



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Vorversuche zum Nachweis von (-)- $\alpha$ -Bisabolol aus dem menschlichen Urin nach Massage mittels GC-MS-Analyse“

Verfasserin

Maria Franziska Gundendorfer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, im September 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Pharmazie

Betreuer: Univ. Prof. Mag. Dr. Gerhard Buchbauer



UNWISSENHEIT IST DIE WURZEL

ALLEN ÜBELS

Sokrates



Bedanken möchte ich mich bei Herrn Univ. Prof. Mag. Dr. Gerhard Buchbauer für die Ermöglichung der Durchführung meiner Diplomarbeit und die fachliche Beurteilung dieser.

Bei Frau Mag. Dr. Iris Stappen möchte ich mich für die geduldige Betreuung und fachliche Beratung bedanken. Für die Mitbetreuung unseres lieben Gismo bedanke ich mich recht herzlich bei Rene Klucky.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Dorfinger, die die Idee zu dieser Diplomarbeit hatte.

Ganz besonders möchte ich mich bei Mag. pharm. Hoyer und Mag. pharm. Hoyer-Schaljo bedanken. Sie haben mir bereits vor Studienbeginn Einblick in das Leben als Apothekerin gewährt und mich während des Studiums die Praxis nicht vergessen lassen. Am Studienende erfuhr ich tatkräftige Unterstützung und erhielt Motivation in ihrer Apotheke um das Berufsleben endlich vollständig beginnen zu können.

Last but not least bedanke ich mich ganz herzlich bei meiner Familie, die alle Höhen und Tiefen meines Studiums miterlebte und mir immer treu zur Seite steht.



# Abstract

The target of this study was to prove (-)- $\alpha$ -bisabolol in the human urine after massage of the oil on the lower abdomen.

A serial dilution of bisabolol with human urine was analysed with a SPME-GC-MS-method.

(-)- $\alpha$ -Bisabolol proved to be stable during the incubation for this study.

In a selfstudy a peak with the retention time similar to the one of(-)- $\alpha$ -bisabolol was detected. Further tests showed, that it was not the substance, which was searched for.

A micture of 10%  $\alpha$ -bisabolol in aloe vera oil was applicated on the subjects by mesoporation with Acthyderm. There were no results analysing the samples of the human subjects using the SPME-GC-MS-method.

The samples were analysed with two different HS-methods. Sulfamic acid was added to split conjugates.

During the second HS-method peaks were found with the retention time of  $\alpha$ -bisabolol in all samples of the human subjects. For these assessments the SIM-Modus was used. By a comparison between SIM-modus and fullscan a peak was found with a comparable mass spectrum, but not identic with  $\alpha$ -Bisabolol.



# Inhaltsverzeichnis

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Problemstellung</b>  | <b>11</b> |
| <b>2</b> | <b>Einleitung</b>   | <b>13</b> |
| 2.1      | $\alpha$ -Bisabolol . . . . .   | 13        |
| 2.1.1    | physikalische und chemische Eigenschaften von $\alpha$ -Bisabolol . . . . . | 14        |
| 2.1.2    | Toxikologie des $\alpha$ -Bisabolols . . . . .                              | 15        |
| 2.1.3    | Wirkungen von $\alpha$ -Bisabolol . . . . .                                 | 20        |
| 2.1.4    | Verwendung von $\alpha$ -Bisabolol . . . . .                                | 22        |
| 2.2      | Acthyderm . . . . .   | 24        |
| <b>3</b> | <b>Experimenteller Teil</b>   | <b>27</b> |
| 3.1      | Chemikalien . . . . .   | 28        |
| 3.2      | Geräte . . . . .  | 29        |
| 3.3      | SPME-Analysen . . . . .   | 30        |
| 3.3.1    | Vorproben . . . . .   | 30        |
| 3.3.2    | Verdünnungsreihe . . . . .  | 31        |
| 3.4      | HS-Analysen . . . . .   | 32        |
| 3.4.1    | HS-Methode 1 basierend auf der Diplomarbeit von Maria Lindmayr . . . . .    | 32        |
| 3.4.2    | Zugabe von Amidosulfonsäure . . . . .                                       | 34        |
| 3.4.3    | HS-Methode 2 basierend auf der Arbeit von Susanne Friedl . . . . .          | 34        |
| 3.5      | Methoden zum Auftragen von $\alpha$ -Bisabolol . . . . .                    | 37        |
| 3.5.1    | Selbstversuch . . . . .   | 37        |
| 3.5.2    | Mesoporation mittels Acthyderm . . . . .                                    | 38        |
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse</b>   | <b>39</b> |
| 4.1      | SPME-Analysen . . . . .   | 39        |
| 4.1.1    | Vorproben . . . . .   | 39        |
| 4.1.2    | Verdünnungsreihe von $\alpha$ -Bisabolol . . . . .                          | 45        |
| 4.1.3    | Selbstversuch . . . . .   | 49        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.1.4    | Peakspaltung . . . . .                                      | 53        |
| 4.1.5    | Analyse der Harnproben der Probanden mittels SPME . . . . . | 56        |
| 4.2      | HS-Analysen . . . . .                                       | 59        |
| 4.2.1    | HS-Methode 1 . . . . .                                      | 59        |
| 4.2.2    | Amidosulfonsäure . . . . .                                  | 63        |
| 4.2.3    | HS-Methode 2 . . . . .                                      | 65        |
| <b>5</b> | <b>Diskussion</b>   | <b>69</b> |
| <b>6</b> | <b>Zusammenfassung</b>                                      | <b>71</b> |
| <b>7</b> | <b>Lebenslauf</b>   | <b>78</b> |

# 1 Problemstellung

Die Echte Kamille, *Matricaria recutita* L. (Asteraceae), wird seit Jahrhunderten in der Volksmedizin als Heilpflanze verwendet. Viele der traditionellen Anwendungen sind mittlerweile wissenschaftlich durch klinische Studien belegt.

Die vielseitigen Verwendungsmöglichkeiten der Kamille als pflanzliches Arzneimittel zeigen sich beispielsweise in den verschiedenen Indikationen von Kamillosan<sup>®</sup>. Dieses Phytopharmakon findet Anwendung als Dermatotherapeutikum, weist Wirkung auf den Gastrointestinaltrakt auf und hilft bei Entzündungen im Mund- und Rachenraum. [1]

Die wundheilungsfördernde Wirkung wird bei lokaler Applikation auf schlecht heilende Wunden genutzt. Wunden, die mit Kamille behandelt wurden heilten schneller ab als solche, die mit Corticosteroiden behandelt wurden. [2] Apigenin ist für die spasmolytische Wirkung der Kamille hauptverantwortlich. Andere wirkungsmitbestimmende Inhaltsstoffe sind Flavonoide,  $\alpha$ -Bisabolol und En-In-Dicycloether. [1] Die Hemmung von Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen sowie der Histaminfreisetzung durch  $\alpha$ -Bisabolol, Chamazulen und En-In-Dicycloether führt zu einer Hemmung von entzündlichen Vorgängen. [3] Auch bei Infektionen der Harnwege wirken die Inhaltsstoffe der Kamille sehr effektiv. [4]

In der Praxisgemeinschaft Neuerlaa in Wien behandeln Dr. Karl Dorfinger (Facharzt für Urologie und Andrologie) und seine Frau Dr. Gerda Dorfinger (Fachärztin für medizinische und chemische Labordiagnostik und Fachärztin für Zytologie) Patienten und Patientinnen mit chronischer Blasenentzündung mit Sitzbädern aus Eichenrinden- und Kamillenextrakt.

Dadurch konnte das Wiederaufflammen der Infektionen verzögert werden, was zu einem verlängerten Intervall zwischen den Antibiotikaeinnahmen führt.

So war es interessant zu untersuchen, ob sich diese Wirkung auch analytisch nachweisen lässt. Viele Inhaltsstoffe der Kamille und deren Verarbeitungsprodukte tragen zu den vielfältigen Wirkungen bei.

Daher beschloss man sich auf eine einzelne wirksamkeitsbestimmende Substanz des Extraktes der Kamille zu konzentrieren und diese genauer zu betrachten. Zu diesem Zweck

wurde  $\alpha$ -Bisabolol, ein Inhaltsstoff des ätherischen Öls von *Matricaria recutita* L., gewählt.

## 2 Einleitung

### 2.1 $\alpha$ -Bisabolol

(-)- $\alpha$ -Bisabolol (Abb. 2.1, INN: Levomenol, CAS Registry Number: 515-69-5) gehört zu den monocyclischen Sesquiterpenen. Es ist aus 15 C-Atomen aufgebaut. Die drei Isopreneinheiten sind teilweise ringförmig verknüpft. Die Hydroxylgruppe in Position 2 und die Doppelbindung zwischen 5 und 6 geben die Möglichkeit die Stoffwechselprodukte Bisabololoxid A, B und C sowie Bisabolonoxid A und  $\beta$ -Farnesen zu bilden (Abb.2.2). [3]

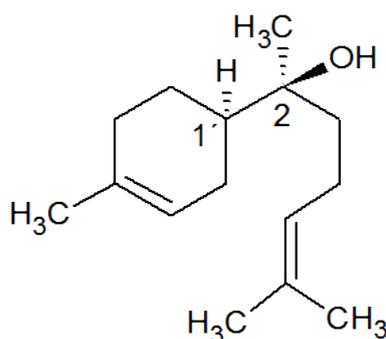


Abbildung 2.1: Strukturformel von (-)-alpha-Bisabolol  
erstellt mit ChemSketch 12.0

$\alpha$ -Bisabolol liegt in der Kamille und deren weiter verarbeiteten Produkte meist in relativ hohen Konzentrationen vor (bis 70% des ätherischen Öls der Kamille). Die Bisabololide machen nur einen geringen Anteil der Bestandteile aus. Dieser Umstand ergibt sich dadurch, dass zur pharmazeutischen Weiterverarbeitung meist dementsprechende Kulturen angebaut werden. Isaac et al. isolierten  $\alpha$ -Bisabolol erstmals 1951 aus den Blüten von *Matricaria recutita* (Asteraceae). [5]

Andere Pflanzen zur Gewinnung von  $\alpha$ -Bisabolol durch Wasserdampfdestillation sind neben *M. recutita* *Salvia runcinata* (Lamiaceae) und bestimmte Chemotypen von *S. stenophylla*. Ebenso ist es in *Vanillosmopsis* sp. (Asteraceae) und *Myoporum grassifolium*

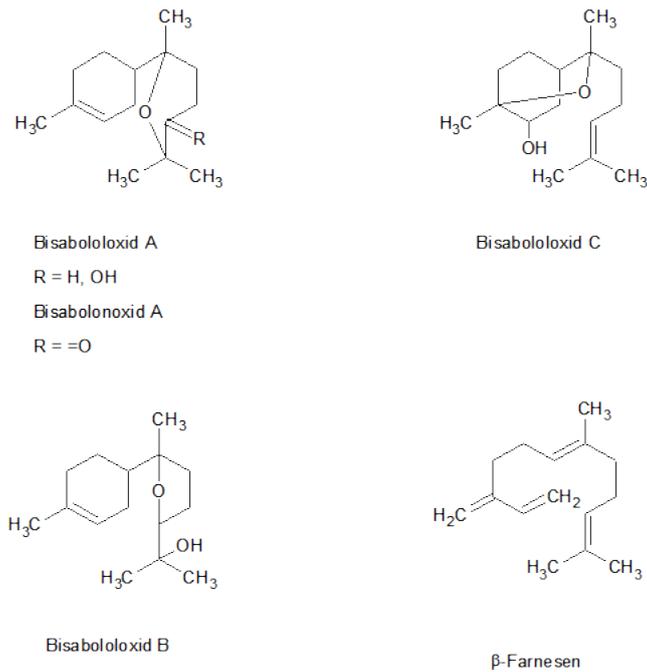


Abbildung 2.2: Metabolite von  $\alpha$ -Bisabolol in *Matricaria recutita* erstellt mit ChemSketch 12.0

(Scrophilariaceae) enthalten. Geringe Mengen befinden sich in *Eremanthus erythropappus* (Asteraceae). [6]

### 2.1.1 physikalische und chemische Eigenschaften von $\alpha$ -Bisabolol

Die Summenformel von  $\alpha$ -Bisabolol ist  $C_{15}H_{26}O$ , das Molekulargewicht beträgt 222.72 g/mol. Bei Raumtemperatur liegt es als farblose Flüssigkeit vor, die einen leicht süßlichen Geruch aufweist. Die Dichte beträgt 0.929 g/ml. Aufgrund der stark lipophilen Eigenschaften ist es in Wasser fast unlöslich (1.688 mg/l bei 25 °C), jedoch gut in Ethanol.

