt	2,0 %	0,4 g
Aqua ad	100 %	14,98 g

Zunächst wurde eine erste Testformulierung *Gins1* hergestellt, um den Herstellungsprozess mit Ginsengextrakt zu untersuchen. Die Herstellung erfolgte wie zuvor beschrieben. Man erwärmte und löste die Hilfsstoffe und den Ginseng-Extrakt in der Wasserphase auf einer beheizten Magnetrührplatte (530 rpm, 60°C, 20 Minuten). Anschließend wurden die daneben erwärmte Ölphase mit der Wasserphase vereint und weiterhin auf der beheizten Magnetrührplatte (530 rpm, 60°C) für 10 Minuten gerührt. Auch hier wurde ein Vorhomogenisieren mit einem Rotor-Stator-Labormixer⁶ (4 Minuten, 2500 rpm) durchgeführt. Eine weitere Temperaturerhaltung auf 60°C unter Rühren war hier ausschlaggebend für eine erfolgreich Herstellung der Nanoemulsion. Das Abkühlen und die Temperaturabnahme führten die Probe in eine halbfeste, gelierte Form über. Das erneute Erhitzen nach der Behandlung mit dem Ultraturrax war hier besonders wichtig. Die halbfeste Konsistenz hätte den Vorgang mit dem Hochdruckhomogenisator unmöglich gemacht. Erneutes Erhitzen und Rühren für ca. 10-20 Minuten versetzte die Formulierung wieder in eine fluide Konsistenz für die weitere Verarbeitung.

⁶ UltraTurrax Omni 5000 International

Hochdruckhomogenisierung

Da die Probe sehr schnell eine feste Konsistenz einnahm, war es sehr wichtig, dass sie vor dem Hochdruckhomogenisieren warmgehalten und der Homogenisator vorwärmt wurde. Das Gerät wurde zunächst entsprechend mit Aqua dest. und EtOH 70% v/v auf die entsprechende Betriebstemperatur gebracht.

Danach wurde etwa die Hälfte der Probe eingefüllt und mit leichtem Druck vorhomogenisiert. Anschließend wurde die zweite Hälfte hinzugefügt und alles gemeinsam mit leichtem Druck (ca. 200 bar) vorhomogenisiert. So wurden 4 Zyklen durchgeführt. Anschließend wurde der Druck auf 500 bar erhöht und die Probe 4x durchgelassen. Der Druck wurde weiterhin stufenweise erhöht, bis man auf die gewünschten 1000 bar kam. Ab diesem Moment wurden 20 Zyklen bei 1000 bar gezählt. Zusammenfassend ergab sich also aufgrund der Einarbeitung des Extraktes und der veränderten Viskosität ein abgewandeltes Herstellungsprotokoll.

Danach wurden vier weitere Ansätze der Formulierung (*Gins2 – 5*) hergestellt, um die Herstellungsmethode zu standardisieren und nochmals zu überprüfen. Es bestätigte sich, dass die Temperatur bei der Herstellung der Emulsion eine sehr wichtige Rolle spielte. Die Probe musste unbedingt direkt vor dem Hochdruckhomogenisieren nochmals auf 60°C erwärmt werden. Zudem musste beim Homogenisator möglichst rasch Druck aufgebaut werden. Das exakte Protokoll umfasste eine Vorbehandlung im Homogenisator von 0-1000 bar mit 20 Zyklen (stufenweise Erhöhung des Drucks → 200 bar, 300 bar, 500 bar, 750 bar, 900 bar - zu je 4 Zyklen). Nach Erreichen der 1000 bar Druck wurden 10 Homogenisationszyklen durchgeführt.

Messung und Stabilitätsuntersuchungen der Proben

Am Tag 1 nach Herstellung wurden bei allen fünf Proben Partikelgröße, PDI, Zeta-potential, pH-Wert und rheologische Eigenschaften bestimmt. Mit den Proben *Gins1* und *Gins3* wurde einmalig eine vollständige rheologische Grundcharakterisierung durchgeführt (lineare und oszillatorische Messungen).

Die Proben *Gins2*, *Gins4* und *Gins5* wurden für Stabilitätsmessungen über 4 Wochen herangezogen. Hier wurden Partikelgröße, PDI, Zetapotential und pH-Wert gemessen. Ebenso wurden zur Beurteilung der physikalischen Stabilität einfache Fließkurven vermessen. Die Messergebnisse wurden mit der wirkstofffreien Basis-Formulierung B verglichen.

4.2.2. Charakterisierung und Stabilitätsuntersuchungen

4.2.2.1. Makroskopische Untersuchungen

Im Verlauf der Herstellung zeigten die Proben nach dem Vereinen von Wasser- und Ölphase eine leichte Phasentrennung. Diese ist in Abbildung 69 dargestellt. Nach dem Rühren mit dem Ultraturrax und dem Hochdruckhomogenisieren war keine Phasentrennung mehr sichtbar. Die fertige Emulsion hatte nicht mehr das milchig-reinweiße Aussehen wie bei der wirkstofffreien geruchsneutralen Nanoemulsion B. Die Nanoemulsion B mit Ginseng-Extrakt wies eine leicht bräunliche Farbe sowie einen durchaus angenehmen Karamell-artigen Geruch auf. Auch die Konsistenz der Ginseng-Nanoemulsion B war etwas dickflüssiger als bei der wirkstofffreien Formulierung B.

Im Laufe der vier Wochen Lagerung sah man keine Instabilitäten wie Phasentrennung oder Sedimentation bei den Ginseng-Nanoemulsionen. Allerdings war nach Entnahme aus dem Kühlschrank vor den jeweiligen Messungen eine Aufrahmung am Deckel und Gefäßrand feststellbar (Abbildung 70). Diese konnte durch kurzes manuelles oder mechanisches Rühren am Vortex®-Mixer vor den Zetasizer-Messungen behoben werden.



Abbildung 69: Ginseng-NE während Herstellung: Phasentrennung



Abbildung 70: Ginseng-NE nach 3 Wochen Lagerung: Aufrahmung am Gefäßrand

4.2.2.2. Ergebnisse Zetasizer

Zur Beurteilung der physikalisch-chemischen Stabilität wurden Messungen mit dem Zetasizer durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in den Abbildungen 71 bis 73 dargestellt. Die erhobenen Parameter waren der hydrodynamische Durchmesser, das Zetapotential und der PDI. Die Werte wurden grafisch mit jenen der

wirkstofffreien Nanoemulsion B verglichen. Alle Messungen wurden pro gemessener Probe dreimal durchgeführt. Der Mittelwert daraus mit Standardabweichung wird in den Diagrammen dargestellt (n=3 mit STABW).

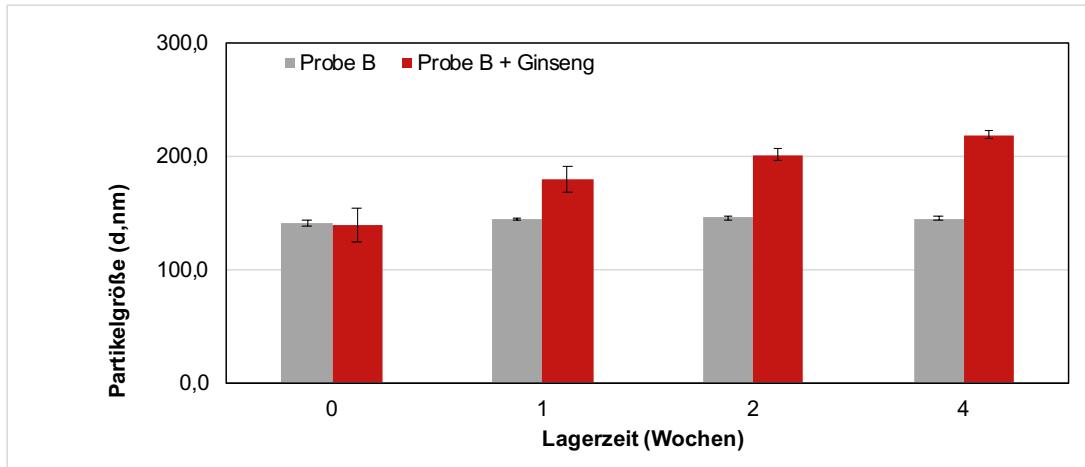


Abbildung 71: Durchschnittliche Partikelgröße (hydrodynamischer Durchmesser) der NE B mit und ohne Ginsengextrakt über 4 Wochen

In Abbildung 71 ist die Messung der mittleren Partikelgröße über vier Wochen dargestellt. Man kann gut erkennen, dass zu Beginn der Herstellung beide Nanoemulsionen eine Partikelgröße um 130 nm aufweisen. Die mittlere Partikelgröße ist also durch Einbau des Ginsengextrakts nach Herstellung unverändert, nimmt jedoch im Laufe der Lagerung bereits innerhalb von vier Wochen deutlich stärker zu. Die Formulierung war nach Einbau des Ginsengextrakts also weniger stabil, was auch im PDI sichtbar war. Möglicherweise fanden Agglomerationsprozesse statt.

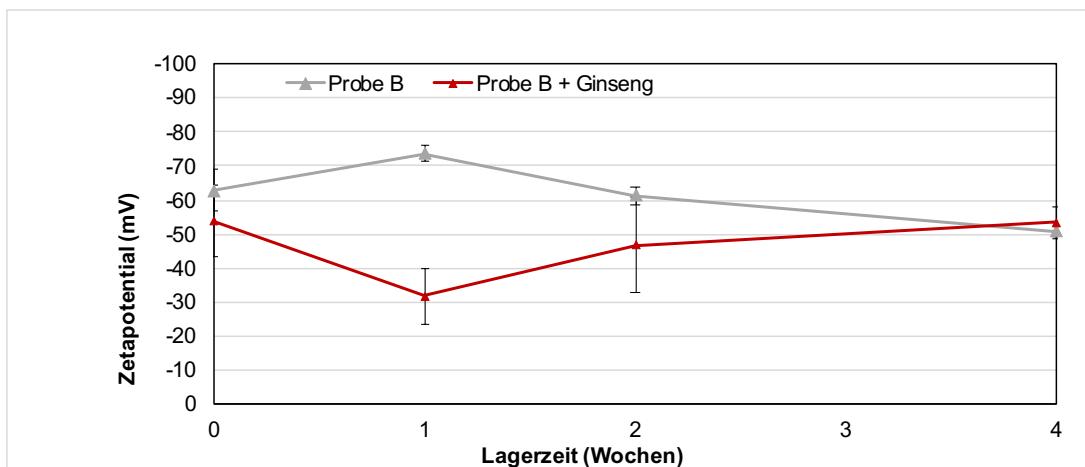


Abbildung 72: Zetapotential der NE B mit und ohne Ginsengextrakt über 4 Wochen

Auch beim Zetapotential bewirkte der Einbau des Extraks eine Veränderung. In Abbildung 72 ist zu erkennen, dass sich das Zetapotential bei der Messung in Woche eins bereits unterschied – es wies einen niedrigeren negativen Betrag auf. Die Messung wurde wiederholt, die Ergebnisse waren aber konstant. Die Messqualität wurde auch von der Software mittels *Expert Advice* als gut bewertet.

Die Zetapotential-Werte wiesen Schwankungen innerhalb der vier Wochen auf, weshalb eine abschließende Beurteilung hier schwierig ist. Weitere Messungen sind notwendig; in jedem Fall dürfte sich der Einbau des Extraks destabilisierend auswirken.