Bisabololoxid A und B sind die hauptsächlichen Oxidationsprodukte und auch Bestandteile des ätherischen Kamillenöls. [7]

Als ätherisches Öl ist es per Definition leicht flüchtig (Siedepunkt 153-156 °C bei Normaldruck, je nach Literatur schwanken die Angaben). [8]

(+)- $\alpha$ -Bisabolol ist ein Enantiomer, welches in der Natur nur sehr selten vorkommt. Die optisch aktiven Zentren befinden sich an C1' und C2. Bei der chemischen Synthese aus Ketodienen entsteht ein Gemisch der beiden Enantiomere (Abb. 2.3).

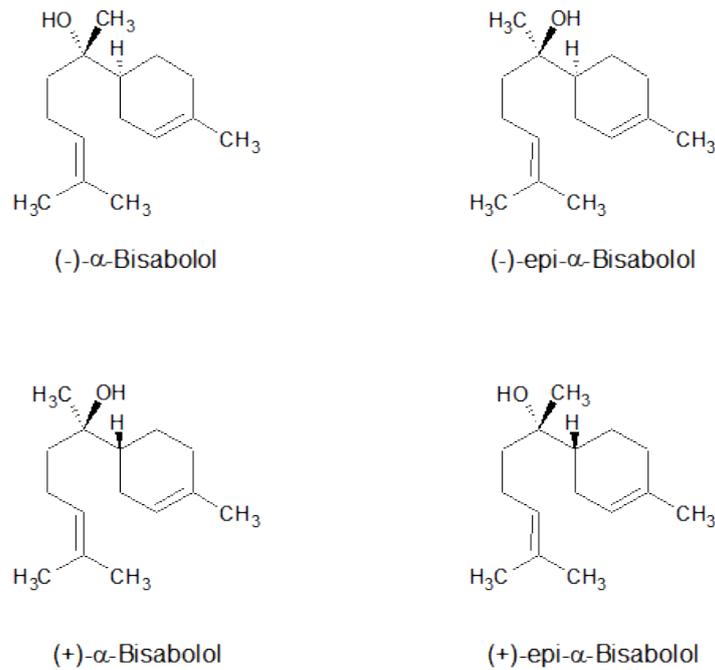


Abbildung 2.3: Stereoisomere des  $\alpha$ -Bisabolols  
erstellt mit ChemSketch 12.0

### 2.1.2 Toxikologie des $\alpha$ -Bisabolols

1979 stellten Habersang et al. fest, dass die  $LD_{50}$  von  $\alpha$ -Bisabolol für Mäuse 15.1 ml/kg beträgt. Ab 6.35 ml/kg können Sedierung und Ataxie beobachtet werden. [9] Für Ratten liegt die  $LD_{50}$  bei  $> 5$  g/kg [10] beziehungsweise zwischen 14.9 und 15.6 ml/kg [9]. Sedierung und Ataxie treten bei der gleichen Konzentration wie bei Mäusen (6.35 ml/kg) auf.

Für Hunde und Rhesusaffen konnte die  $LD_{50}$  nicht ermittelt werden, da bei ersteren ab einer Dosis von 12.6 ml/kg (5-10 kg Körpergewicht) Erbrechen einsetzte. Bei den Primaten (3-5 kg) verhinderten Würgereiz und Speichelfluss ab 0.5 ml/kg eine genauere Bestimmung. [9]

Die intraperitoneale  $LD_{50}$  für Mäuse liegt bei 0.635 g/kg  $\alpha$ -Bisabolol. Ab Dosen von 0.2 g/kg treten unter anderem Zittern, Apathie, Dyspnoe und Gangunsicherheiten auf. [10]

### **Untersuchungen auf der Haut**

Kaninchen wurden vier Stunden lang mit semiokklusiven Pflastern behandelt, die reines  $\alpha$ -Bisabolol enthielten. Diese wurden an geschorenen Stellen auf Rücken oder Schenkel angebracht. Alle vier Tiere hatten danach leichte Rötungen. Nach 24 Stunden entwickelten sich bei zweien Erytheme, bei einem ein Ödem. In den darauf folgenden 48 Stunden bildeten sich die Irritationen bei allen Tieren zurück. Am siebten Tag zeigte sich eine Schuppenbildung auf der Haut. [10]

### **Untersuchungen am Auge**

Reines  $\alpha$ -Bisabolol wurde in den Bindehautsack von drei Kaninchen appliziert. Die Tiere wurden nach einer, 24 und 48 Stunden untersucht. Dabei wurden immer Rötungen bei allen Versuchstieren festgestellt. Bei allen zeigte sich nach einer Stunde ein Ausfluss aus dem Auge. Bei zwei davon hatte dieser bei der nächsten Untersuchung geendet. Nach 48 Stunden hatte auch das dritte Kaninchen keinen Ausfluss mehr. An der Iris und der Hornhaut konnten keine Veränderungen festgestellt werden. [10]

### **Phototoxizität**

Bei diesem Test wurde untersucht, ob  $\alpha$ -Bisabolol bei Einstrahlung von UV-Licht, phototoxische Hautreaktionen auslöst. Männlichen Meerschweinchen bekamen  $\alpha$ -Bisabolol (3 und 15% in Ethanol) in den rasierten Nacken aufgetragen. Die Untersuchung wurde mit Kontrollgruppen durchgeführt (unbehandelt, Alkohol, Tetrachlorosalicylanilin). Die Tiere wurden in einem Abstand von 75 cm 15 min lang mit einer Quartzlampe bestrahlt (7.9 klm, 240-540 nm). Nach sieben Tagen Pause wurde die Bestrahlung mit Olivenöl als Trägersubstanz an zwei Tagen hintereinander wiederholt. Auch nach einer weiteren Behandlung an den Hinterbeinen mit  $\alpha$ -Bisabolol in einer herkömmlichen Seifenlösung konnte keine Phototoxizität festgestellt werden. [11]

### **Toxizität bei wiederholter Gabe**

Zwei Hunde (etwa 8 kg) erhielten zwei Wochen lang täglich 1 ml/kg Körpergewicht  $\alpha$ -Bisabolol mittels Magensonde. Es wurden keine Reaktionen beobachtet. [9]

$\alpha$ -Bisabolol (85%) wurde mittels einer Magensonde 40 Ratten verabreicht (durchschnittliches Körpergewicht 100 g, vier Wochen lang täglich, Dosen von 2 und 3 ml/kg Körpergewicht). Eine Kontrollgruppe erhielt täglich 4 ml wässrigen Tylosemucus. In der Gruppe

mit 2 ml/kg wurde eine leichte motorische Erregung beobachtet. Im Urin konnte eine positive Ketonkörper-Reaktion festgestellt werden. Bei der 3 ml/kg Gruppe betrug die Motilitätsrate 20%. Erhöhte motorische Erregung und vermindertes Körpergewicht wurden verzeichnet. Bei weiblichen Ratten gab es eine signifikante Erhöhung der SCOT (serum glutamic oxaloacetic transaminase) und der alkalischen Phosphatase. Bei Männchen stellte man nur eine leichte Erhöhung fest. Die Ketonkörperreaktion war intensiver als in der 2 ml Gruppe. Postmortem wurden Unterschiede zur geringer dosierten Gruppe gefunden. Vermutlich begründen sich diese aber auf Unverträglichkeitsreaktionen. Entzündliche Veränderungen fand man unter anderem in Leber, Magen, Luftröhre und Milz. Diese waren in der höher dosierten Gruppe mit 3 ml  $\alpha$ -Bisabolol/kg Körpergewicht deutlich sichtbarer. Die Forscher vermuten, dass diese inflammatorischen Veränderungen durch die Abmagerung der Tiere hervorgerufen wurde. [9]

Je drei weibliche und drei männliche Hunde erhielten Dosen von  $\alpha$ -Bisabolol zu 2 oder 3 ml/kg Körpergewicht vier Wochen lang täglich. Die Gabe wurde von 3 auf 4 ml/kg für zwei Wochen erhöht. Die Untersuchung beinhaltet auch eine Kontrollgruppe. Bei den Tieren mit 2 ml/kg Körpergewicht wurden Appetitsverlust, verminderte Nahrungsaufnahme und Erbrechen festgestellt. In der 4 ml Gruppe waren die Reaktionen ausgeprägter. Zusätzlich trat vermindertes Körpergewicht auf. Nach vier Wochen stieg die Kreatininkonzentration und die SGPT-Aktivität (Serum Glutamat Pyruvat Transaminase), ebenso wie die Leberfunktion. Ansonsten konnten keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. [9]

Ein semiokklusiver Verband wurde an zehn geschorenen Ratten (je fünf weibliche und männliche) angebracht. Die täglichen Dosen betrug 50, 200 und 1000 mg/kg Körpergewicht  $\alpha$ -Bisabolol (87.5% Reinheit) in einem Olivenölvehikel. Um die entsprechenden Dosen zu erreichen wurden Konzentrationen von 1%, 4% und 20% verwendet. Die Tiere mit einem Körpergewicht von 209-297 g wurden sechs Stunden täglich über vier Wochen behandelt. In den beiden Gruppen mit geringeren Dosen konnte keine Veränderung festgestellt werden. Bei der hochdosierten Gruppe wurde nach einer Woche eine verminderte Körpergewichtszunahme beobachtet. Bei einigen weibliche Ratten dieser Gruppe fanden sich mäßige Erytheme und andere Hautveränderungen. Ebenso wurden erhöhte Leukozyten und Lymphozyten festgestellt. Diese Parameter befanden sich außerhalb der zugänglichen Vergleichsdaten. Die Werte der Kontrollgruppe lagen unterhalb der Vergleichswerte. Die Forscher betrachteten diesen Umstand als zufällig. Der erhöhten

Kalziumkonzentration im Serum wurde keine Bedeutung zugemessen, da sich bei weiblichen Ratten der hochdosierten Gruppe keine ähnlichen Veränderungen feststellen ließen. Bei der 20% Gruppe wurde ein reduziertes Lebergewicht bei Weibchen beobachtet. Das Körpergewicht in dieser Gruppe war um 5.4% bei weiblichen und um 3.7% bei männlichen Ratten geringer als bei der Kontrollgruppe. Der NOAEL (no observable adverse effect level) lag bei 200 mg/kg/Tag. [10]

Über eine Magensonde erhielten 20 Ratten (je zehn eines Geschlechts) sechs Wochen lang 1 ml/kg Körpergewicht  $\alpha$ -Bisabolol. Eine Kontrollgruppe wurde ebenso untersucht. Es konnten keine Reaktionen festgestellt werden. [9]

### **Toxische Einflüsse auf Fortpflanzung und Entwicklung**

Schwangere Ratten (200-262 g) bekamen  $\alpha$ -Bisabolol (98%) über eine Magensonde an den Tagen 6-15 der Schwangerschaft. Die Dosen betragen 0.250, 0.500, 1.0 und 3.0 ml/kg Körpergewicht, wobei die höchste Dosis dazu diente, die Toxizität auf die Muttertiere zu testen. Die beiden Kontrollgruppen wurden für die mütterlichen Aspekte der Untersuchung herangezogen. Am Tag 20 wurden die Feten untersucht. Bis zu Dosen von 1.0 ml/kg wurde kein Einfluss auf die pränatale Entwicklung festgestellt. In der Gruppe mit 3.0 ml/kg wurde eine signifikante Reduktion der Anzahl der Feten festgestellt. Es wurden keine Missbildungen beobachtet. Die Muttertiere zeigten Ataxie, leichte Sedierung, verminderte Futteraufnahme und geringeres Körpergewicht. Die geringste toxische Dosis wurde für Feten und weibliche Ratten zwischen 1.0 und 3.0 ml/kg Körpergewicht festgelegt. [9]

Eine ähnliche Studie wurde an Kaninchen durchgeführt. Das Körpergewicht der Tiere lag zwischen 3.6 und 4.4 kg. Die mittels Magensonde verabreichten Dosen betragen 0.3, 1.0 und 3.0 ml/kg  $\alpha$ -Bisabolol. Diese wurden an den Tagen 6-15 der Schwangerschaft gegeben. Die Studie wurde wiederum mit einer Kontrollgruppe durchgeführt. Die Feten wurden am Tag 30 untersucht. Weder bei der pränatalen Entwicklung noch an den Muttertieren konnten negative Effekte festgestellt werden bei Dosen bis zu 1.0 ml/kg. Die Zahl der lebensfähigen Feten war in der 3.0 ml/kg Gruppe verringert. Es wurden keine Totgeburten oder Missbildungen verzeichnet. Es wurde aber vermindertes Körpergewicht und leichte Sedierung an den gebärenden Tieren verzeichnet. Die geringste toxische Dosis wurde ebenfalls zwischen 1.0 und 3.0 ml/kg Körpergewicht ermittelt, sowohl für Feten als auch für die Muttertiere. [9]

## Mutagenität und Genotoxizität

*Salmonella typhimurium* TA97a, TA98, TA100, TA1535 mit und ohne S9 Aktivität wurden einem Ames-Test unterzogen. Bei Dosen bis zu 100  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -Bisabolol (in Ethanol) pro Platte konnte keine Mutagenität festgestellt werden. [12]

In einem Ames-Assay wurde  $\alpha$ -Bisabolol (86.8% Reinheit) an Stämmen von *S. typhimurium* (TA 98, TA 100, TA 1535 und TA 1537) getestet. Das Standardprotokoll [13] wurde für  $\alpha$ -Bisabolol (in DMSO) in Dosen von 20.0-5000  $\mu\text{g}$ /Platte angewandt. Für Konzentrationen von 1.5-5000  $\mu\text{g}$  wurde das Präinkubationsprotokoll herangezogen. Beide Male wurden die Tests mit und ohne metabolische Aktivierung (S9 aus der Leber von Ratten, induziert mit Aroclor) durchgeführt. Bei der Standardmethode wurden bakteriotoxische Effekte bei Dosen von 100-500  $\mu\text{g}$ /Platte festgestellt, bei der Präinkubationsmethode bei 5-50  $\mu\text{g}$ /Platte.  $\alpha$ -Bisabolol war negativ in diesem Assay. [11]

In einem Chromosomen-Aberrationstest wurde  $\alpha$ -Bisabolol (86.8% Reinheit) an chinesischen Hamster V79 Zellen getestet. Bei der ersten Testreihe wurden die Zellen vier Stunden lang inkubiert. Die  $\alpha$ -Bisabolol-Dosen betragen 0.78, 15.63 und 31.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bei metabolischer Aktivierung (S9 aus der Leber von Ratten, induziert mit Aroclor) beziehungsweise 0.78, 1.56 und 3.13  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ohne Aktivierung.

In der zweiten Versuchsreihe waren die  $\alpha$ -Bisabolol-Dosen 10.0, 20.0, 30.0 und 40.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  mit Aktivierung und 2.0, 3.0 und 4.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ohne Aktivierung. Eine positive Kontrollgruppe wurde mit Ethylmethansulfonat behandelt (ohne Aktivierung), eine weiter mit S9 und Cyclophosphamid. Eine negative Kontrollgruppe blieb unbehandelt, eine zweite wurde mit DMSO als Vehikel versetzt. Alle Gruppen wurden in mehrfacher Ausführung untersucht.

Vor der Analyse wurde Colcemid zugesetzt um die Zellteilung zu stoppen. Nach 18 Stunden wurden die Chromosomen untersucht.

Zusätzlich wurde die hochdosierte Gruppe aus der zweiten Testreihe auch nach 28 Stunden analysiert. Nach der Giemsa-Färbung wurden 100 Zellen in der Metaphase auf Aberration der Chromosomen untersucht. In den Gruppen mit 31.35  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\alpha$ -Bisabolol mit Aktivierung und mit 1.56  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ohne Aktivierung wurde eine signifikant erhöhte Zahl an Gaps festgestellt. Dieses Ergebnis wurde aber als nicht relevant eingestuft, da es innerhalb der bekannten Bandbreite positiver Kontrollgruppen liegt, es nicht reproduzierbar war und die Zahl der Gaps alleine kein geeignetes Kriterium für das Verursachen von Klastogenität ist.  $\alpha$ -Bisabolol zeigte in diesem Chromosomen-Aberrationstest keine

Wirkung. [10]

### **2.1.3 Wirkungen von $\alpha$ -Bisabolol**

#### **Spasmolytische Wirkung von $\alpha$ -Bisabolol**

Kamillentee ist ein bekanntes Hausmittel bei Bauchschmerzen. Um dies zu zeigen untersuchte man Kamillosan<sup>®</sup>, ein Gesamtextrakt der Kamillenblüten, am isolierten Ileum von Meerschweinchen. Als Spasmogen dienten Bariumchlorid, Histamindihydrochlorid, Acetylcholiniodid, Serotonin und Bradykinin. Sowohl myotrop als auch neurotrop ausgelöste Spasmen wurden antagonisiert. Die geringste Wirkung trat bei Acetylcholin als Auslöser neuronaler Krämpfe auf. Bei den folgenden Untersuchungen wurde daher Bariumchlorid als Initiator myotroper Krämpfe verwendet.

Die relative Wirkstärke im Vergleich zu Papaverin war sehr gering. Dies ergibt sich aber aus dem Umstand, dass Kamillosan<sup>®</sup> eine sehr stark verdünnte Lösung ist. Bei höheren Dosen von  $\alpha$ -Bisabolol würde sich eine ähnliche Wirkstärke wie bei Papaverin ergeben. Um die Wirkung chemisch definierten Stoffen zuordnen zu können, wurden weitere Versuche mit dem ätherischen Öl der Kamillenblüten und einigen seiner Bestandteile, sowie anderen lipophilen Inhaltsstoffen, durchgeführt. Auch der hydrophile Anteil des Extraktes wurde fraktioniert und in die Testreihe mit einbezogen.

$\alpha$ -Bisabolol zeigte dabei eine gleich starke muskulotrop spasmolytische Wirkung wie Papaverin. Als zweiter wichtiger Wirkstoff für die spasmolytische Wirkung der Kamillenextrakte stellte sich Apigenin, ein Flavonoid, heraus. [14]

#### **Antiulcerative Wirkung von $\alpha$ -Bisabolol**

Die proteolytische Aktivität von Pepsin wird durch  $\alpha$ -Bisabolol um 50% reduziert. [15] Die Zeit bis zur Heilung von chemisch oder thermisch verursachten Ulzerationen wird verkürzt. Ulzerationen in Ratten bedingt durch Alkohol, Indomethacin und Stress werden verhindert. [15]

An Ratten konnte die protektive Wirkung von  $\alpha$ -Bisabolol (0.8-80 mg/kg) auf die von Acetylsalicylsäure (200 mg/kg) verursachten Ulcerationen bewiesen werden. [16]

#### **Antiinflammatorische Wirkung von $\alpha$ -Bisabolol**

Die entzündungshemmende Wirkung von  $\alpha$ -Bisabolol ist durch viele Tierstudien belegt. [17] Eine Untersuchung nach peroraler Gabe verschiedener Stoffe wurde eine 1% Carrageeninsuspension in eine Hinterpfote von Ratten injiziert. Um die Masse des Ödems zu

bestimmen, wurde die zweite Hinterpfote herangezogen. Als Testsubstanzen dienten (-)- $\alpha$ -Bisabolol, (+)- $\alpha$ -Bisabolol, das Racemat, natürlich gewonnenes und synthetisch hergestelltes, Bisabololoxid A und B, Bisabolonoxid, Dragostanol<sup>®</sup>, Olivenöl. Bei allen getesteten Substanzen konnte eine lineare Dosis-Wirkungskurve festgestellt werden. Bisabololoxid hat etwa 1/3 der Wirksamkeit von  $\alpha$ -Bisabolol, die anderen Substanzen erwiesen sich als ungefähr halb so stark wirksam, außer Dragostanol<sup>®</sup> (rund 1/4 der Wirksamkeit von  $\alpha$ -Bisabolol). [17]

Durch Injektion von abgetötetem *Mycobacterium butyricum* wurde eine Arthritis an einer Hinterpfote von Ratten provoziert. Die Testsubstanzen (Prednisolon,  $\alpha$ -Bisabolol) wurden peroral verabreicht. Die Kontrollgruppe bekam reines Traganth. Ab 250 mg/kg  $\alpha$ -Bisabolol war eine deutliche Hemmung der Vergrößerung der Schwellung ersichtlich. Dosen von 500 mg/kg entsprechen etwa der Wirkung von 1.5 mg/kg Prednisolon. Noch höheren Dosen (1000 und 2000 mg/kg  $\alpha$ -Bisabolol) hemmten die Zunahme des Fußvolumens sehr stark, teilweise fast vollständig. [17]

Bei einem weiteren Tierversuch untersuchte man die Wirkung von  $\alpha$ -Bisabolol bei UV-Erythemen an Meerschweinchen. Die Tiere wurden geschoren und depiliert. Die Testsubstanz wurde sowohl oral (1% in wässrigem Tyloseschleim) als auch perkutan appliziert. Die Bestrahlung erfolgte 30 min später, 15 s lang, mit einem Abstand von 40 cm zum Tierrücken (PQ 600, Hanauer Quarzlampen GmbH, Hanau). Um die Erytheme besser lokalisieren zu können, klebte man eine Plastikfolie mit sechs Löchern auf den Rücken der enthaarten Meerschweinchen. Die Beurteilung erfolgte zwei Stunden nach der Bestrahlung. Als Standardsubstanz diente Salicylamid. Alle Dosen wurden an mehreren Tieren geprüft.  $\alpha$ -Bisabolol hatte etwa 1/3 der entzündungshemmenden Wirksamkeit der Vergleichssubstanz und bewirkte ein dosisabhängige Hemmung der Erythembildung sowohl bei oraler als auch bei perkutaner Anwendung. [17]

### **Antipyretische Wirkung von $\alpha$ -Bisabolol**

Die antipyretische Wirkung von  $\alpha$ -Bisabolol bewies sich beim Hefefieber an Ratten. Dafür injizierte man Hefe (15% Hefe und 15% Traganth in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt) intramuskulär in weibliche Ratten (130-150 g, 1 ml/100g Körpergewicht). Die Gabe der Testsubstanzen erfolgt peroral 16 Stunden später. Als Vergleichssubstanz diente Phenacetin. Die Untersuchung beinhaltete zwei Kontrollgruppen (Nor-

malkontrollgruppe, diese blieb unbehandelt; Fieberkontrollgruppe, diese erhielt nur die Hefeinjektion). Somit konnte der Einfluss der Raumtemperatur auf die Untersuchungsergebnisse soweit als möglich ausgeschlossen werden.  $\alpha$ -Bisabolol senkte bei einer Dosis von 2000 mg/kg das Fieber bis zu zwei Stunden lang um 1.5°C. Der Wirkungseintritt erfolgt im Vergleich zu Phenacetin relativ spät. [17]

#### **2.1.4 Verwendung von $\alpha$ -Bisabolol**

In pharmazeutischer Hinsicht werden vor allem die antiinflammatorischen, spasmolytischen, antiallergischen, antihelminthischen und die permeationsvermittelnden Eigenschaften genutzt. [18] Zur Anwendung gelangen aber meist Verarbeitungsformen der Kamille mit allen ihren Wirkstoffen. Diese sind wesentlich einfacher zu gewinnen als reines  $\alpha$ -Bisabolol und somit auch kostengünstiger. In der alt bekannte Heilpflanze sind auch andere Stoffe enthalten, die die Wirkung des  $\alpha$ -Bisabolols ergänzen. [19]

Neue Ansätze zur Verwendung von  $\alpha$ -Bisabolol als Reinstoff zeigen sich in der Tumorforschung. [20] [21]

$\alpha$ -Bisabolol wird als Duftstoff in Parfums, Shampoos aber auch in der dekorativen Kosmetik und anderen ähnlichen Anwendungsgebieten verwendet. Eine genaue Auflistung findet sich im Final Report on the Safety Assessment of Bisabolol und ist in Tabelle 2.1 wieder gegeben. Auch in nicht kosmetischen Artikeln ist es zu finden, so zum Beispiel in Haushaltsreinigern und Waschmitteln. [10]