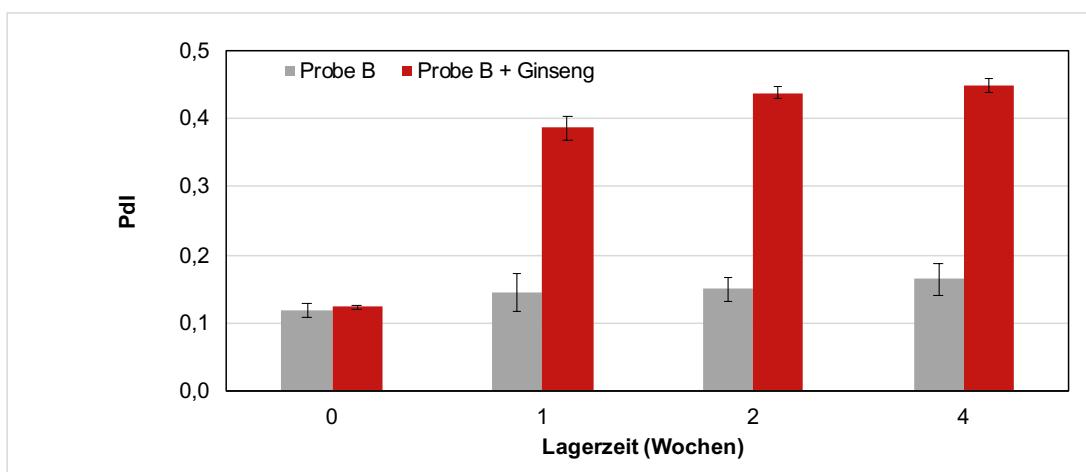


Abbildung 73: PDI der NE B mit und ohne Ginsengextrakt über 4 Wochen

Diese Annahme wurde durch die PDI-Messung bestätigt (Abbildung 73). Während beide Formulierungen unabhängig von der Einarbeitung des Ginsengextrakts nach Herstellung Werte um 0,1 zeigten, stieg der PDI im Fall der Ginseng-Nanoemulsionen innerhalb von nur vier Wochen auf Werte über 0,4.

4.2.2.3. Ergebnisse der pH-Wert-Messungen

Auch der pH-Wert der Formulierung wurde durch Einbau des Ginsengextrakts verändert (Abbildung 74). Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei Messungen pro Probe.

Man sieht, dass die Formulierung mit Ginseng nach Herstellung einen deutlich niedrigeren pH-Wert aufweist. Mit einem pH um 5,6 ist diese Nanoemulsion in einem günstigen Bereich für die dermale Applikation. Dieser Wert blieb über zwei Wochen

stabil, war jedoch nach vier Wochen deutlich erhöht. Ob dies von mikrobieller Verunreinigung oder einem chemischen Abbau von Extraktbestandteilen herrührt, muss in weiteren Studien geklärt werden.

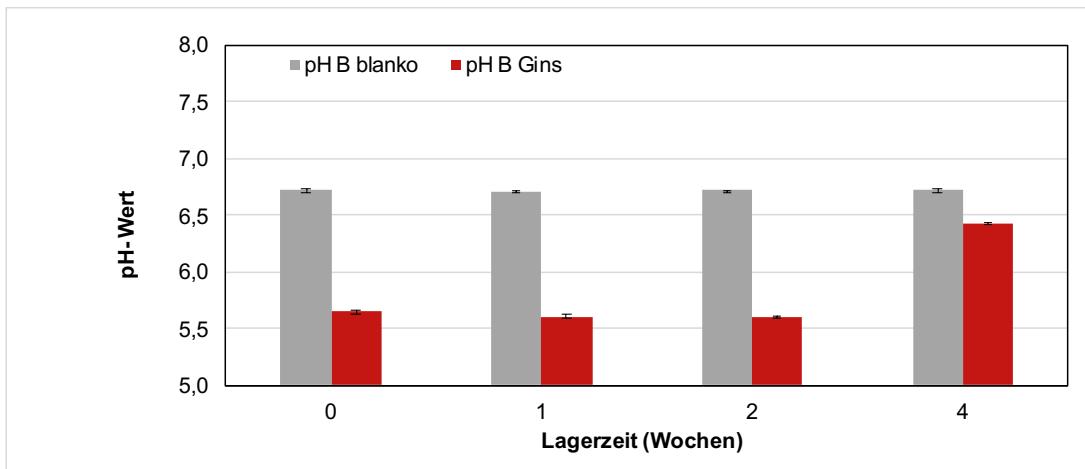


Abbildung 74: pH-Wert der NE B mit und ohne Ginsengextrakt über 4 Wochen

4.2.2.4. Ergebnisse der rheologischen Messungen

Fließkurven

Um die rheologischen Eigenschaften der Nanoemulsion Typ B mit *Panax Ginseng*-Extrakt zu untersuchen, wurden zuerst Viskositätskurven erstellt. Dies wurde an drei Proben (Gins 2,4,5) durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert mit Standardabweichung der drei Proben in Abbildung 75 dargestellt. Die Viskositätskurve ist mit einer Scherrate von 1-100/s entsprechend 100 Messpunkten dargestellt. Die Viskosität der Probe nimmt bis zu einer Scherrate von 10/s stärker ab; ab 15/s bleibt die Viskosität weitgehend unverändert. Die gleichen Ergebnisse brachte auch die Messung der wirkstofffreien Nanoemulsion B. Mit Zunahme der Scherrate nahm die dynamische Viskosität ab; auch hier lag also scherverdünnendes Fließverhalten vor.

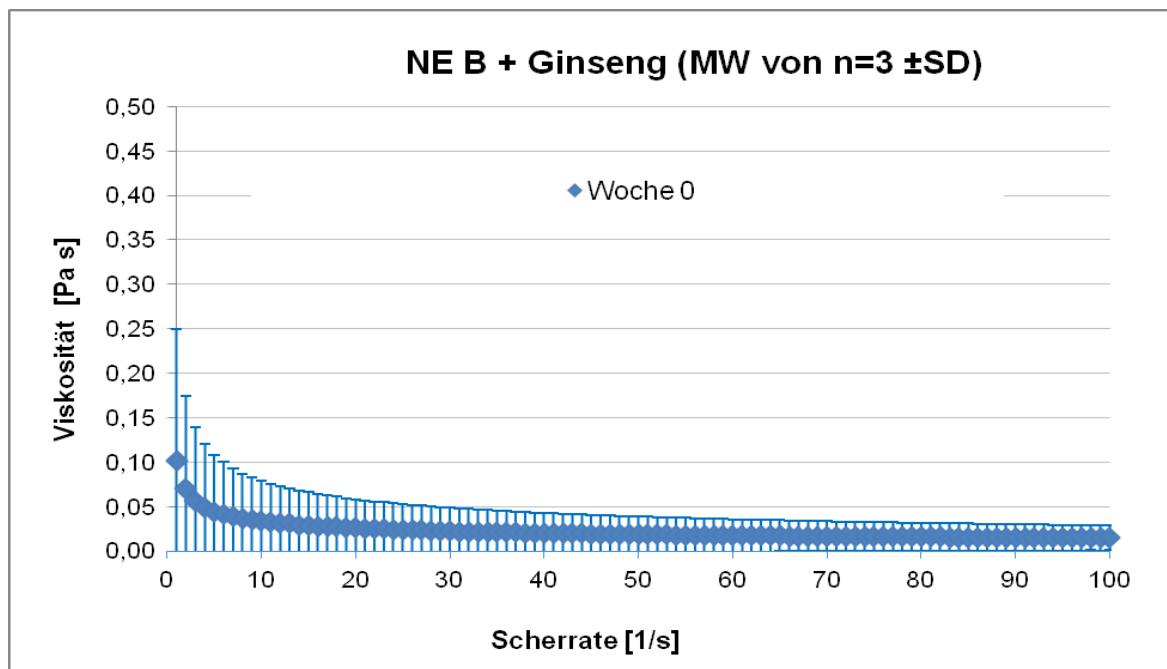


Abbildung 75: Viskositätskurve der Nanoemulsion Typ B mit *Panax Ginseng*-Extrakt

Um die Veränderung der dynamischen Viskosität während der Lagerung über vier Wochen grafisch darzustellen, wurden die Messwerte wie bei der wirkstofffreien Nanoemulsion bei einer Scherrate von 10/s verglichen (Abbildung 76). Zu Beginn zeigt die Probe eine relativ geringe Viskosität unter 150 mPa. Im Laufe der vier Woche stieg dieser Wert auf Werte um 1100 mPa +/- 300 mPa. Man erkennt, dass die Proben durch die Lagerung viskoser geworden sind. Das erklärt auch die makroskopische Erkenntnis der Aufnahme. Die Probe war am Ende der vier Wochen dickflüssiger als zum Herstellungszeitpunkt; eine Art Eindickung konnte festgestellt werden, was die übrigen Ergebnisse der Stabilitätsprüfung bestätigte.

Um diesen Prozess zu verdeutlichen ist in Abbildung 77 ein Vergleich der Viskositätskurven der Nanoemulsion Typ B mit *Panax Ginseng*-Extrakt über vier Wochen mit einer Scherrate von 1-100/s dargestellt. Auch hier ist die Viskositätszunahme im Verlauf der Lagerung bereits zu Messbeginn bei Scherrate 0/s erkennbar. Bei allen vier Kurven ist die Scherverdünnung deutlich erkennbar.

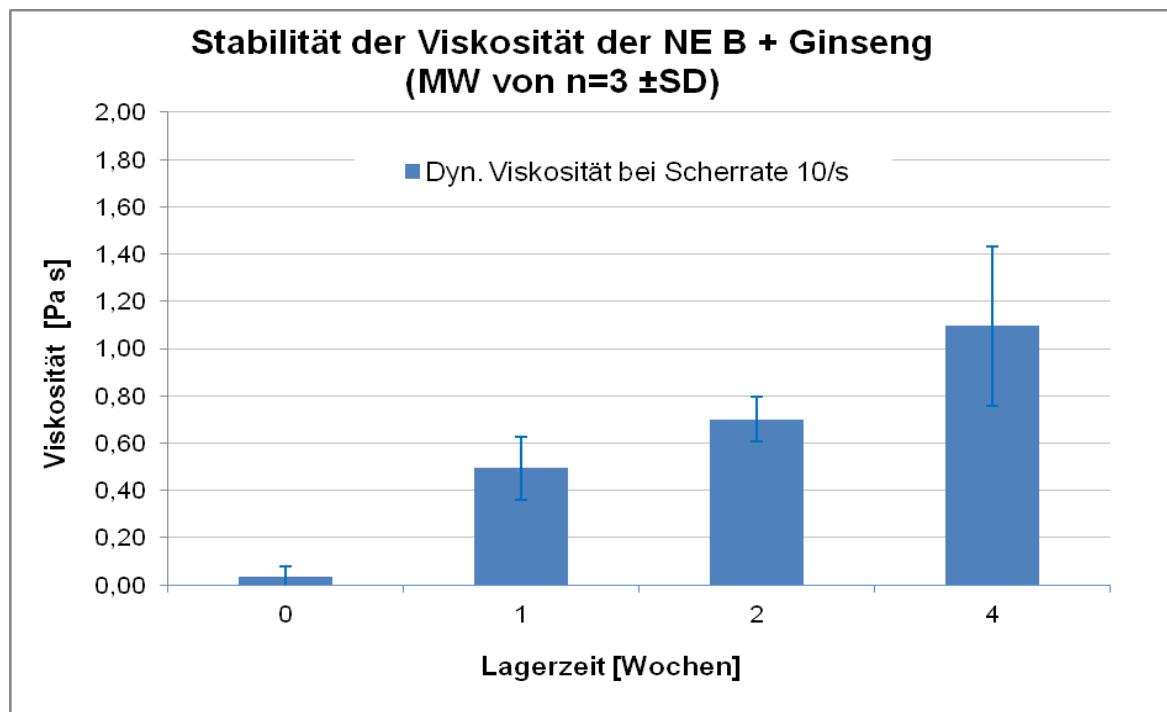


Abbildung 76: Veränderung der dynamischen Viskosität der Ginseng-haltigen Nanoemulsion B über 4 Wochen

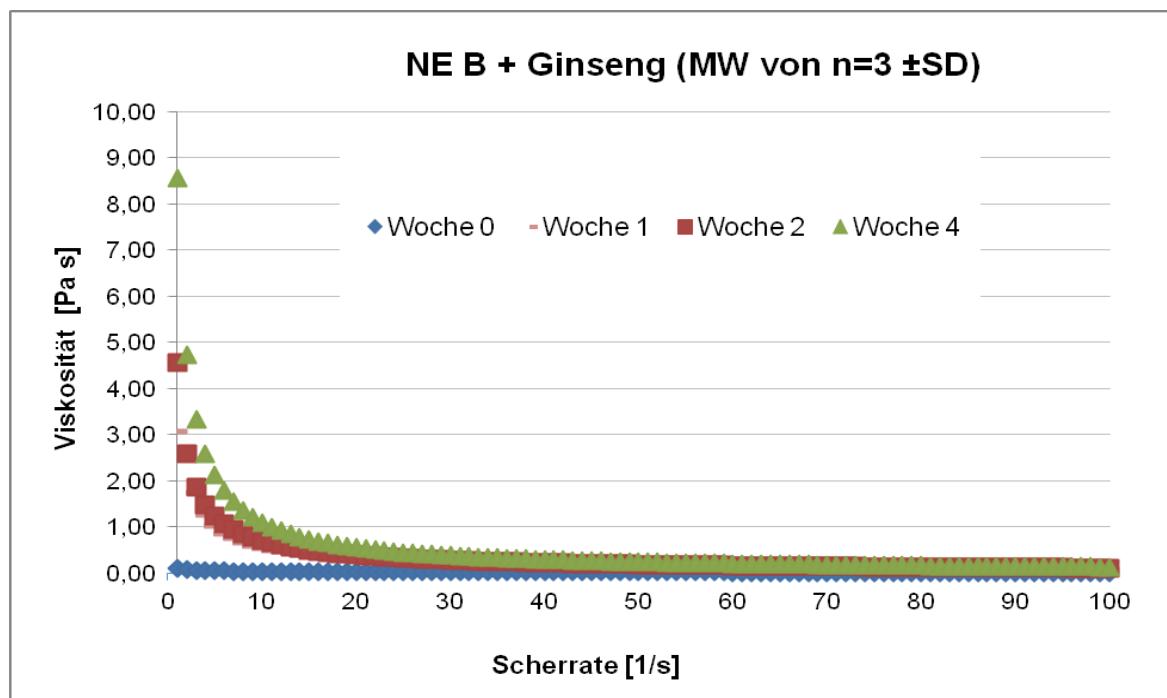


Abbildung 77: Viskositätskurven der Ginseng-haltigen Nanoemulsion B über 4 Wochen (Scherrate 1-100/s)

Oszillation

Eine anfängliche rheologische Charakterisierung der Nanoemulsion Typ B mit *Panax Ginseng*-Extrakt mittels Oszillationsmessungen wurde durchgeführt (Abbildung 78 bis 81). Für diese Untersuchungen wurden die Proben *Gins1* und *Gins3* herangezogen. Trotz der zu geringen Probenzahl wurde für den Überblick gemittelt; die Standardabweichung wurde jedoch zur besseren Übersicht nicht grafisch dargestellt.

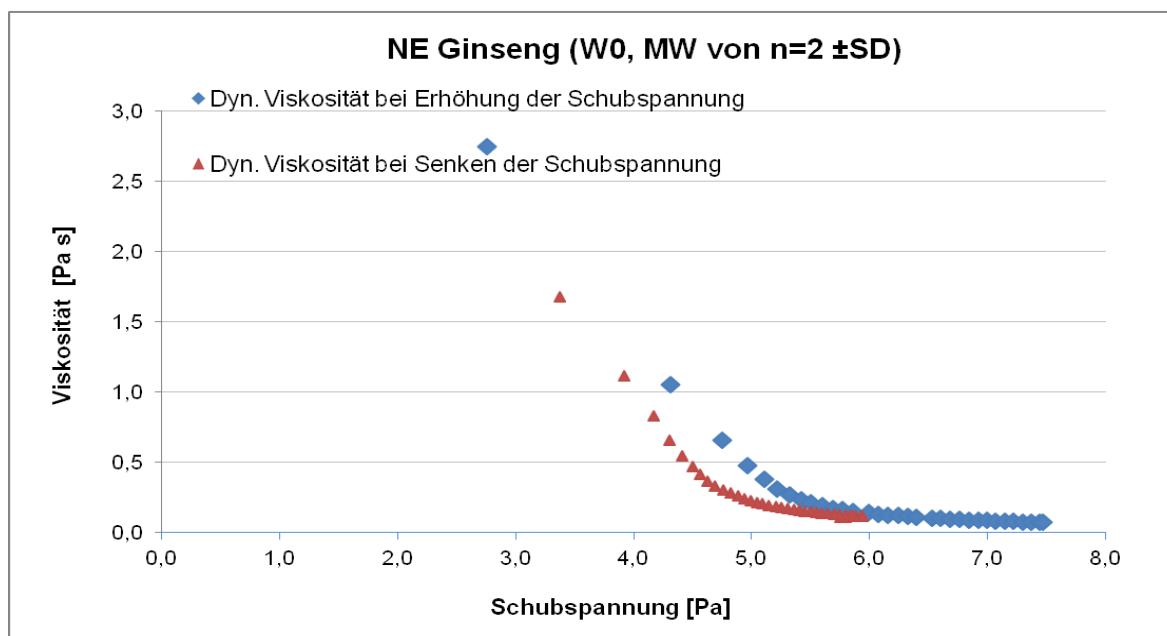


Abbildung 78: Dynamische Viskosität der NE Typ B mit *Panax Ginseng*-Extrakt

Die Ergebnisse einer Messrampe mit steigender und dann sinkender Schubspannung zeigten eine reversible Veränderung der dynamischen Viskosität (Abbildung 78). Des weiteren lag der Fokus auf der Ermittlung von elastischem und viskosem Modulus der Ginseng-haltigen Nanoemulsion (Abbildung 79). Wie in der Abbildung zu sehen ist, überwiegt das Speichermodul. Das bedeutet, dass der elastische Anteil der Probe höher ist als der viskose Anteil. Dies entspricht den Ergebnissen der wirkstofffreien Nanoemulsion B. Allerdings waren die Zahlenwerte selbst nach Einbau des Extrakts deutlich verändert.

Die wirkstofffreie NE B wies ein Speichermodul von durchschnittlich 4,5 Pa auf, während die entsprechenden Werte der Ginseng-Nanoemulsion bei 17,5 Pa lagen.

Auch der viskose Anteil war bei der Ginseng-haltigen Nanoemulsion erhöht. Bei einer Schubspannung von 5000 mPa überwiegt bei der Ginseng-haltigen Nanoemulsion noch immer der elastische Anteil.

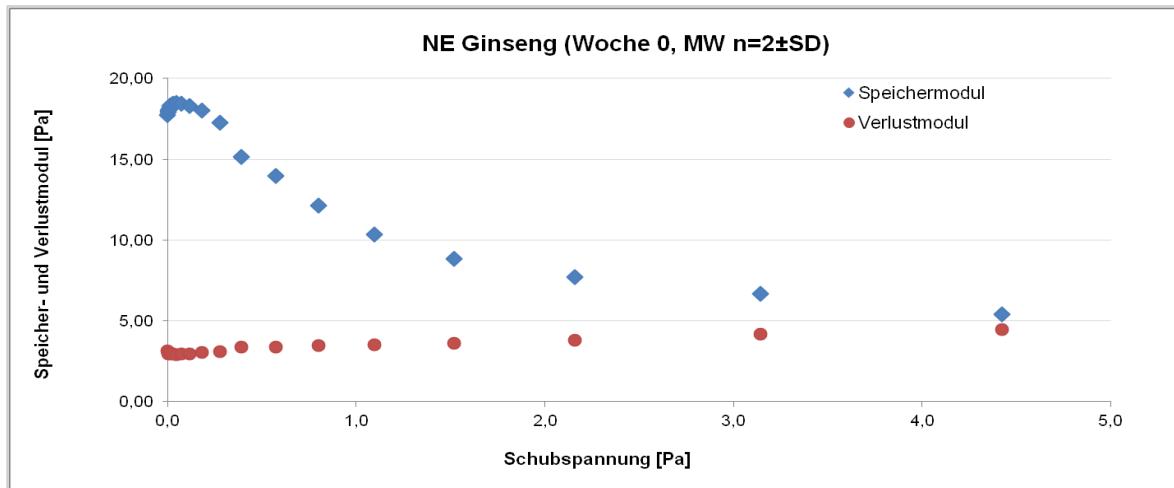


Abbildung 79: Speicher- und Verlustmodul der NE Typ B mit *Panax Ginseng*-Extrakt in Abhängigkeit von der Schubspannung

Die Ermittlung des LVE-Bereichs ist in Abbildung 80 dargestellt. Man sieht, dass im Bereich geringer Deformation die Probe stabile Eigenschaften zeigt. Die Kurven des Speicher- und Verlustmoduls verlaufen parallel. Eine beginnende Veränderung des elastischen Modulus ist bei etwa 1% Deformation zu sehen, der Schnittpunkt der beiden Kurven tritt deutlich später auf.

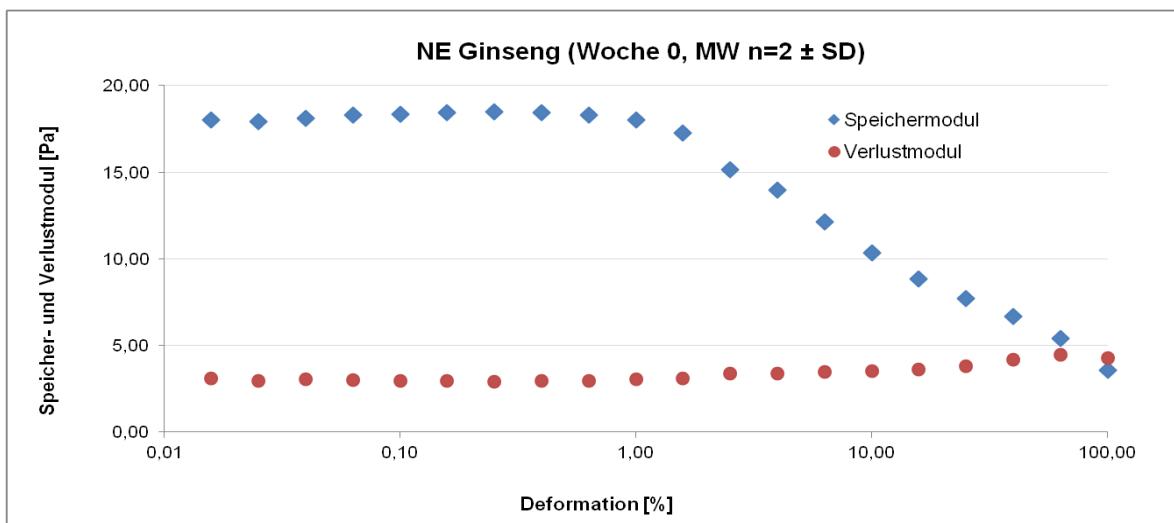


Abbildung 80: Speicher- und Verlustmodul der NE Typ B mit *Panax Ginseng*-Extrakt in Abhängigkeit von der Deformation

Der Vollständigkeit halber sind auch die Ergebnisse in Abhängigkeit von der Kreisfrequenz dargestellt (Abbildung 81). Die Formulierung zeigt eine gute Ruhestrukturstärke. Für elastischen und viskosen Modulus sind relativ konstante Kurven bis zu einem Frequenzbereich von 20/s zu beobachten. Im Hochfrequenzbereich kommt es zu Veränderungen der Struktur.