Tabelle 2.1: Verwendung von Bisabolol in kosmetischen Produkten, Quelle: Final Report on the Safety Assessment of Bisabolol[10]

| Produktkategorie  | Anzahl der untersuchten Produkte | Anzahl derer, die Bisabolol enthalten | Konzentration              |
|---|----------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| Babyöle, -lotionen, -puder, -cremen                         | 51                               | 3                                     |                            |
| Badezusätze   | 141                              | 1                                     | 0.25%                      |
| Augengele   | 18                               | 2                                     |                            |
| Augen-Makeup-Entferner                                      | 80                               | 3                                     |                            |
| Wimperntusche   | 158                              | 2                                     |                            |
| andere Augen-Makeup-Produkte                                | 116                              | 4                                     | <0.1%                      |
| andere Duft-Produkte  | 137                              | 3                                     | 0.01%                      |
| Pflegespülungen   | 596                              | 1                                     |                            |
| Bleichmittel für die Haare                                  | 104                              | 1                                     |                            |
| Makeup-Produkte zur Grundierung                             | 283                              | 3                                     |                            |
| Lippenstifte  | 758                              | 2                                     | 0.001% (Lippenbalsam 0.2%) |
| Makeup  | 125                              | 2                                     |                            |
| Produkte für weichere Nagelhaut                             | 19                               | 1                                     | 0.05%                      |
| andere Produkte für die Maniküre                            | 59                               | 1                                     |                            |
| Badeseifen und Schaumwaschmittel                            | 341                              | 2                                     | bis zu 0.02% (Duschgel)    |
| Deodorants (Unterarm)                                       | 241                              | 4                                     | 1%                         |
| andere Produkte für die körperliche Reinlichkeit            | 262                              | 3                                     |                            |
| Aftershaves   | 212                              | 20                                    | 0.01%                      |
| Preshave-Lotionen   | 14                               | 1                                     |                            |
| Rasiercremen  | 138                              | 2                                     | 0.01%                      |
| andere Produkte zum Rasieren                                | 60                               | 1                                     |                            |
| Reinigungsmittel  | 630                              | 14                                    | 0.01%                      |
| Enthaarungsmittel   | 27                               | 1                                     |                            |
| Hautpflegeprodukte für Gesicht und Hals                     | 251                              | 14                                    | 0.05%                      |
| Hautpflegeprodukte für Körper und Hände                     | 776                              | 18                                    | 0.01%                      |
| Fußpuder, -sprays   | 32                               | 1                                     |                            |
| feuchtigkeitsspendene Produkte                              | 743                              | 21                                    | 0.01%                      |
| Produkte für die Nacht                                      | 185                              | 6                                     | 0.02%                      |
| Peelings (Schlamm packungen)                                | 247                              | 12                                    |                            |
| Haut-Toniks   | 181                              | 4                                     |                            |
| andere Produkte für die Haut (Cremen/Lotionen/Puder/Sprays) | 683                              | 25                                    | 0.1-1%                     |
| Sonnenschutzprodukte (Gele, Cremen, Fluide)                 | 134                              | 3                                     |                            |
| Selbstbräuner   | <sup>23</sup> 50                 | 2                                     |                            |
| andere Produkte zur Sonnenbräunung                          | 43                               | 1                                     |                            |

## 2.2 Acthyderm

Dass  $\alpha$ -Bisabolol die Haut durchdringt, ist bekannt. Eine Untersuchung zu der genauen Resorption wurde an Nacktmäusen durchgeführt. [22]

In dem vorliegenden Pilotprojekt wurde das ätherische Öl auf die menschliche Haut aufgetragen. Um die Resorption zu erhöhen verwendete man Acthyderm.

Acthyderm ist ein Gerät, das die Elektroporation anwendet um Wirkstoffe in großen Mengen in tiefe Hautschichten zu transportieren. Durch kaum spürbaren Strom werden winzige Kanäle in der Haut geöffnet. Diese erleichtern den Durchtritt durch die äußeren Hautschichten, die als natürliche Barriere dienen. Zusätzlich dazu wird auch das Eindringen der Substanzen direkt in das Innere der Zellen ermöglicht. Eine breite Verwendungsmöglichkeit liegt im ästhetischen Bereich. Schlanke Haut, Falten und Cellulite können mit dieser Methode ohne Nadel, Skalpell und Schmerzen ausgeglichen werden. Medizinisch relevanter ist jedoch die Schmerztherapie. Analgetisch und/oder antiinflammatorisch wirksame Substanzen werden mittels Bio-Carrier direkt zum Ort der Schmerzentstehung geschleust. Die große Eindringtiefe von bis zu 10 cm erlaubt es auch tief liegende Gelenke und Entzündungsherde effektiv zu behandeln.[23]

Um Stoffe in die tiefer gelegenen Hautschichten zu transportieren wird in der Kosmetik die Mesotherapie angewendet. Bei dieser Methode werden feine Nadeln als Transportmittel verwendet. Die Mesotherapie hat sich weiter entwickelt zur Mesoporation. Hierbei wird das gleiche Prinzip wie bei der Elektroporation genutzt. Bei der Mesoporation werden durch elektrischen Strom Kanäle durch die oberste Hautschicht und in die Zellen der darunter liegenden Gewebe gebildet. Dazu werden auf der Hautoberfläche eine Stiftelektrode und eine Rollerelektrode angesetzt. Ein Mikroprozessor erzeugt je nach gewähltem Behandlungsprogramm gepulsten Strom. Dadurch öffnen sich zahlreiche Kanäle, die sich nach dem Ende der Behandlung wieder vollständig schließen. Ein Gel mit dem zu resorbierenden Stoff wird zu Beginn aufgetragen, der Überschuss wird nach Öffnung der Kanäle mit Hilfe eines Roll-ons vollständig unter die Haut gebracht. Je nach gewähltem Therapiebereich dauert eine Behandlung 15-20 min.

Die Schaffung neuer Eintrittswege durch das *Stratum corneum* ist durch zahlreiche Experimente bewiesen. Unter anderem durch Untersuchung von Hautpräparaten, HPLC-Nachweis eingedrungener Substanzen, radioaktiv markierter Teilchen und Experimenten in Diffusionskammern. Der Erfolg dieser nicht-invasiven Technik beruht auf einigen

wichtigen Parametern, die am MIT (Massachusetts Institute of Technology) in den USA entwickelt wurden. Dazu zählen eine geeignete Wellenform des Trägerstroms, spezielle Frequenzen für die zu erzielenden Eindringtiefen, ein adäquater Winkel des elektromagnetischen Feldvektors durch Lage der Gegenelektrode, ausreichende Pulsdauer und Stromdichte zur Öffnung neuer Kanäle und überlagerter Gleichstrom zur Nutzung des Elektrorepulsionseffekts.

An der Universität Neapel wurde die Eindringtiefe von  $\alpha$ -Tocopherol in die Epidermis und in die Dermis gemessen. Dazu wurde eine Franz-Zelle verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels HPLC. Die Untersuchung verglich herkömmliches mechanisches Auftragen mit der Mesoporation durch Acthyderm. In der Epidermis ist der Unterschied zwischen den beiden Methoden nur gering (102.2  $\mu\text{g/ml}$  und 115.1  $\mu\text{g/ml}$ ). In der Dermis ist der Unterschied sehr hoch. Mehr als das 15-fache an  $\alpha$ -Tocopherol konnte in der tiefer gelegenen Schicht nachgewiesen werden (8.3  $\mu\text{g/ml}$  zu 145.5  $\mu\text{g/ml}$ ). [24]

Im Gegensatz zur Mesoporation arbeitet man bei der Iontophorese mit Gleichstrom. Wirkstoffen wird dadurch das Durchdringen der natürlichen Hautbarriere erleichtert. Auch der Vergleich mit Iontophorese zeigt, dass mit Acthyderm eine sehr große Eindringtiefe erreicht werden kann. Radioaktiv markierte Peptide konnten zu 99% in 1 cm Tiefe nachgewiesen werden (Iontophorese 10%). 6 cm unter der Auftragefläche konnten immerhin noch 65% der Radioaktivität nachgewiesen werden, während sich nach Iontophorese nur 3% fanden. [25]

Diese Ergebnisse zeigen klar, dass Acthyderm, im Gegensatz zur Iontophorese, neue Eintrittswege öffnet und nicht nur vorhandene Eintrittspforten, wie Schweißdrüsen und Haarwurzeln, benutzt.



Abbildung 2.4: Acthyderm

Quelle: <https://s-media-cache-ak0.pinimg.com/originals/78/df/9b/78df9b214b00fa95f7970146408023d4.jpg>

### 3 Experimenteller Teil

Ziel dieses Pilotprojektes war es,  $\alpha$ -Bisabolol aus dem menschlichen Urin nachzuweisen, nachdem es im Bauchbereich aufmassiert worden war.

$\alpha$ -Bisabolol ist ein flüchtiger Stoff, daher eignen sich Methoden zur Analyse von Gasen sehr gut. In einem Gaschromatographen (GC) werden die Bestandteile eines Gasgemisches getrennt. Je nach Polarität und Dampfdruck wandern die gasförmigen Moleküle unterschiedlich schnell durch die Säule und werden so aufgetrennt. Die einzelnen Stoffe können mit einem angekoppelten Massenspektrometer (MS) identifiziert werden.

Es gibt verschiedene Varianten um die zu untersuchende Probe in den Gaschromatographen ein zu speisen.

Bei der solid phase microextraction (SPME) adsorbiert eine beschichtete Nadel das Gasgemisch. Mit dieser beladenen Nadel kann die Probe in den Gaschromatographen eingebracht werden. Durch sehr lange Adsorptionszeiten können auch geringste Mengen einer gesuchten Substanz analysiert werden.

Bei der Headspace-Methode (HS) wird ein Teil des Dampftraumes über der Flüssigkeit mit einer entsprechenden Nadel eingesaugt und direkt in den Gaschromatographen injiziert.

Zu Beginn der Diplomarbeit wurden einige Vorproben analysiert. Diese dienten einer ersten Orientierung. Störende Peaks des Massageöls oder des Harns konnten dadurch ausgeschlossen werden. Auch die Retentionszeit des  $\alpha$ -Bisabolols wurde bestimmt.

Anschließend führte man eine Analyse einer Verdünnungsreihe durch. Dadurch wurde ermittelt, in welcher Konzentration  $\alpha$ -Bisabolol noch identifiziert werden kann.

Um erste Anhaltspunkte zu erhalten, ob man  $\alpha$ -Bisabolol direkt nach der Massage auf den Bauchbereich wieder findet, wurde ein Selbstversuch unternommen.

Da  $\alpha$ -Bisabolol weder beim Selbstversuch, noch bei den Proben der Probanden mittels SPME nachgewiesen werden konnte, wurden noch zwei weitere Methoden mittels HS durchgeführt.

### 3.1 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden bei dieser Arbeit verwendet:

- $\alpha$ -Bisabolol ca. 95% Reinheit  
Hersteller: Art of Beauty, Naturprodukte, -rohstoffe, 4600 Wels (A)  
Charge 050509
- (-)- $\alpha$ -Bisabolol  
Vertrieb: Kurt Kitzing, Wallerstein (D)  
BASF Lot. 60-0981; 26.08.10  
Analysezertifikat siehe Abbildung 3.1 *Analysezertifikat des  $\alpha$ -Bisabolols des Herstellers Kurt Kitzing*

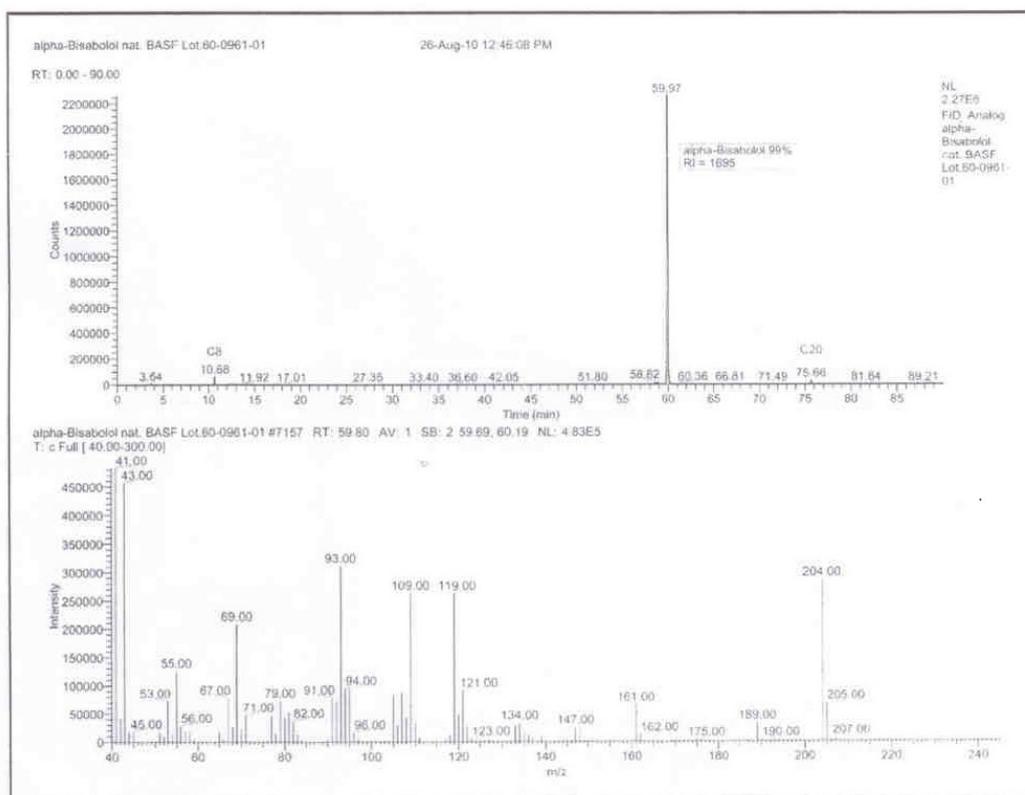


Abbildung 3.1: Analysezertifikat des  $\alpha$ -Bisabolols (Kurt Kitzing)