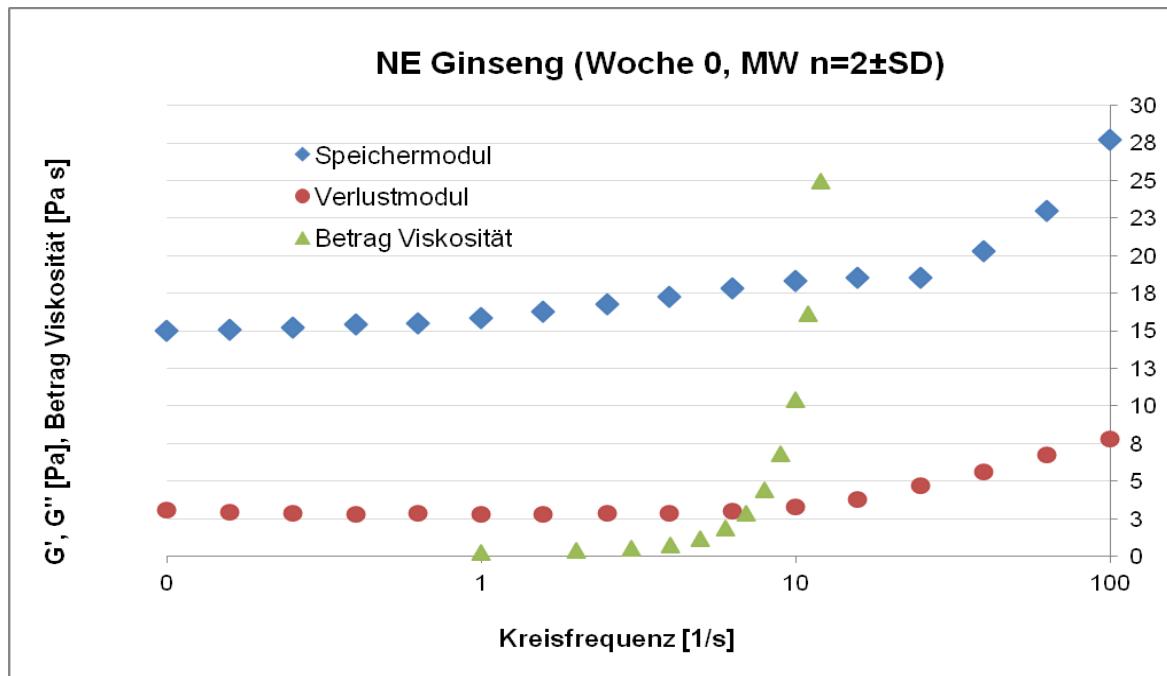


Abbildung 81: Speichermodul, Verlustmodul und Viskosität der NE Typ B mit *Panax Ginseng*- Extrakt in Abhängigkeit von der Kreisfrequenz

4.2.3. Permeationsversuche mit Franz-Diffusionszellen

Für einen ersten Einblick in das Diffusionsverhalten der im Ginsengextrakt enthaltenen Ginkgoside wurden einfache Permeationsstudien mit Franz-Diffusionszellen durchgeführt.

Hierfür wurden frische Nanoemulsionen Typ A (3% Zuckertensid HLB 9) und B (Zuckertensid 1,5% HLB 9 und 1,5% HLB 11) mit *Panax Ginseng*-Extrakt hergestellt. Die verwendete Methodik entspricht jener in Kapitel 4.2.1. beschriebenen. Zu Vergleichszwecken wurde eine 2%ige wässrige Lösung des Ginseng-Extrakts verwendet. Hierfür wog man 0,2 g *Panax Ginseng*-Extrakt ein und füllte mit Aqua destillata auf 10,0 g auf. Dies wurde bei Raumtemperatur (25°C) ohne Erwärmen durchgeführt, da der Extrakt ausgezeichnet wasserlöslich war.

Für die Diffusionsstudien wurden je vier Diffusionszellen mit NE Typ A, NE Typ B sowie der wässrigen Ginsengextrakt-Lösung angesetzt, um Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Für die Ergebnisse wurde der Mittelwert berechnet.

Für die Franz-Zell-Versuche wurde der Einfachheit halber porzine Bauchhaut verwendet (Vorbehandlung im Schlachthof, Preparation 12/2018, 700 µm Hautdicke mittels Dermatom geschnitten, Lagerung bei -18°C). Vor den Versuchen wurde die Haut aufgetaut und auf 1x1cm Hautstücke zugeschnitten. Die exakte Diffusionsfläche entsprach der Fläche der Diffusionszellen (ca. 1 cm²). Es wurden jeweils 500 mg Probe durch genaue Einwaage auf die Hautstücke aufgetragen und der Glasauflsatz der Donorkammer wurde mit Parafilm® bedeckt. Für das Akzeptormedium wurde am Vortag frischer Phosphatpuffer mit pH 7,45 hergestellt. Dieser setzte sich wie folgt zusammen:

Phosphatpuffer:

0,19 g Mono-Kaliumphosphat

2,38 g Dinatriumhydrogenphosphat (12*H₂O)

8,00 g Natriumchlorid

Die Substanzen wurden eingewogen, in einem Messkolben auf 1000,0 ml bis zum Meniskus aufgefüllt und zur Beschleunigung des Lösungsvorgangs ins Ultraschallbad gestellt. Der Phosphatpuffer wurde luftblasenfrei bis zum Meniskus (ca. 2,0 ml) in die Akzeptorkammer gefüllt; der Hals zur Probenentnahme wurde mit Alufolie verschlossen. Die Abdeckungen dienten dem Schutz der Probe vor Verdunstung. Das Akzeptormedium wurde mittels kleinem Magnetrührstäbchen mit 800 U/min gerührt. Das gesamte Akzeptormedium wurde nach 2,4,6,8,24 und 28 Stunden als Probe entnommen und die Kammern wurden mit frischem, auf 32°C temperiertem Puffer wieder befüllt. In Abbildung 82 sind die 12 Franz-Diffusionszellen abgebildet. Das auf 32°C temperierte Wasserbad simuliert die Temperatur der Hautoberfläche.

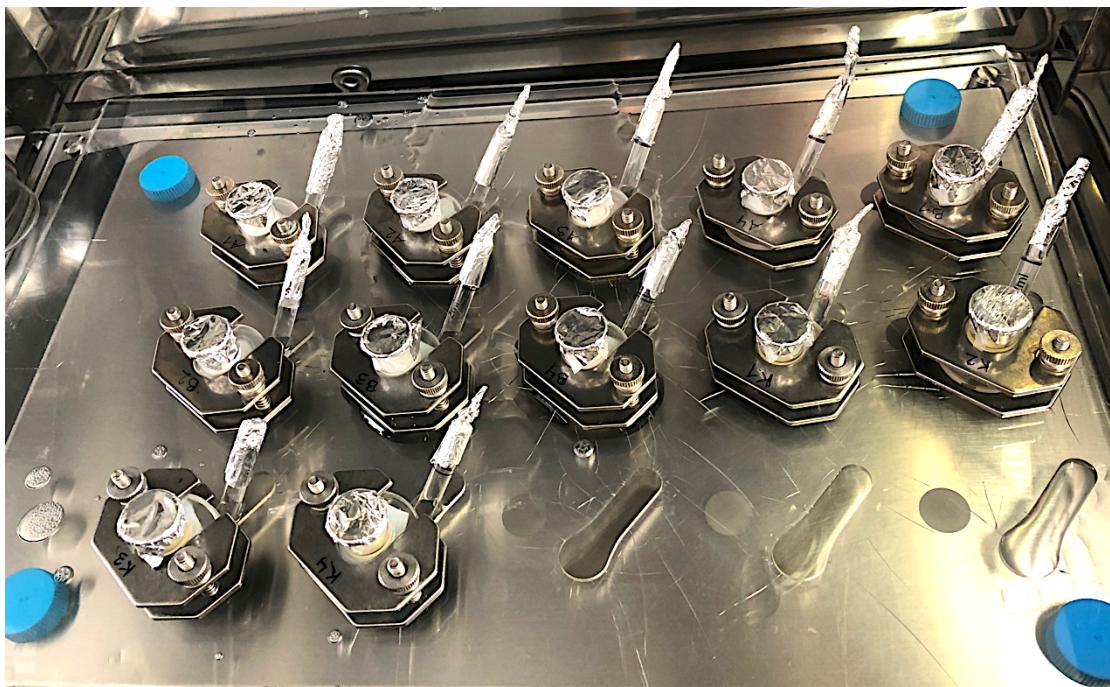


Abbildung 82: Franz-Diffusionszellen im auf 32°C temperierten Wasserbad

Die seitlich entnommenen Proben (2,0 ml) wurden mit einer Pasteurpipette in Eppendorfgefäß übertragen (Abbildung 83 a-c). Danach wurden die Proben für sechs Minuten bei 12.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Für die HPLC-Analyse entnahm man 50 µl pro Probe mit einer Eppendorf®-Pipette aus dem unteren Drittel des Gefäßes, da sich durch das Zentrifugieren an der Oberfläche die Ölphase absetzte. Man überführte die 50 µl direkt in Vials (Abbildung 84), die zur Analytik an die Division für Pharmakognosie übermittelt wurden.



Abbildung 83a-c: Akzeptormedium-Proben von NE A, NE B und der wässrigen Ginsengextrakt-Kontrolllösung für die Zentrifuge (Eppendorf®-Tubes)



Abbildung 84: Autosampler-Fläschchen für die HPLC-Analytik

4.2.3.1. Ergebnisse der Permeationsversuche

Da die Analytik der Proben in Zusammenarbeit mit Dr. Ammar Tahirs Team der analytischen Chemie und Helene Hinterberger in der Division für Pharmakognosie durchgeführt wurde, wird hier nur kurz auf die Vorgehensweise eingegangen.

Methode und Evaluierung der Kalibrierkurve

Für die Analytik der Ginsenoside wurde ein UHPLC mit MS-Detektion durch LTQ-XL-Massenspektrometer angewandt. Die MS-Scans wurden mit einem Masse zu Ladung (m/z)- Bereich von 300 bis 900 sortiert.