- Aloe vera Öl  
Hersteller: Prima Vera  
Charge 02301111

- Amidosulfonsäure ( $\text{H}_2\text{NSO}_3\text{H}$ )

Merck, Darmstadt, Charge: 531 CC431903,  $M=97,09$  g/mol

Garantieschein:

|                          |             |
|--------------------------|-------------|
| Gehalt (acidimetrisch)   | min.99.5%   |
| Chlorid (Cl)             | max.0.001%  |
| Nitrat ( $\text{NO}_3$ ) | max.0.002%  |
| Sulfat ( $\text{SO}_4$ ) | max.0.02%   |
| Schwermetalle (als Pb)   | max.0.0005% |
| Eisen (Fe)               | max.0.0005% |
| Glührückstand (600°C)    | max.0.02%   |

## 3.2 Geräte

Folgende Geräte von Thermo Scientific wurden bei diesem Pilotprojekt verwendet:

- Tri Plus Asassembly  
Nadel: SPME Fiber 2 cm - 50/30  $\mu\text{m}$  DVB Carboxen TM/PDMS Stable Flex TM
- Trace GC Ultra Säulen:
  - Säule Thermo TR-1MS 60 m x 0.25ID x 0.25  $\mu\text{m}$
  - Thermo TR-1MS 30 m x 0.25ID x 0.25  $\mu\text{m}$
- Massenspektrometer DSQII
- Vials
  - 20 ml; Thermo Scientific Crimp top Vial 20 ml, clear pk 125
  - 10 ml; Thermo Scientific Crimp top Vial 10 ml, clear pk 125

Zur Analyse der Daten diente die Software XcaliburTMsoftware 1.4. SR1, ThermoElectron Corporation 1998-2003.

Andere Geräte, die bei dieser Arbeit verwendet wurden:

- Massagegerät: Acthyderm
- Hubkolbenpipetten
- handelsübliche Frischhaltefolie

## 3.3 SPME-Analysen

### 3.3.1 Vorproben

Für eine erste Orientierung wurde ein Tropfen  $\alpha$ -Bisabolol vermessen. Das Gleiche geschah mit reinem Aloe vera Öl. Ebenso wurde eine Blindprobe des Harns analysiert. Dadurch konnte festgestellt werden, ob die verwendeten Substanzen Peaks aufweisen, die jene des  $\alpha$ -Bisabolols überlagern.

Die Geräteeinstellungen wurden aus einer Untersuchung abgeleitet, bei der  $\alpha$ -Bisabolol in Blutproben nachgewiesen wurde. [8]

#### TriPlus Autosampler

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| Inkubationsmodus          | konstant  |
| Agitortemperatur          | 40°C      |
| Agitator an               | 10 sec    |
| Agitator aus              | 10 sec    |
| Inkubationszeit           | 10 min    |
| Syringe Temperatur        | 40°C      |
| Füllungsgeschwindigkeit   | 50 ml/min |
| Injektionsgeschwindigkeit | 50 ml/min |
| Injektionstiefe           | 20 mm     |
| Stand-by Agitator Temp    | 40°C      |
| Stand-by Syringe Temp     | 40°C      |

#### Trace GC Ultra

##### Split-Splitless Modus

|                  |  |
|------------------|--|
| Starttemperatur  | 100°C für 1.5 min  |
| Startzeit        | 1 min  |
| Aufheizrate      | 30°C/min bis 170°C für 1 min<br>25°C/min bis 240°C für 2 min |
| Endtemperatur    | 240°C  |
| Split Flow       | 40 ml/min  |
| Splitless Time   | 10 min   |
| MS transfer line | 260°C  |

|                          |                   |
|--------------------------|-------------------|
| Massenspektrometer DSQII |                   |
| Source Temp              | 280°C             |
| Startzeit                | 7 min             |
| Scantime                 | 0.13s             |
| Scanmodus                | SIM oder fullscan |
| Erste Masse              | 50.0              |
| Letzte Masse             | 650.0             |

Vorwiegend wurde mittels SIM (single ion monitoring) der Peak mit der Masse 119 gescannt, aber auch Massen von 109 und 204. Zum Nachweis des  $\alpha$ -Bisabolols wurde der Fullscan-Modus verwendet.

### 3.3.2 Verdünnungsreihe

Um die Nachweisgrenze von  $\alpha$ -Bisabolol mittels SPME-GC-MS-Analyse zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe angelegt. 1  $\mu$ l  $\alpha$ -Bisabolol wurde in 10 ml Harn suspendiert. 1 ml dieser Suspension wurde mit 9 ml Harn verdünnt. Dieser Vorgang wurde einige Male wiederholt. Daraus ergab sich die Verdünnungsreihe, deren Konzentrationen in Tabelle 3.1 angeführt sind.

Peaks mit hoher Extinktion vor der Retentionszeit des  $\alpha$ -Bisabolols wurden ausgeschlossen, indem die Analyse erst nach fünf beziehungsweise sieben Minuten gestartet wurde. Um geringere Konzentrationen des  $\alpha$ -Bisabolols messen zu können, wurde die Adsorptionszeit auf 30 min erhöht. Bei der gegebenen Problemstellung ist es wichtig  $\alpha$ -Bisabolol nachzuweisen, und nicht die Konzentration zu bestimmen. Daher wurden auch Messungen unter der LOD (limit of detection) von 0.13  $\mu$ mol/l durchgeführt. [8]

Tabelle 3.1: Konzentrationen der Verdünnungsreihe

| Verdünnung         | c [mol/l]            | $\beta$ [g/l]        |
|--------------------|----------------------|----------------------|
| 1 $\mu$ l:10 ml    | 0.02                 | $93 \cdot 10^{-6}$   |
| 0.1 $\mu$ l:10 ml  | $2.07 \cdot 10^{-3}$ | $9.3 \cdot 10^{-6}$  |
| 0.01 $\mu$ l:10 ml | $2.07 \cdot 10^{-4}$ | $9.3 \cdot 10^{-7}$  |
| 1 nl:10 ml         | $2.07 \cdot 10^{-5}$ | $9.3 \cdot 10^{-8}$  |
| 0.1 nl:10 ml       | $2.07 \cdot 10^{-6}$ | $9.3 \cdot 10^{-9}$  |
| 0.01 nl:10 ml      | $2.07 \cdot 10^{-7}$ | $9.3 \cdot 10^{-10}$ |

Um eventuell mit dem kostspieligen Enzym Glucuronidase arbeiten zu können, wurde das zu analysierende Probevolumen im Vial auf 1 ml verringert.

## 3.4 HS-Analysen

In den Harnproben nach den Massagen konnte  $\alpha$ -Bisabolol mittels SPME nicht nachgewiesen werden. Daher wurden andere Methoden verwendet, die im Department bereits erfolgreich verwendet worden waren. Dabei handelt es sich um HS-Analysen. Bei den untersuchten Stoffen handelte es sich um ein Sesquiterpene, wie das  $\alpha$ -Bisabolol, und um ein Monoterpene. Diese sind nur aus zwei Isopreneinheiten aufgebaut.

### 3.4.1 HS-Methode 1 basierend auf der Diplomarbeit von Maria Lindmayr

Bei der Diplomarbeit mit dem Titel „Nachweis von *cis*-Nerolidol im humanen Urin mittels GC-MS nach transdermaler Applikation“ wurde unter anderem auch  $\alpha$ -Bisabolol als Vergleichssubstanz verwendet. Aufgrund der dort gesammelten Erfahrungen wurden folgende Einstellungen der Geräte übernommen: [26]

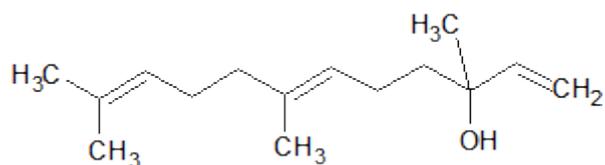


Abbildung 3.2: Strukturformel von *cis*-Nerolidol  
erstellt mit ChemSketch 12.0

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| TriPlus Autosampler       |           |
| Inkubationsmodus          | konstant  |
| Analysendauer             | 16 min    |
| Probennahme               | 1 ml      |
| Anreicherungsverzug       | 1 min     |
| Probentiefe Vial          | 25 mm     |
| Agitortemperatur          | 60°C      |
| Agitator an               | 10 sec    |
| Agitator aus              | 10 sec    |
| Inkubationszeit           | 15 min    |
| Syringe Temperatur        | 70°C      |
| Füllungsgeschwindigkeit   | 50 ml/min |
| Injektionsgeschwindigkeit | 50 ml/min |
| Injektionstiefe           | 20 mm     |
| Pre- injectiondelay       | 3 sec     |
| Post-injectiondelay       | 3 sec     |
| Stand-by Agitator Temp    | 40°C      |
| Stand-by Syringe Temp     | 50°C      |
| Sync Modus                | normal    |

#### Trace GC Ultra

##### Split-Splitless Modus

|                 |           |
|-----------------|-----------|
| Starttemperatur | 50°C      |
| Startzeit       | 1 min     |
| Aufheizrate     | 15°C/min  |
| Endtemperatur   | 230°C     |
| Split Flow      | 10 ml/min |
| Splitless Time  | 1 min     |

##### Massenspektrometer

|              |          |
|--------------|----------|
| Source Temp  | 200°C    |
| Startzeit    | 3 min    |
| Scanrate     | 2637.10  |
| Scanmodus    | fullscan |
| Erste Masse  | 50.0     |
| Letzte Masse | 650.0    |

### 3.4.2 Zugabe von Amidosulfonsäure

Im menschlichen Körper werden sehr viele Stoffe metabolisiert, um diese mit dem Harn ausscheiden zu können. Potenziell geschieht dies auch mit  $\alpha$ -Bisabolol. Um diese Phase-II-Metabolite zu spalten und wieder das ursprüngliche Molekül analysieren zu können, wollte man Glucuronidase verwenden. Daher wurde das Probevolumen in den Vials von 10 auf 1 ml verringert. Aus Kostengründen konnte das Enzym aber nicht eingesetzt werden.

Die Abspaltung von  $\alpha$ -Bisabolol aus den Metaboliten kann auch mittels Säure durchgeführt werden. Flüchtige Säuren können bei den verwendeten Analysemethoden nicht verwendet werden, da sie die Säule korrodieren würden. Deswegen entschied man sich für Amidosulfonsäure ( $\text{H}_2\text{NSO}_3\text{H}$ ). Diese liegt bei Raumtemperatur in fester Form vor und tritt deshalb nicht in den Gasraum über.

Prinzipiell könnten auch flüssige Säuren verwendet werden. Diese müssten aber zum Beispiel durch Abdampfen entfernt werden. Bei  $\alpha$ -Bisabolol handelt es sich um einen flüchtigen Stoff. Es würde wahrscheinlich ebenfalls mit aus der Probe entfernt werden.

Mit Amidosulfonsäure liegt eine kostengünstige Variante vor, die alle Anforderungen schnell und ohne großen gerätetechnischen Aufwand erfüllt.

Alle Einstellungen des GC-MS wurden wie in der in Kapitel 3.4.1 beschriebenen HS-Methode belassen.

Die Harnprobe wurde im Vial mit einer Spatelspitze Amidosulfonsäure versetzt.

### 3.4.3 HS-Methode 2 basierend auf der Arbeit von Susanne Friedl

Bei dieser Untersuchung wurde (-)-Linalool (Abb. 3.3) mittels verschiedener Trennmethoden aus Blutproben nachgewiesen. Dabei wurde flüssig-flüssig-Extraktion mit SPME und Headspace verglichen. [27]

Das Volumen der Harnproben betrug bei dieser Dampfmanalyse 4 ml. Eine genaue Einstellung der Geräte kann der nachfolgenden Liste entnommen werden.