Hierbei wurden die Ginsenoside Rb1 und Rg1 ausgewertet, da diese als Standards verfügbar waren. Die Standards wurden bei einer Konzentration von 1 mg/ml mit Methanol als Lösungsmittel gemessen. Es wurde die Retentionszeit und die molare Masse in g/mol bestimmt und mit den tatsächlichen molaren Massen verglichen. Um die Reaktion des Messgeräts in Bezug auf die Analyten zu ermitteln, wurde eine Kalibrierung durchgeführt. Ausgehend von der Stammlösung 1 mg/ml von Ginsenosid Rb1 und Rg1 wurden Verdünnungsreihen erstellt. Die daraus resultierende Kalibrierkurve diente zur Quantifizierung unbekannter Konzentrationen der Analyten sowohl in den Nanoemulsionen selbst als auch den diffundierten Mengen in den Permeationsversuchen.

Ergebnisse

Das erste Ginsenosid, das eluiert wurde, war Rg1 bei Minute 1,6 mit einer molaren Masse von 846 g/mol. Als mobile Phase A wurde 0,2%ige wässrige Ameisensäure und als mobile Phase B 0,2%ige Ameisensäure in Acetonitril verwendet. Die molare Masse von Ameisensäure beträgt 46 g/mol [78]. Die Differenz von Peak und mobiler Phase würde 800 g/mol ergeben, was einer tatsächlichen molaren Masse des Rg1

von 801 g/mol [79] nahekommt. Ein Addukt der Probe mit dieser Substanz könnte das erklären.

Die Retentionszeit des Ginsenosids Rb1 beträgt 2,53 Minuten und auch hier war die Differenz mit der Masse der Ameisensäure zu erkennen. Der Massenpeak ergab 1154 g/mol und mit der Differenz 1108 g/mol. Die tatsächliche molare Masse des Ginsenosids Rb1 ist 1109 g/mol [79]. In Abbildung 85-88 sind die Ergebnisse der Standards dargestellt.

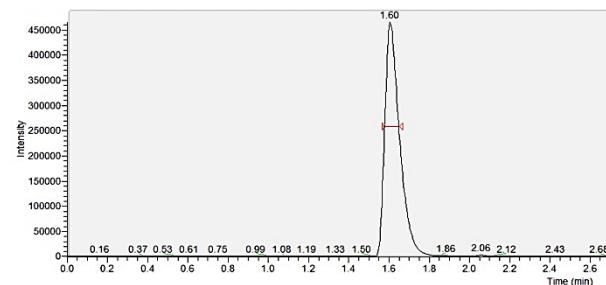


Abbildung 85: Peak des Rg1

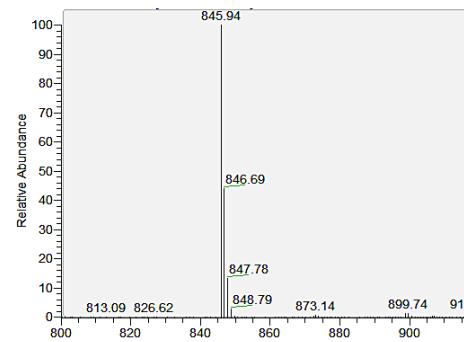


Abbildung 86: Masse g/mol Rg1

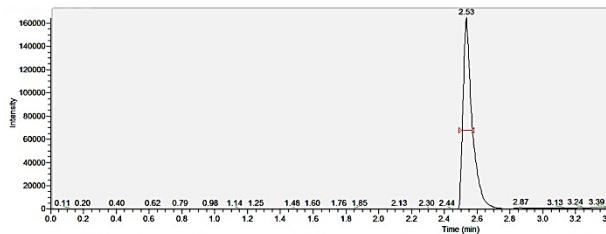


Abbildung 87: Peak des Rb1

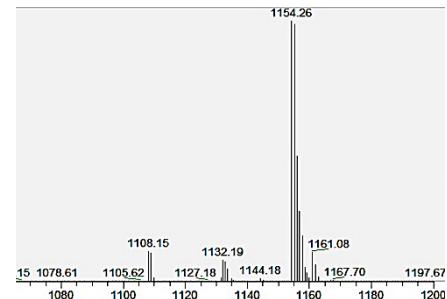


Abbildung 88: Masse g/mol Rb1

Anschließend wurde nach diesen Ergebnissen die Kalibrierkurve erstellt.

Vor den Messungen der Proben aus der Franz-Diffusionszelle wurden die davor herstellten Proben *Gins2,4,5* ($n=3$) in einem Verhältnis von 1:100 mit Aqua destillata zur Analyse gebracht, um einen Vergleich zu den frisch hergestellten NE für den Franzzellen-Versuch zu erlangen.

Die berechneten Konzentrationen aus der vorher evaluierten Messmethode der beiden Ginsenoside Rb1 und Rg1 waren bei allen Nanoemulsionen in einem sehr ähnlichen Ausmaß. Sie unterschieden sich geringfügig und es gab nur kleine Schwankungen. Diese könnten durch ungenügendes Mischen der Probe und Bildung von

Konzentrationszonen entstanden sein. Die Messergebnisse der Franz-Zellen zeigten, dass die Ginsenoside Rg1 und Rb1 in konstanter Konzentration die Hautbarriere durchdringen. Die quantifizierten Werte für das Ginsenosid Rg1 waren sowohl bei Nanoemulsion A als auch bei Nanoemulsion B höher als für das Ginsenosid Rb1. Bei allen drei Proben (NE A, B und wässrige Lösung) wurde ein Maximum nach 24h festgestellt. Das lässt sich dadurch erklären, dass zwischen der Probenentnahme nach 8 Stunden und nach 24 Stunden eine große Zeitspanne lag. Die Menge der Ginsenoside konnte in dieser Zeit akkumulieren und höhere Konzentrationen aufweisen. Für Rg1 wurden Konzentrationen um die 30 µg/ml erfasst. Für Rb1 lagen die Höchstwerte in NE A und B bei 10 µg/ml. Das zeigt ein geringeres Eindringvermögen des Ginsenosids Rb1 in diesen Formulierungen in die Haut. Messungen nach 4, 6 und 8 Stunden zeigten kontinuierliche Konzentrationen für Rg1 um die 10 µg/ml und für Rb1 um 1 µg/ml. Auch hier diffundierte bereits mehr Rg1 als Rb1 durch die Haut. Bei der wässrigen Lösung mit *Panax Ginseng*-Extrakt zeigte sich nach 24h eine höhere Diffusion des Rb1 nach 24h als bei den Nanoemulsionen A und B. Beim wässrigen Extrakt erreichte der Wert des Rb1 bei den Proben sogar eine Konzentration um die 27 µg/ml. Der Rg1 erreicht auch hier nach 24h eine Konzentration von 30 µg/ml. In den Abbildungen 89-91 sind ausgewerteten Mengenergebnisse inkl. STABW innerhalb eines Tages des Rg1 und Rb1 in den entsprechenden Zubereitungen mit *Panax Ginseng*-Extrakt dargestellt. Die Diagramme zeigen demnach die quantifizierte Menge in µg/ml der Ginsenoside Rg1 und Rb1 bei Probenentnahmen nach 2,4,6,8 und 24h.

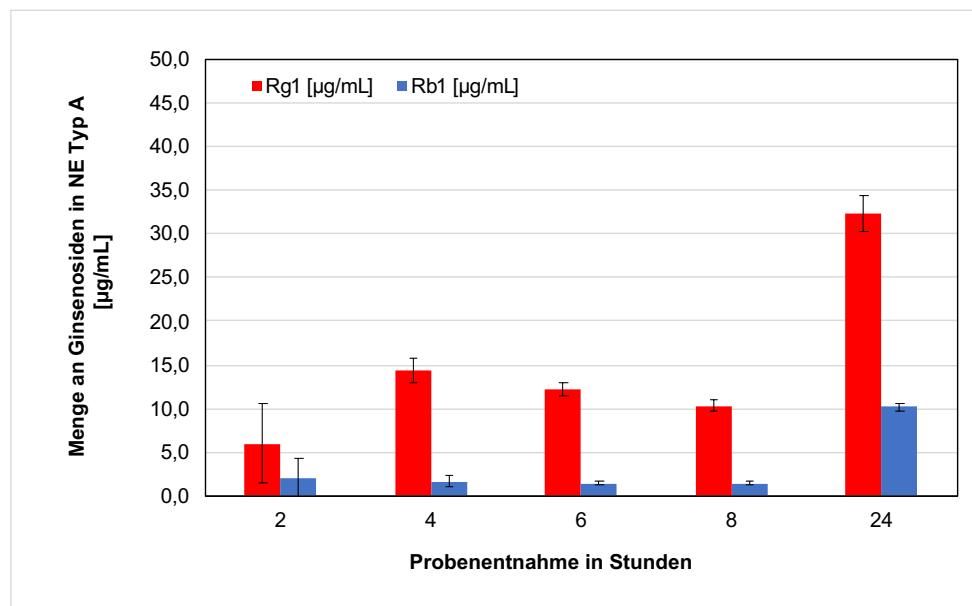


Abbildung 89: NE A: Menge an Ginsenosiden in µg/ml nach 2,4,6,8,24h

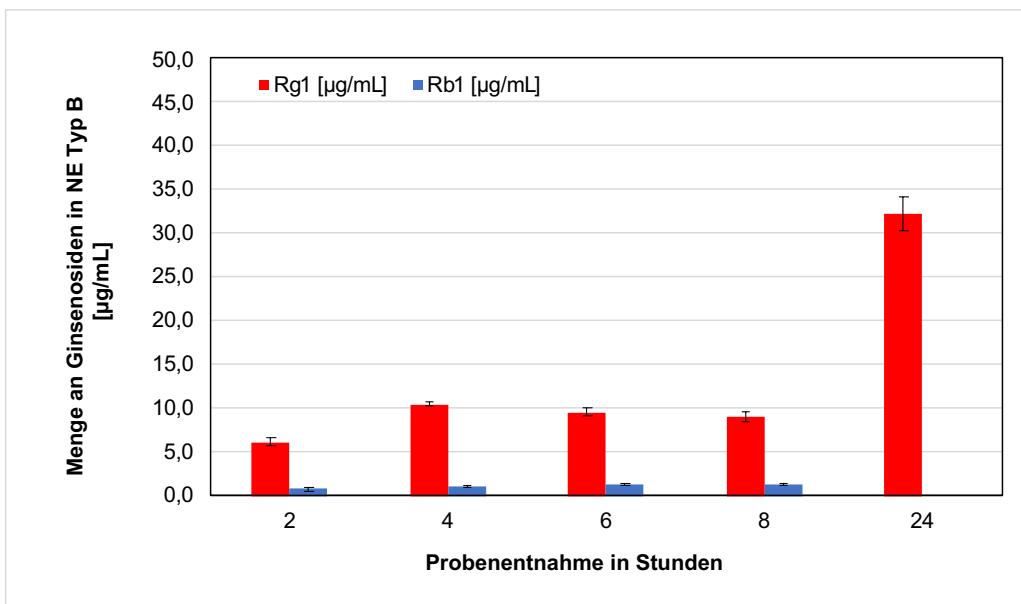


Abbildung 90: NE B: Menge an Ginsenosiden in $\mu\text{g}/\text{ml}$ nach 2,4,6,8,24h