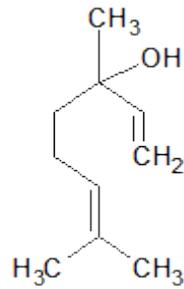


Abbildung 3.3: Strukturformel von (-)-Linalool  
erstellt mit ChemSketch 12.0

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| TriPlus Autosampler       |           |
| Inkubationsmodus          | konstant  |
| Analysendauer             | 10min     |
| Probennahme               | 2 ml      |
| Anreicherungsverzug       | 0.1 min   |
| Probentiefe Vial          | 30 mm     |
| Agitortemperatur          | 60°C      |
| Agitator an               | 10 sec    |
| Agitator aus              | 10 sec    |
| Inkubationszeit           | 60 min    |
| Syringe Temperatur        | 70°C      |
| Füllungsgeschwindigkeit   | 25 ml/min |
| Injektionsgeschwindigkeit | 50 ml/min |
| Injektionstiefe           | 30 mm     |
| Pre- injectiondelay       | 3 sec     |
| Post-injectiondelay       | 3 sec     |
| Stand-by Agitator Temp    | 40°C      |
| Stand-by Syringe Temp     | 50°C      |
| Sync Modus                | normal    |

Trace GC Ultra  
Splitless Modus  
Starttemperatur 100°C für 1.5 min  
Startzeit 1 min  
Aufheizrate 30°C/min bis 170°C für 1.5 min  
25°C/min bis 240°C für 2 min  
Endtemperatur 240°C  
Split Flow 30 ml/min  
Splitless Time 1 min

Massenspektrometer  
Source Temp 250°C  
Startzeit 6 min  
Scanrate 500  
Scanmodus SIM - 109, 119, 204

## 3.5 Methoden zum Auftragen von $\alpha$ -Bisabolol

Für die Diplomarbeit wurde  $\alpha$ -Bisabolol mit zwei unterschiedlichen Methoden auf den Bauchbereich aufgetragen.

### 3.5.1 Selbstversuch

Aufgrund der Verdünnungsreihe konnte man davon ausgehen,  $\alpha$ -Bisabolol in entsprechend kleinen Menge nachweisen zu können. Zunächst wurde ein Selbstversuch gestartet. Man massierte sich selber 3 ml einer 20%igen Lösung von  $\alpha$ -Bisabolol in Aloe vera Öl im unteren Bauchbereich auf. Dieser Bereich wurde mit Frischhaltefolie umwickelt und diese dort für 20 min belassen. Die Folie sollte das Abdampfen des ätherischen Öls verhindern. Damit  $\alpha$ -Bisabolol besser in die Haut eindringt wurde während dieser Zeit zusätzlich eine Wärmflasche auf den Bauch gelegt. Über einen Zeitraum von 24 Stunden wurden Harnproben gesammelt. Die Zeiten dazu sind in Tabelle 3.2 *Zeitpunkte der Probennahme des Selbstversuches* angeführt. Bei SV1 handelt es sich um die Harnprobe direkt vor der Massage.

Tabelle 3.2: Zeitpunkte der Probennahme des Selbstversuches

| Name der Probe | Uhrzeit |
|----------------|---------|
| SV1            | 14:00   |
| SV2            | 14:43   |
| SV3            | 16:10   |
| SV4            | 19:05   |
| SV6            | 22:05   |
| SV7            | 09:05   |

### 3.5.2 Mesoporation mittels Acthyderm

Vier Erwachsene beiderlei Geschlechts stellten sich für diese Untersuchung zur Verfügung. Die Auswahl der Probanden erfolgte durch Dr. Gerda Dorfinger. Die Behandlung mit dem Acthyderm-Gerät wurde von ihr in ihrer Praxis durchgeführt.

3 ml einer 20%igen Lösung von  $\alpha$ -Bisabolol in Aloe vera Öl wurden genau über der Blase mit Acthyderm (siehe Kapitel 2.2) aufgetragen. Um die exakte Lage der Harnblase zu ermitteln, wurde ein Ultraschallgerät verwendet. In vorher festgelegten zeitlichen Abständen wurden Harnproben genommen. Diese sind in Tabelle 3.3 *Harnproben der Probanden* angegeben.

Tabelle 3.3: Harnproben der Probanden

| Probennummer | Zeit nach der Massage  |
|--------------|------------------------|
| 1            | direkt vor der Massage |
| 2            | 30 min                 |
| 3            | 2 h                    |
| 4            | 4 h                    |
| 5            | 6 h                    |
| 6            | 24 h                   |
| 7            | 48 h                   |

Die Harnproben wurden von Dr. Dorfinger vor Ort gesammelt und tiefgefroren. Anschließend wurden die Proben in einer Kühlbox an die Universität Wien gebracht.

# 4 Ergebnisse

## 4.1 SPME-Analysen

### 4.1.1 Vorproben

Für die ersten Versuche des Pilotprojektes wurde das  $\alpha$ -Bisabolol mit 95%iger Reinheit verwendet.

Die Retentionszeit des  $\alpha$ -Bisabolols war für die gewählten Einstellungen mit dem vorhandenen Gerät unbekannt. Des Weiteren lag keine GC-MS-Analyse von Aloe vera Öl vor. Auch eine gaschromatographische Auswertung von Urin lag fehlte.

#### **Erstanalyse von $\alpha$ -Bisabolol**

Um die Retentionszeit des  $\alpha$ -Bisabolol mittels SPME-GC-MS zu bestimmen, vermaß man einen Tropfen ätherisches Öl mittels Fullscan (Abb. 4.1).

Das Ergebnis des MS zeigte, dass die Retentionszeiten des  $\alpha$ -Bisabolols bei 8.4 und 8.6 min lagen. Die Ursache der Peakspaltung war zu diesem Zeitpunkt unklar.

Die Peaks zwischen den Zeiten von 2.8 bis 7.6 min ergeben sich aus dem Umstand, dass kein reines  $\alpha$ -Bisabolol verwendet wurde. Sie zeigen die 5% Verunreinigung.

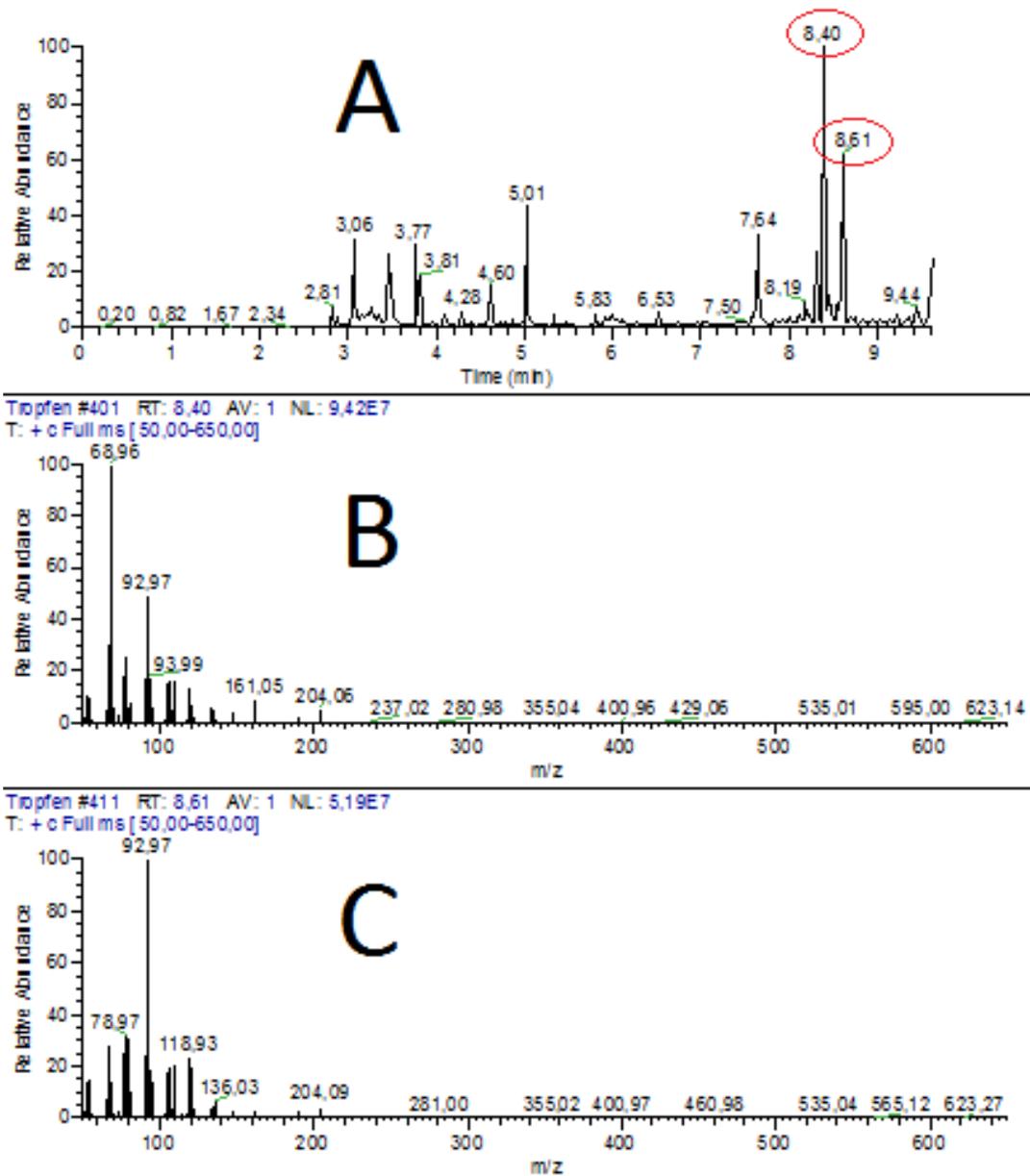


Abbildung 4.1:  $\alpha$ -Bisabolol 95% mittels SPME  
 A: Gaschromatogramm, B: Massenspektrum des Peaks bei 8.4 min,  
 C: Massenspektrum des Peaks bei 8.6 min

## Blindmessungen

Um eventuelle Überlagerungen der Peaks des Aloe vera Öls und des Harns mit denen des  $\alpha$ -Bisabolols auszuschließen, wurden erstere ohne ätherisches Öl untersucht.

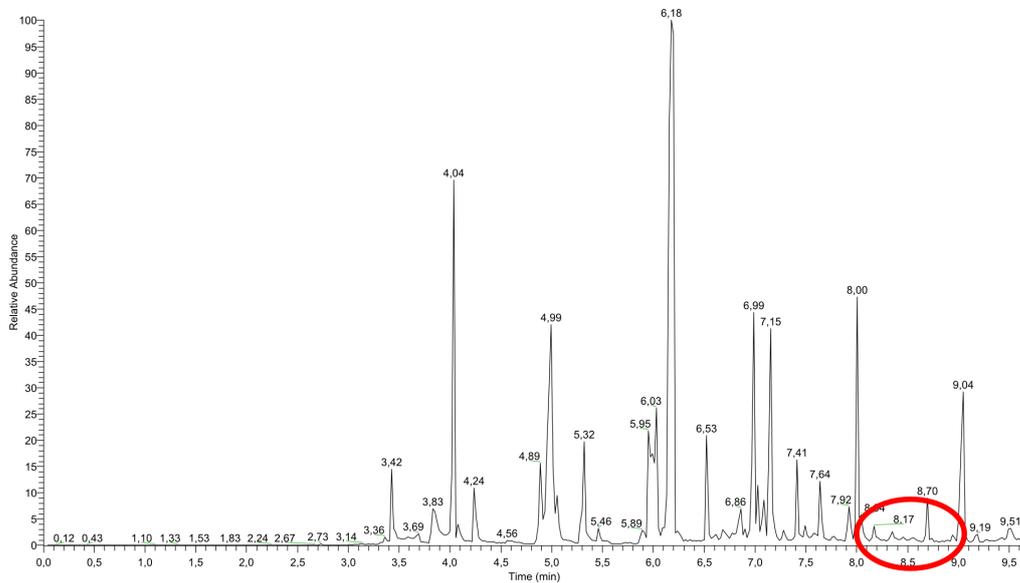


Abbildung 4.2: Harnprobe mittels SPME

Bei der Analyse der Harnprobe (Abb. 4.2) zeigten sich viele Peaks. Zwischen 8.0 und 8.7 min traten keine auf (als roter Kreis markiert). Die Retentionszeit des  $\alpha$ -Bisabolols war genau dazwischen. Somit lagen in dieser Harnprobe keine Substanzen vor, die die Peaks des  $\alpha$ -Bisabolols überlagern würden. Die Peakspaltung, die sich bei der Untersuchung des ätherischen Öls zeigte, ist aufgrund der Zahl an Peaks in der Harnprobe ein Nachteil. Für spätere Versuche mit den Urinproben der Probanden musste dieses Problem behoben werden (siehe Kapitel 4.1.4).