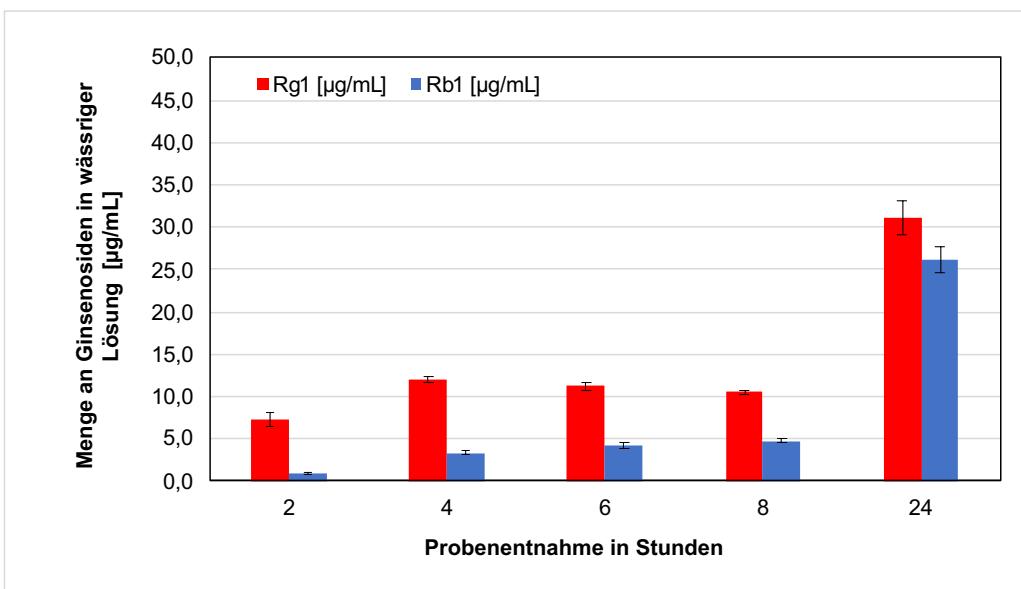


Abbildung 91: wässrige Lösung: Menge an Ginsenosiden in $\mu\text{g}/\text{ml}$ nach 2,4,6,8,24h

Abschließend wurden noch zwei Verlaufsgrafiken mit der permeierten Menge der einzelnen Ginsenosiden erstellt. Diese sind in Abbildung 92 und 93 dargestellt.

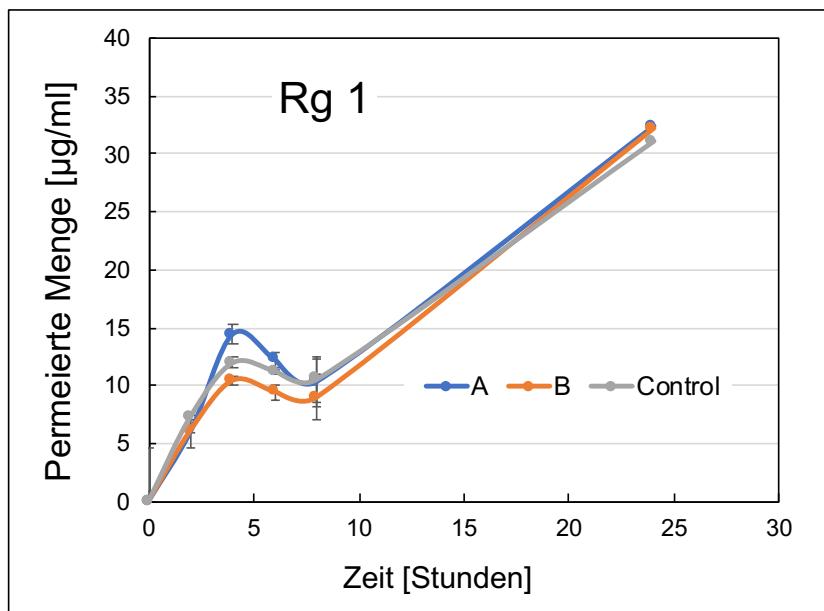


Abbildung 92: Permeierte Menge des Ginsenosids Rg1 in µg/ml

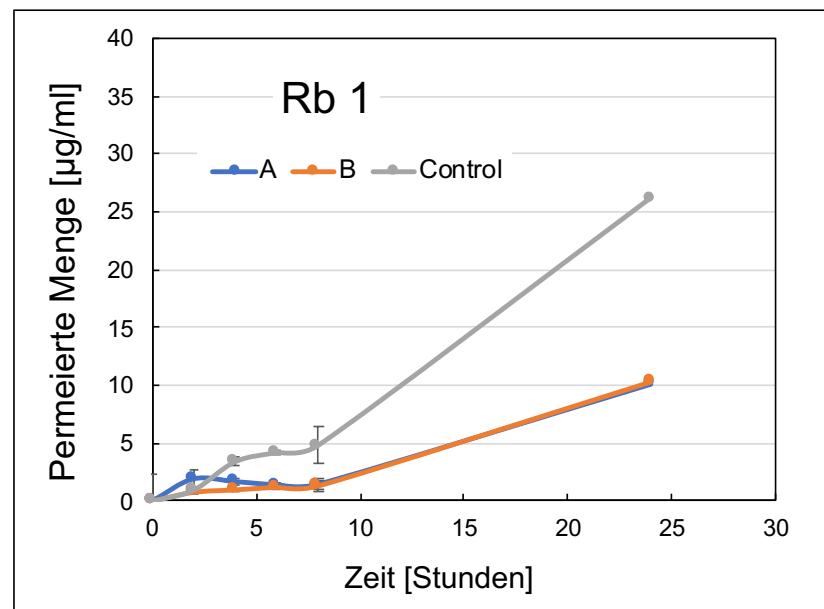


Abbildung 93: Permeierte Menge des Ginsenosids Rb1 in µg/ml

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Ginsenosid Rg1 aus den beiden Nanoemulsionen und der wässrigen Kontroll-Lösung gleich gut freigesetzt wurde. Hingegen zeigte das Ginsenosid Rb1 eine höhere Freisetzung aus der wässrigen Lösung, was mit unterschiedlichen Stoffeigenschaften bzw. unterschiedlicher Affinität zur Formulierung erklärbar ist.

5. Diskussion

Mit Hilfe von unterschiedlichen Zuckertensiden konnten hautfreundliche O/W-Nanoemulsionen hergestellt und ein wasserlöslicher *Panax Ginseng*-Extrakt einarbeitet werden. O/W-Emulsionen sind günstige Vehikel für Inhaltsstoffe wie Saponine und Polysaccharide [4]. Die vorliegenden O/W-Nanoemulsionen, die meist in Bezug auf die Formulierungsparameter physikalisch stabiler sind als normale Emulsionen und eine bessere Hautverträglichkeit zeigen, wurden mittels Hochdruckhomogenisator hergestellt [5].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zu Beginn vier verschiedene Formulierungen vom O/W-Emulsions-Typ hergestellt. Sie unterschieden sich in den hydrophilen und lipophilen Eigenschaften der Saccharoseester. Schon zu Beginn bei der Herstellung konnte man unterschiedliche Eigenschaften der Formulierung in der Zubereitung feststellen. Eine der Formulierungen mit der Zuckertensid-Mischung HLB 9/HLB 15 war teilweise nicht homogenisierbar. Man erkannte auch, dass bei der Herstellung und Verarbeitung der Saccharose-Emulgatoren die Temperatur eine herausragend wichtige Rolle spielte. Beim Abkühlen gellierten die Proben und mussten vor dem Homogenisierungsprozess erneut erwärmt werden. Auch musste man darauf achten, dass der Homogenisator vor dem Zerkleinerungsprozess auf Betriebstemperatur gebracht wurde. Ein Gerät mit integriertem Heizkreislauf wäre hier von Vorteil.

Man entschied sich, zwei Formulierungen der O/W-Emulsion über einen Zeitraum von 12 Wochen auf ihre Stabilität zu prüfen. Die Probe mit der Zuckertensid-Mischung HLB 3/15 zeigte nach vier Wochen eine Zunahme der Partikelgröße und des PDI-Werts. Sie wies also eine geringere Stabilität auf als die Nanoemulsion mit Saccharose-Estern HLB 9/HLB 11. Diese Nanoemulsion hingegen zeigte eine gute Stabilität über 12 Wochen. Daher wurde diese Formulierung für die Einarbeitung des *Panax Ginseng*-Extrakts gewählt. Für diese Formulierung wurde die Stabilität über vier Wochen gemessen und mit der zuvor vermessenen wirkstofffreien Probe verglichen. Die Einarbeitung des Pflanzenextraktes rief wesentliche Unterschiede in Bezug auf Formulierungseigenschaften und Stabilität hervor. Sowohl bei den rheologischen Eigenschaften als auch bei Partikelgröße, PDI und Zetapotential gab es Abweichungen. Die mit Ginseng-Extrakt beladene Nanoemulsion zeigte nur zum Zeitpunkt der Herstellung ähnliche Werte wie die wirkstofffreie Nanoemulsion. Die

Partikelgröße nahm während der Lagerung rascher zu, der PDI stieg von 0,1 auf über 0,4. Interessanterweise wiesen die Ginseng-haltigen Nanoemulsionen einen saureren pH-Wert auf als die wirkstofffreien Formulierungen, was für eine Anwendung auf der Haut günstig ist. Allerdings zeigte der pH-Wert bereits nach zwei Wochen eine deutliche Zunahme, möglicherweise aufgrund von mikrobieller Kontamination. Hier müsste man die Konservierungseigenschaften ändern.

Bei den Franz-Zell-Versuchen wurden die Permeationseigenschaften der Nanoemulsion mit *Panax Ginseng*-Extrakt durch porzine Bauchhaut untersucht. Der Fokus für die Quantifizierung lag auf den Ginsenosiden Rg1 und Rb1. Hier konnte man mittels UHPLC/MS eine eindeutige Permeation der Ginsenoside durch die Modellmembran feststellen. Für diese Versuche wurde einerseits die Probe mit der Zuckertensid-Mischung je HLB 9/HLB 11 (zu jeweils 1,5% m/m Tensidgehalt) gewählt und zum Vergleich die Formulierung mit dem Saccharoseester HLB 9 (mit 3% m/m Tensidgehalt). Ebenso wurde eine wässrige Lösung mit *Panax Ginseng*-Extrakt als Kontrolle herangezogen. Die beiden Nanoemulsionen mit *Panax Ginseng*-Extrakt zeigten nach 24 Stunden annähernd gleiche permeierte Mengen an Rg1 und Rb1. Die Menge an Rg1 überstieg jene an Rb1. Bei der wässrigen Lösung war die quantifizierte Menge von Rg1 nach 24 Stunden den Werten der Nanoemulsionen vergleichbar. Die Menge an Rb1 zeigt jedoch nach 24 Stunden einen wesentlich höheren Wert bei der wässrigen Lösung.

In weiteren Untersuchungen sollte die Rezeptur für den Einbau des Extrakts optimiert werden und erneute Stabilitäts- und Penetrationsstudien durchgeführt werden. Eine erhöhte Wasserkonzentration in der Formulierung könnte bei weiteren Franz-Zell-Versuchen getestet werden. Somit kämen auch Hydrogele für die Applikation der Ginsenoside in Frage. Nach Erforschen einer stabilen Formulierung wären als Ansatz weitere in-vitro Untersuchungen an Zellkulturlinien denkbar.