Die Peaks des Aloe vera Öls (Abb. 4.3) erschienen bei früheren Retentionszeiten als das  $\alpha$ -Bisabolol. Weiter hinten waren Peaks, welche die Untersuchung des ätherischen Öls aber nicht beeinflussten (roter Kreis in der Abbildung). Daher schien Aloe vera Öl zum Verdünnen von  $\alpha$ -Bisabolol für die Massage gut geeignet.

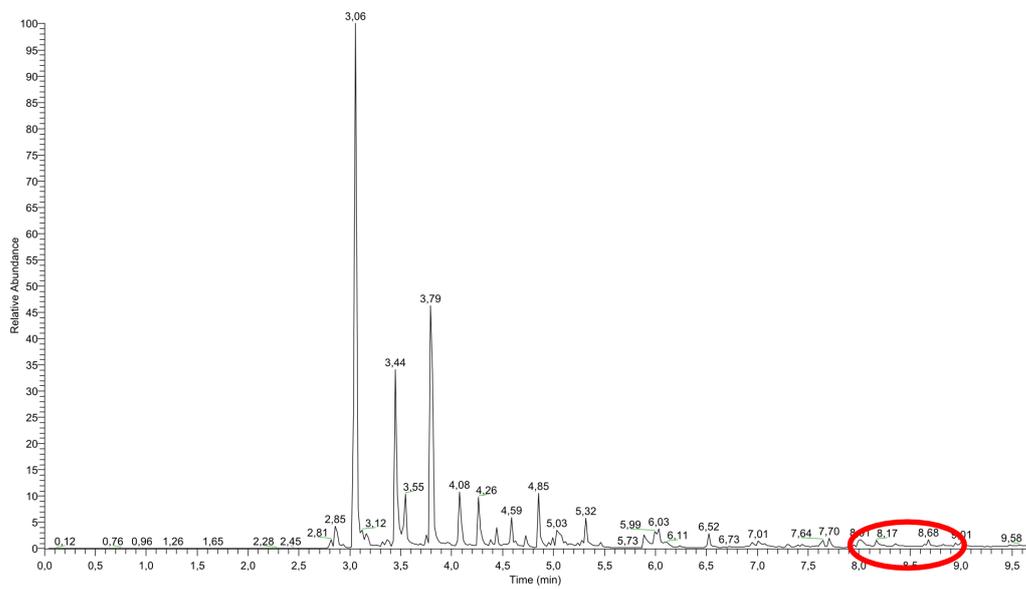


Abbildung 4.3: Aloe vera Öl mittels SPME

### **Stabilität von $\alpha$ -Bisabolol im Harn**

Um die Stabilität des  $\alpha$ -Bisabolols im Urin zu testen, wurde eine Probe von 0.1  $\mu$ l  $\alpha$ -Bisabolol in 10 ml Harn für zwei Tag bei 40°C inkubiert.

$\alpha$ -Bisabolol war auch nach der Inkubation deutlich nachweisbar (Abb. 4.4 und 4.5). Die größere Höhe der Peaks ergab sich aus dem Umstand, dass an der y-Achse die relative Häufigkeit in Prozent angegeben war. Im Harn wurden Substanzen durch die Inkubation verändert, so dass die Peaks von Minute 5 bis 7 kleiner wurden (grüner Pfeil in der Abbildung), da auch deren Konzentration vermindert war. Damit erhöhte sich die relative Häufigkeit des  $\alpha$ -Bisabolols.

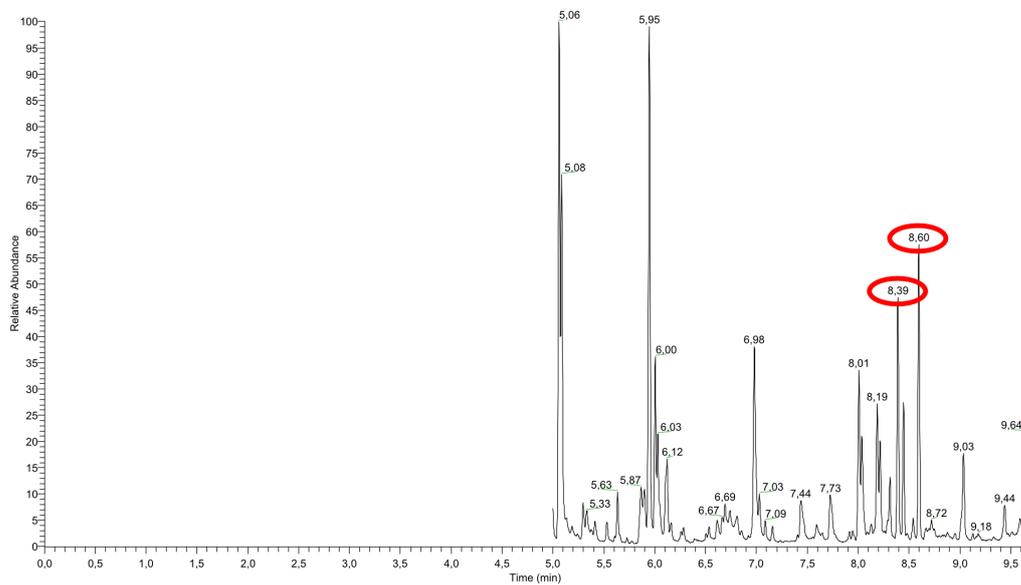


Abbildung 4.4: 0.1 µl α-Bisabolol in 10 ml Harn vor der Inkubation

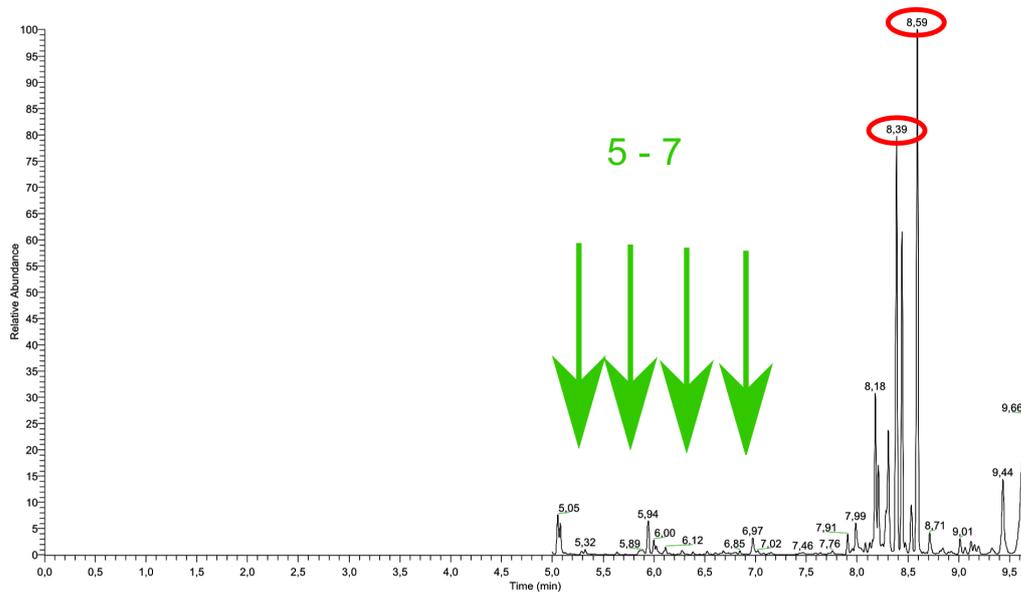


Abbildung 4.5: 0.1 µl α-Bisabolol 10 ml in Harn nach der Inkubation

## 4.1.2 Verdünnungsreihe von $\alpha$ -Bisabolol

Die Verdünnungsreihe (siehe 3.3.2) wurde mittels SIM vermessen. Daher waren keine Massenspektren zu den Gaschromatogrammen verfügbar, um das ätherische Öl nachzuweisen. Aus den Vorproben waren die Retentionszeiten von  $\alpha$ -Bisabolol bekannt. Als Nachweis legte man die Peaks bei den Retentionszeiten 8.4 und 8.6 min fest.

Die Intensität der gesuchten Peaks nahm wie zu erwarten stetig ab (Abb. 4.6 und Abb. 4.7). Um  $\alpha$ -Bisabolol auch in geringeren Konzentrationen nachzuweisen, wurde die Messung erst nach 7 min begonnen. In einem weiteren Schritt wurde die Adsorptionszeit auf 30 min verlängert. Dadurch waren die Peaks des ätherischen Öles wieder deutlicher zu erkennen (Abb. 4.8 im Vergleich zu Abb. 4.9). In den nachfolgenden Abbildungen ist  $\alpha$ -Bisabolol durch rote Kreise gekennzeichnet.

Ausschlaggebend für die höhere relative Intensität der Peaks war die erhöhte Adsorptionszeit. Der spätere Messbeginn hatte weniger Einfluss.

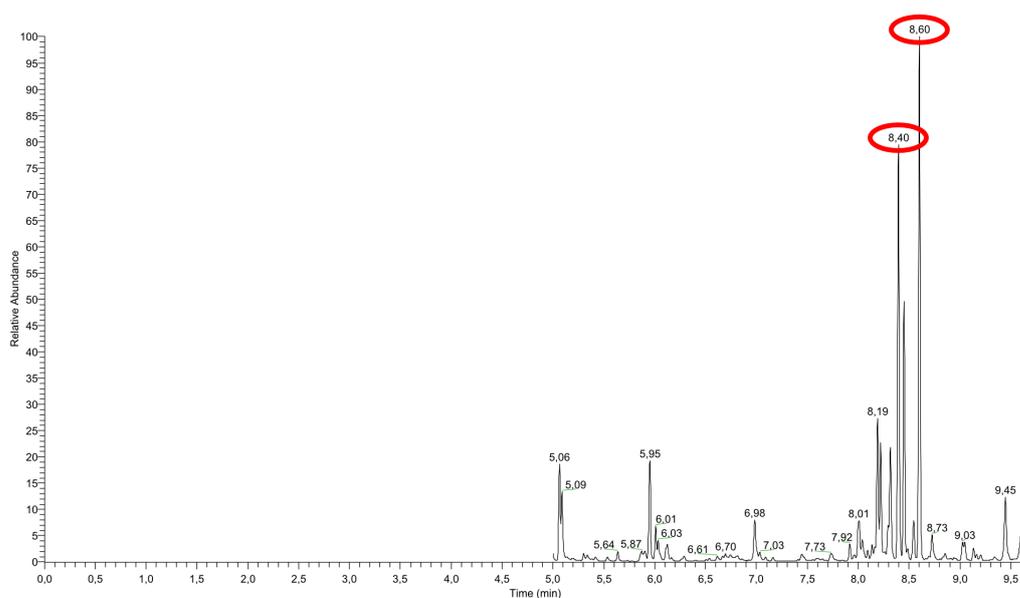


Abbildung 4.6: Verdünnungsreihe, 0.1  $\mu$ l  $\alpha$ -Bisabolol in 10 ml Harn

In den Abbildungen 4.10 und 4.11 sind die letzten Stufen der Verdünnungsreihe gezeigt. Durch weitere Erhöhung der Adsorptionszeit, könnte diese fortgesetzt werden.

Bei einer Verdünnung von 0.01 nl  $\alpha$ -Bisabolol in 10 ml Harn konnte das ätherische Öl mit den gewählten Einstellungen nachgewiesen werden. Diese Konzentration wurde für diese Diplomarbeit als ausreichend gering bewertet.