6. Zusammenfassung und Conclusio

Das primäre Ziel dieser Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung von hautfreundlichen Nanoemulsionen zur Applikation von *Panax Ginseng*-Extrakt. Es wurden vier verschiedene O/W-Rezepturen mit dem Hochdruckhomogenisator hergestellt. Diese unterschieden sich in den emulgierenden Eigenschaften bzw. der Löslichkeit der Zuckertenside. Diese vier wirkstofffreien Nanoemulsions-Typen wurden nach Herstellung charakterisiert. Sie wurden auf ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften hin untersucht; dazu wurden Partikelgröße, Zetapotential, PDI und pH-Wert ermittelt. Zudem wurde anfänglich eine rheologische Charakterisierung durchgeführt. Die Fließeigenschaften wurden in Bezug auf Fließ- und Viskositätskurven sowie auf den elastischen und viskosen Modulus hin untersucht. Die zwei vielversprechendsten Formulierungen wurden über einen Zeitraum von 12 Wochen auf ihre Lagerstabilität geprüft. Als Parameter zum Stabilitätsmonitoring wurden erneut Partikelgröße, Zetapotential, PDI und pH-Wert sowie die dynamische Viskosität in Fließkurven vermessen. Die Nanoemulsion mit den besten Formulierungseigenschaften wurde für die Einarbeitung des *Panax Ginseng*-Extraktes gewählt.

Im Zuge dieser Arbeit wurden auch grundlegende methodische Parameter untersucht. Erkenntnisse über optimale Bedingungen bei Vorhomogenisation, Hochdruckhomogenisation, Verdünnung für Streulichtmessungen sowie den geeigneten Messaufsatz für das Rotationsrheometer wurden gewonnen und in der Arbeit dokumentiert.

Der zweite Teil der Arbeit umfasste die Herstellung und Charakterisierung der auf Stabilität geprüften Nanoemulsion nach Einarbeitung des *Panax Ginseng*-Extrakts. Die Formulierung wurde vier Wochen lang auf ihre Stabilität hin untersucht und mit der wirkstofffreien Nanoemulsion verglichen. Es wurden deutliche Unterschiede durch die Einarbeitung des *Panax Ginseng*-Extraktes verzeichnet. Alle Stabilitätsparameter wiesen auf einen negativen Effekt des pflanzlichen Extrakts auf die Formulierungsstabilität hin. Hier müssen weitere Studien ansetzen, um die Formulierung gezielt für die Einarbeitung des Extrakts zu optimieren und zu verbessern.

Zuletzt wurden Permeationsversuche mit Franz-Diffusionszellen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine eindeutige Permeation der untersuchten Ginsenoside Rg1 und Rb1 aus der Nanoemulsion durch porzine Bauchhaut ins Akzeptormedium.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in dieser Masterarbeit erste Erkenntnisse über die Einarbeitung von *Panax Ginseng*-Extrakt in fluide O/W-Nanoemulsionen gewonnen werden konnten. Weitere Arbeiten im Bereich der Formulierungsentwicklung für *Panax Ginseng*-Extrakt sind geplant; auch in-vitro, ex-vivo und letztlich in-vivo Versuche an freiwilligen ProbandInnen sind vorstellbar, um einen potenziellen Effekt der Ginsenoside auf Hautalterung und Kollagenwachstum zu bewerten.

7. Abstract

The primary objective of this work was the preparation and characterization of skin-friendly nanoemulsions for application of *Panax ginseng* extract. Four different O/W formulations were prepared using the high-pressure homogenizer. These differed in the emulsifying properties of the sugar surfactants. They were evaluated for their physical properties in terms of particle size, zeta potential, PDI and pH. Their rheological characteristics in terms of flow curves and viscosity curves as well as elastic and viscous modulus were studied. Two of the prepared O/W emulsions were tested for their stability for 12 weeks; the monitored parameters included particle size, zeta potential, PDI and pH. The dynamic viscosity was likewise measured regularly and flow curves were monitored. The most stable nanoemulsion was chosen for the incorporation of *Panax ginseng* extract.

The second part of the work involved the preparation and characterization of the selected nanoemulsions with *Panax ginseng* extract. These formulations were tested for their storage stability over a period of four weeks and the data were compared with those of the extract-free nanoemulsions. Significant differences in all stability parameters were observed due to the incorporation of *Panax ginseng* extract. Finally, basic permeation tests were performed using Franz diffusion cells. The results showed clear permeation of the investigated ginsenosides Rg1 and Rb1 through porcine abdominal skin from the nanoemulsions.

This master thesis lays the foundation for further projects with *Panax ginseng* formulations for both in vitro, ex vivo and finally in vivo studies. The latter should be conducted on human volunteers to investigate a potential effect of the ginsenosides on skin ageing and collagen synthesis.

8. Literaturverzeichnis

- [1] A. Chevallier, Das große Lexikon der Heilpflanzen, DK Verlag, 3. Ausgabe, 2017, ISBN: 9783831032327
- [2] Z.A. Ratan, M.F. Haidere, Y.H. Hong, S.H. Park, J.O. Lee, J. Lee, J.Y. Cho, Pharmacological potential of ginseng and its major component ginsenosides, *Journal of Ginseng Research*, 2021, vol. 45,2: 199-210, doi: 10.1016/j.jgr.2020.02.004
- [3] L. You, Y.J. Cho, The regulatory role of Korean ginseng in skin cells, *Journal of Ginseng Research*, 2021, vol. 45,3: 363-370, doi: 10.1016/j.jgr.2020.08.004
- [4] N. Taarji, M. Bouhoute, F. Fainassi, A. Hafidi, I. Kobayashi, M.A. Neves, K. Tominaga, H. Isoda, M. Nakajima, Interfacial and emulsifying properties of purified glycyrrhizin and non-purified glycyrrhizin-rich extracts from liquorice root (*Glycyrrhiza glabra*), *Food chemistry* 2021, 337, 127949, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127949
- [5] K.H. Bauer, K.H. Frömming, C. Führer, *Pharmazeutische Technologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 9.erweiterte Auflage, 2012, ISBN: 978-3-8047-3268-1
- [6] Onlinequelle: <https://katawan.de/koerper/haut/hautschichten/>, abgerufen am 25.08.2021
- [7] G. Thews, E. Mutschler, P. Vaupel, *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 6.völlig überarbeitete und erweiterte Auflage, 2007, ISBN: 978-3-8047-2342-9
- [8] Onlinequelle: abgerufen am 25.08.2021
https://flexikon.doccheck.com/de/Haut?utm_source=www.doccheck.flexikon&utm_medium=web&utm_campaign=DC%2BSearch
- [9] E.J. Wormer, J.A. Bauer, *Medizin und Gesundheit*, Neues großes Lexikon, Lingen-Verlag, 2004, ISBN: B0036BX8UE
- [10] S. Bender, *Körperpflegekunde*, 4. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2014, ISBN: 978-3-8047-3321-3
- [11] F. Zarei, A. Abbaszadeh, Application of Cell Therapy for Anti-Aging Facial Skin, *Current stem cell research & therapy*, 2019, vol. 14,3: 244–248, doi: 10.2174/1574888X13666181113113415
- [12] W. Raab, U. Kindl, *Pflegekosmetik*, 5. Neu bearbeitete Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2012, ISBN: 978-3-8047-2761-8

- [13] T.J. Phillips, Z. Demircay, M. Sahu, Hormonal effects on skin aging, *Clinical Geriatric Medicine*, 2001, vol. 17,4:661-72, vi. doi: 10.1016/s0749-0690(05)70092-6
- [14] S. Schuster, M.M. Black, E. McVitie, The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density, *The British journal of dermatology*, 1975, vol. 93,6: 639-43, doi:10.1111/j.1365-2133.1975.tb05113.x
- [15] D. Sharma, M.M. Kober, W.P. Bowe, Anti-Aging Effects of Probiotics, *Journal of Drugs in Dermatology*, 2016, vol. 15,1: 9-12, PMID: 26741377
- [16] G. Jenkins, Molecular mechanisms of skin ageing, *Mechanisms of ageing and development*, 2002, vol. 123,7: 801-10, doi:10.1016/s0047-6374(01)00425-0
- [17] C.C. Zouboulis, Intrinsische Hautalterung, *Hautarzt* 2003, vol. 54: 825–832, doi:10.1007/s00105-003-0581-7
- [18] Onlinequelle: Gesundheitslexikon, DocMedicus Verlag; <http://www.gesundheits-lexikon.com/Maennergesundheit/Hautalterung-/Ursachen.html>, abgerufen am 26.08.2021
- [19] E. Heymann, Haut, Haar und Kosmetik, eine chemische Wechselwirkung, Stuttgart Hirzel Verlag GmbH, 1994, ISBN: 978-3777605562
- [20] S. Zhang, E. Duan, Fighting against Skin Aging, *The Way from Bench to Bedside, Cell Transplantation*, 2018, vol. 27,5: 729-738. doi: 10.1177/0963689717725755
- [21] V. Klang, N.B. Matsko, C. Valenta, F. Hofer, Electron microscopy of nanoemulsions- an essential tool for characterisation and stability assessment, *Micron* Oxford England, 2012, vol. 43 (2–3): 85-103, doi:10.1016/j.micron.2011.07.014
- [22] V.K. Rai, N. Mishra, K.S. Yadav, N.P. Yadav, Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery- Formulation development, stability issues, basic considerations and applications, *Journal of Controlled Release*, 2018, vol. 270: 203-225, doi:10.1016/j.jconrel.2017.11.049
- [23] V. Klang, C. Valenta, Lecithin-based nanoemulsions, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2011, vol. 21,1: 55-76, doi:10.1016/S1773-2247(11)50006-1
- [24] S. Benita, Prevention of topical and ocular oxidative stress by positively charged submicron emulsion, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 1999, vol. 53,4: 193-206, doi: 10.1016/S0753-3322(99)80088-2

- [25] R. Voigt, A. Fahr, Pharmazeutische Technologie für Studium und Beruf, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 10. Auflage (2006), ISBN: 3769235118
- [26] Onlinequelle: https://de.wikipedia.org/wiki/Mittelkettige_Triglyceride, abgerufen am 28.08.2021
- [27] N.B. Desai, Saccharoseester- Eine für Kosmetika interessante Stoffklasse, Parfümerie und Kosmetik, 1985, vol. 66, 10: 629-635, XP009093019
- [28] V. Klang, J.C. Schwarz, N. Matsko, E. Rezvani, N. El-Hagin, M. Wirth, C. Valenta, Semi-solid Sucrose Stearate-Based Emulsions as Dermal Drug Delivery Systems, *Pharmaceutics*, 2011, vol. 3,2: 275-306, doi:10.3390/pharmaceutics3020275
- [29] N. Garti, V. Clement, M. Leser, A. Aserin, M. Fanun, Sucrose Ester Microemulsions, *Journal of Molecular Liquids*, 1999, vol. 80 (2-3): 253-296, doi:10.1016/S0167-7322(99)80010-5
- [30] Onlinequelle: <https://de.wikipedia.org/wiki/Zuckertenside>, abgerufen am 29.08.2021
- [31] V. Klang, A. Novak, M. Wirth, C. Valenta, Semi-Solid o/w Emulsions Based on Sucrose Stearates- Influence of Oil and Surfactant Type on Morphology and Rheological Properties, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2013, vol. 34,3: 322-333, doi:10.1080/01932691.2012.666187
- [32] H. Käser 2010, "Naturkosmetische Rohstoffe", Linz, Verlag Freya, 3. Auflage 2012, ISBN: 978-3-99025-012-9
- [33] Onlinequelle: <https://www.wikiwand.com/de/Kaliumsorbat>, abgerufen am 30.08.2021
- [34] Onlinequelle: <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/daz-az/2015/daz-43-2015/rezepturen-konservieren>, abgerufen am 30.08.2021
- [35] C. Klemann, Ginseng- Heilende Wurzel Asiens, Südwest Verlag, 1999, ISBN: 3-517-08074-8
- [36] F.C. Lee, Facts about Ginseng- The Elixir of Life, Hollym International, 1992, ISBN: 0930878833
- [37] C. Bachmann, Die Wirksamkeit und Sicherheit von Ginseng, Schweizerische Zeitschrift für Ganzheitsmedizin, 2017, Onlinequelle: <https://www.karger.com/Article/Pdf/480042>, abger. am 01.09.2021
- [38] Onlinequelle: <https://www.florafarm.de/Ueber-Ginseng#Roter%20Ginseng>, abgerufen am 01.09.2021
- [39] S. Fulder, Das Buch vom Ginseng, Goldmann Verlag, 1995, ISBN 3-442-13836-1
- [40] Onlinequelle: <https://arzneipflanzenlexikon.info/ginseng.php>, abgerufen am 01.09.2021

- [41] B.K. Shin, S.W. Kwon, J.H. Park, Chemical diversity of ginseng saponins from *Panax ginseng*, *Journal of Ginseng Research*, 2015, vol: 39,4: 287-298, doi:10.1016/j.jgr.2014.12.005
- [42] L. Zhu, X. Luan, D. Dou, L. Huang, Comparative Analysis of Ginsenosides and Oligosaccharides in White Ginseng (WG), red Ginseng (RG) and Black Ginseng (BG), *Journal of chromatographic science*, 2019, vol. 57,5: 403-410, doi:10.1093/chromsci/bmz004
- [43] A.M. Metwaly, Z. Lianlian, H. Luqi, D. Deqiang, Black Ginseng and Its Saponins- Preparation, Phytochemistry and Pharmacological Effects, *Molecules* Basel Switzerland, 2019, vol. 24,10: 1856, doi:10.3390/molecules24101856
- [44] E. De Smet, R.P. Mensink, J Plat, Effects of plant sterols and stanols on intestinal cholesterol metabolism- suggested mechanisms from past to present, *Molecular Nutrition & Food Research*, 2012, vol. 56,7: 1058–1072, doi:10.1002/mnfr.201100722
- [45] K.F. Klippe, D.M. Hiltl, B. Schipp, A multicentric, placebo-controlled, double-blind clinical trial of β -sitosterol (phytosterol) for the treatment of benign prostatic hyperplasia, *German BPH-Phyto study group*, *British journal of urology*, 1997, vol. 80,3: 427-432
- [46] R. Hänsel, O. Sticher, *Pharmakognosie- Phytopharmazie*, 7.überarbeitete und aktualisierte Auflage, Springer Verlag Heidelberg, 2004, ISBN: 3-540-01024-6
- [47] Y.R. Song, S.K. Sung, M. Jang, T.G. Lim, C.W. Cho, C.J. Han, H.D. Hong, Enzyme- assisted extraction, chemical characteristics, and immunostimulatory activity of polysaccharides from Korean ginseng (*Panax ginseng* Meyer), *International Journal of biological macromolecules*, 2018, vol. 116: 1089-1097, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.05.132
- [48] S.M. Lee, B.S. Bae, H.W. Park, N.G. Ahn, B.G. Cho, Y.L. Cho, Y.S. Kwak, Characterization of Korean Red Ginseng (*Panax ginseng* Meyer)- History, preparation method, and chemical composition, *Journal of Ginseng Research*, 2015, Volume 39,4: 384-391, doi:10.1016/j.jgr.2015.04.009
- [49] S. Badal, R. Delgoda, *Pharmacognosy- Fundamentals, Applications and Strategies*, Academic Press, 2017, ISBN 978-0-12-802104-0, doi:10.1016/C2014-0-01794-7
- [50] L.P. Christensen, K. Brandt, Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family- Occurrence, bioactivity and analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, vol. 41,3: 683-693, doi:10.1016/j.jpba.2006.01.057

- [51] R. Richter, S. Basar, A. Koch, W.A. König, Three sesquiterpene hydrocarbons from the roots of *Panax ginseng* C.A. Meyer (Araliaceae), *Phytochemistry*, 2005, vol. 66,23: 2708-2713, doi:10.1016/j.phytochem.2005.09.012
- [52] K.H. Kim, D. Lee, H.L. Lee, C.E. Kim, K. Jung, K.S. Kang, Beneficial effects of *Panax ginseng* for the treatment and prevention of neurodegenerative diseases- past findings and future directions, *Journal of Ginseng Research*, 2018, vol. 42,3: 239-247, doi:10.1016/j.jgr.2017.03.011
- [53] J.H. Kim, Cardiovascular diseases and *Panax ginseng*- a review on molecular mechanisms and medical applications, *Journal Ginseng Research*, 2012, vol. 36: 16-26, doi:10.5142/jgr.2012.36.1.16
- [54] A.S. Wong, C.M. Che, K.W. Leung, Recent advances in ginseng as cancer therapeutics- a functional and mechanistic overview, *Natural Product Reports*, 2015, vol. 32,2: 256-272, doi:10.1039/c4np00080c
- [55] H.D. Yuan, J.T. Kim, S.H. Kim, S.H. Chung, Ginseng and diabetes- the evidences from in vitro, animal and human studies, *Journal of Ginseng Research*, 2012, vol. 36,1: 27-39, doi:10.5142/jgr.2012.36.1.27
- [56] K.H. Lee, I.Y. Bae, S.I. Park, J.D. Park, H.G. Lee, Antihypertensive effect of Korean red ginseng by enrichment of ginsenoside Rg3 and arginine-fructose, *Journal of Ginseng Research*, 2016, vol. 40,3: 237-244, doi:10.1016/j.jgr.2015.08.002
- [57] K.M. Park, T.C. Jeong, Y.S. Kim, H.J. Shin, K.Y. Nam, J.D. Park, Immunomodulatory effect of acidic polysaccharide fraction from Korean red ginseng (*Panax gin.*), *Natural Product Science*, 2000, vol. 6,1: 31-35
- [58] J. Thiele, Hautalterung, ein multifaktorielles Phänomen – Antioxidantien- *Aktuelle Dermatologie*, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, 2002, vol. 28(S1): S3-S6, doi: 10.1055/s-2002-35405
- [59] M. Rinnerthaler, Hautalterung und M.M. Schimke, G. Lepperdinger, *Gesund altern*, Springer VS, Wiesbaden, 2018, ISBN: 978-3-658-19972-2, doi:10.1007/978-3-658-19973-9_8
- [60] J. Nam, J. Min, M. Son, J. Oh, S. Kang, Ultraviolet-and infrared-induced 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activating skin photoaging is inhibited by red ginseng extract containing high concentration of ginsenoside Rg3 (S), *Photodermatology Photoimmunology Photomedicine*, 2017, vol. 33,6: 311-320, doi:10.1111/phpp.12337

- [61] H.D. Kim, S.E. Ha, J.R. Kang, J.K. Park, Effect of Korean red ginseng extract on cell death responses in peroxynitrite-treated keratinocytes, *Journal of Ginseng Research*, 2010, vol. 34,3: 205-211, doi:10.5142/jgr.2010.34.3.205
- [62] C.E. Hong, S.Y. Lyu, Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of Korean red ginseng extract in human keratinocytes, *Immune Network*, 2011, vol. 11,1: 42-9, doi:10.4110/in.2011.11.1.42
- [63] Y.G. Kim, M. Sumiyoshi, M. Sakanaka, Y. Kimura, Effects of ginseng saponins isolated from red ginseng on ultraviolet B-induced skin aging in hairless mice, *European Journal of Pharmacology*, 2009, vol. 602,1: 148-156, doi:10.1016/j.ejphar.2008.11.021
- [64] S.K. Park, S.H. Hyun, G. In, C.K. Park, Y.S. Kwak, Y.J. Jang, B. Kim, J.H. Kim, C.K. Han, The antioxidant activities of Korean Red Ginseng (*Panax ginseng*) and ginsenosides- A systemic review through in vivo and clinical trials, *Journal of Ginseng Research*, 2021, vol. 45,1: 41-47, doi:10.1016/j.jgr.2020.09.006
- [65] Y.H. Kim, H.R. Park, S.Y. Cha, S.H. Lee, J.W. Jo, J.N. Go, K.H. Lee, S.Y. Lee, S.S. Shin, Effect of red ginseng NaturalGEL on skin aging, *Journal of Ginseng Research*, 2020, vol. 44,1: 115-122, doi:10.1016/j.jgr.2018.09.006.
- [66] S. Schultz, G. Wagner, J. Ulrich, *Chemie Ingenieur Technik- Hochdruckhomogenisation als ein Verfahren zur Emulsionsherstellung*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002, vol. 74,7: 901-909, doi:10.1002/1522-2640(200207)74:7<901
- [67] Onlinequelle: <https://www.malvernpanalytical.com/de/products/technology/light-scattering/electrophoretic-light-scattering>, abgerufen am 03.09.2021
- [68] R.H. Müller, *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*, Band 37, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1996, ISBN: 9783804714656
- [69] H. Trommer, *Prüfung halbfester Arzneizubereitungen- Grundlagen der Rheologie und ausgewählte weitere physikalische Testmethoden*, Pharmazeutische Wissenschaft, 2010, Hamburg
- [70] T.G. Mezger, *Das Rheologie Handbuch*, Vincentz Network Verlag, Hannover, Germany, 2021, ISBN: 978-3-86630-825-1
- [71] A. Malcherek, *Zur Beschreibung der rheologischen Eigenschaften von Flüssigkeiten*, Die Küste, 2010, vol. 77: 135-178
- [72] Europäisches Arzneibuch Ph.Eur. 8.Ausgabe, Die „allgemeinen Vorschriften“, Grundwerk 2014

- [73] M. Dittgen, S. Wiedersberg, Methoden zur Untersuchung transdermaler Systeme, Kapitel 4.4., Moderne pharmazeutische Technologie, 2009
- [74] A.M. Zimmermann, Cyclodextrin-stabilisierte Submikronemulsionen als Arzneistoffträgersystem für Progesteron auf der Haut, Diplomarbeit, Universität Wien, 2009
- [75] Onlinequelle: Hersteller Neolab, <https://www.amazon.de/neoLab-1641-Einmal-Küvetten-Makro-100-er/dp/B01AU87701>, abgerufen am 04.09.2021
- [76] Onlinequelle: https://www.atascientific.com.au/products/zetasizer-ultra/2018-05-25_145300/, abgerufen am 04.09.2021
- [77] V. Klang, N. Matsko, A.M. Zimmermann, E. Vojnikovic, C. Valenta, Enhancement of stability and skin permeation by sucrose stearate and cyclodextrins in progesterone nanoemulsions, International Journal of Pharmaceutics, 2010, vol. 393 (1-2):152-60, doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.04.029
- [78] Onlinequelle: <https://www.chemie.de/lexikon/Ameisensäure.html>, abgerufen ab 05.09.2021
- [79] Onlinequelle: <https://www.carlroth.com/com/en/further-reference-substances-for-hplc/ginsenoside-rb1/p/7462.1>, abgerufen am 05.09.2021