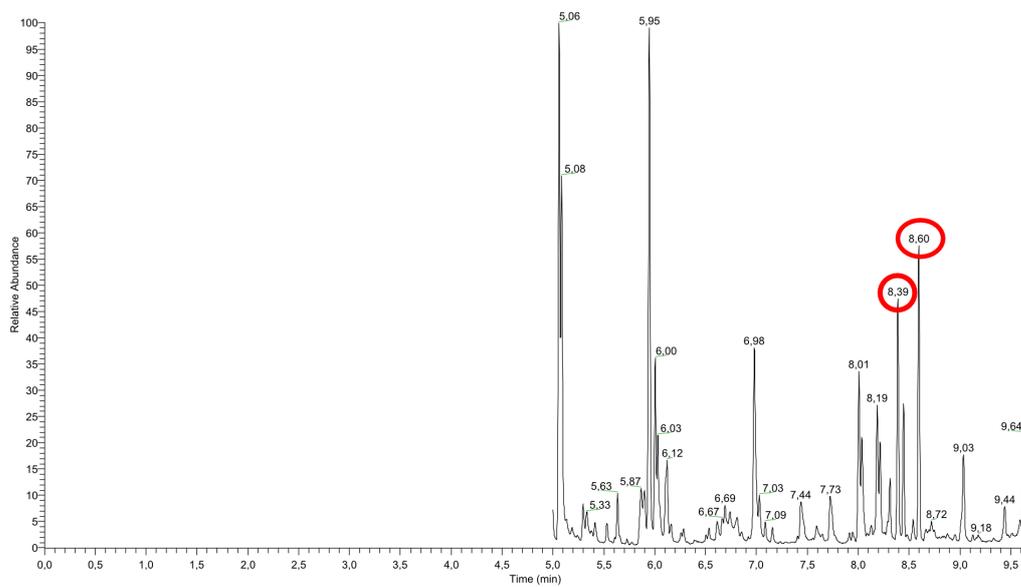


Abbildung 4.7: Verdünnungsreihe, 0.01 µl α-Bisabolol in 10 ml Harn

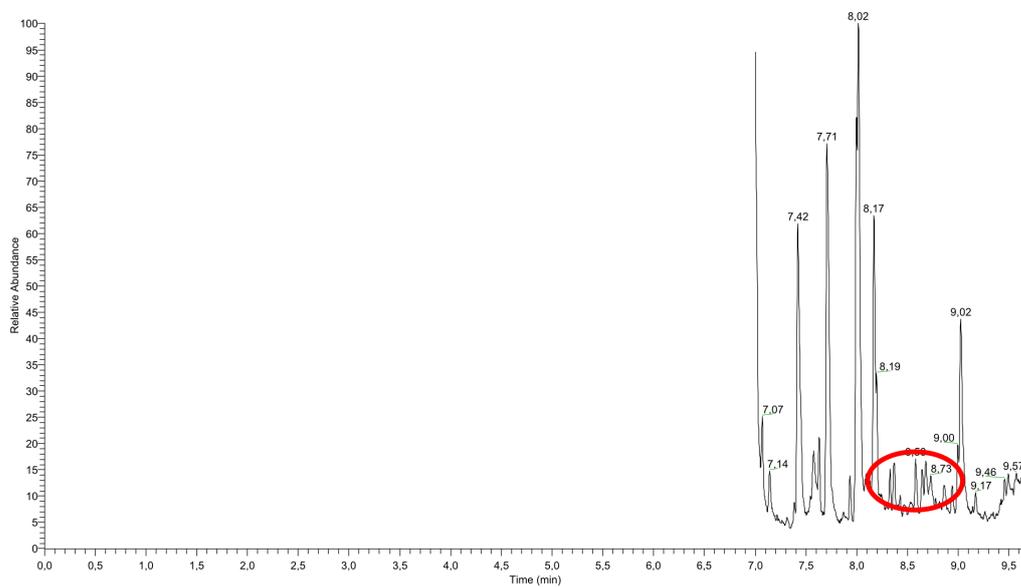


Abbildung 4.8: Verdünnungsreihe, 1 nl α-Bisabolol in 10 ml Harn, Aufnahmebeginn bei 7 min

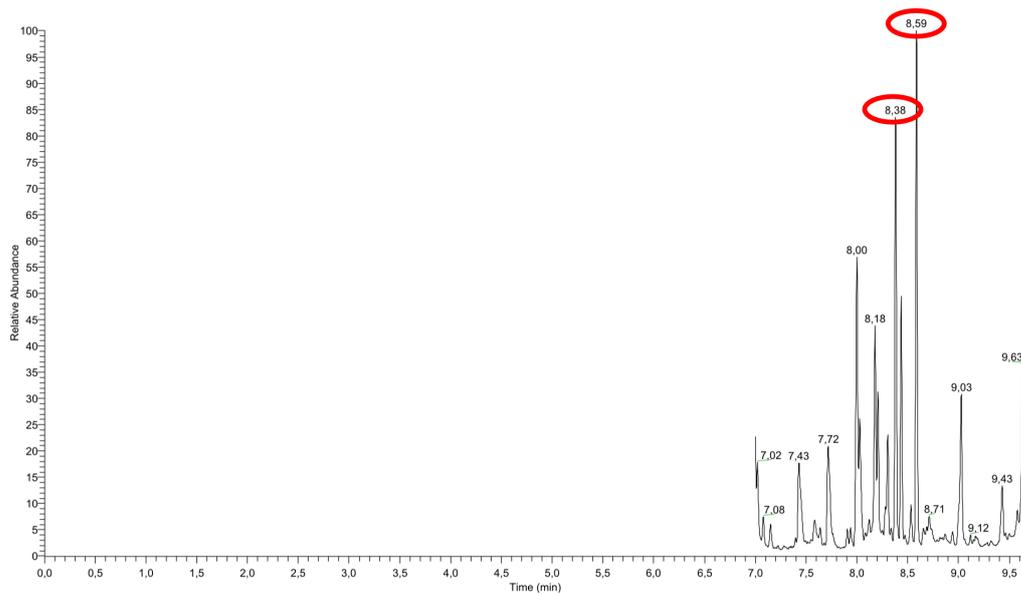


Abbildung 4.9: Verdünnungsreihe, 1 nl  $\alpha$ -Bisabolol in 10 ml Harn, Aufnahmebeginn bei 7 min und verlängerter Adsorptionszeit

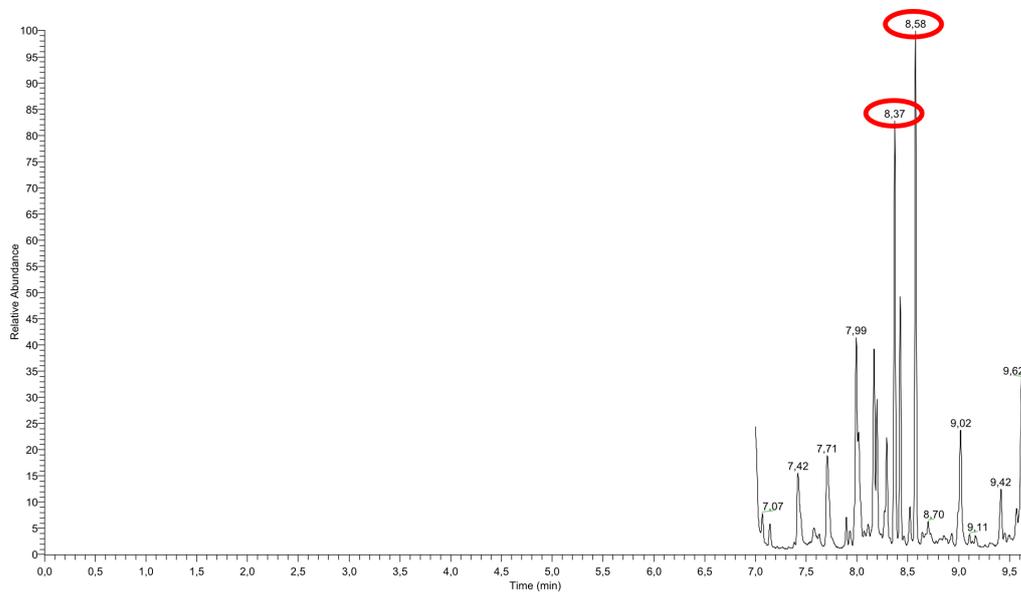


Abbildung 4.10: Verdünnungsreihe, 0.1 nl  $\alpha$ -Bisabolol in 1 ml Harn

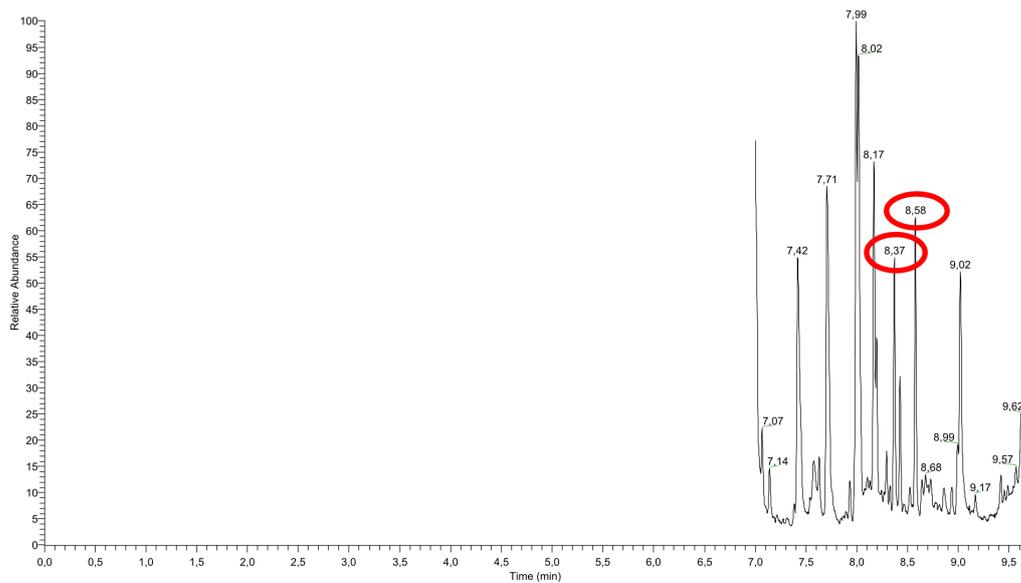


Abbildung 4.11: Verdünnungsreihe, 0.01 nl  $\alpha$ -Bisabolol in 10 ml Harn

Nach diesen Versuchen wurde das Probevolumen von 10 ml auf 1 ml verringert. Dabei wurden nur die letzten Stufen der Verdünnungsreihe erneut vermessen. Die Ergebnisse entsprachen den hier abgebildeten Graphen mit 10 ml Probevolumen und sind daher nicht abgebildet.

Grund dafür war, dass man zunächst eventuell gebildete Metabolite des  $\alpha$ -Bisabolols mit Glucuronidase spalten wollte. Bei einem Probevolumen von 10 ml würde ein sehr hoher Verbrauch des kostspieligen Enzyms entstehen. Daher wurde das Probevolumen im Vial auf 1 ml verringert.

### 4.1.3 Selbstversuch

Die Verdünnungsreihe zeigte, dass  $\alpha$ -Bisabolol in ausreichend geringer Konzentration nachgewiesen werden konnte. Daher führte man einen ersten Selbstversuch durch.

$\alpha$ -Bisabolol wurde als 10%ige Mischung mit Aloe vera Öl auf den Bauchbereich aufgetragen und einmassiert. Dieser wurde mit Frischhaltefolie umwickelt, um die Resorption zu verbessern.

Die Zeitpunkte der Harnproben sind in der Tabelle 3.2 angegeben.

Wie zu erwarten, traten in der Blindprobe keine Peaks mit hoher Intensität im Bereich der relevanten Retentionszeiten auf (roter Kreis in Abb. 4.12). Die vorhandenen Peaks mit geringer Höhe stammten vom Harn an sich. Dieser Umstand musste bei der Bewertung der folgenden Proben berücksichtigt werden.

Bei der Analyse mittels SPME-GC-MS der zweiten und besonders der dritten Probe des Selbstversuches (Abb. 4.14) zeigten sich Peaks mit passender Retentionszeit (in den Abbildungen mit roten Kreisen gekennzeichnet) und höherer Intensität als in der Blindprobe.

In der vierten Probe des Selbstversuches (Abb. 4.15) sind bei den relevanten Retentionszeiten Peaks mit nur geringer Intensität vorhanden. Bei den Proben SV5 bis SV7 sind die Gaschromatogramme mit jenem von SV4 vergleichbar. Daher wurden sie nicht abgebildet.

Bei diesen Aufnahmen (SV1 bis SV4) wurde wie in den meisten Fällen der SIM-Modus verwendet. Für eine genauere Analyse der Peaks wurde im Folgenden die Probe SV 3 mittels Fullscan erneut vermessen.

Um die gesuchten Peaks auch bei einem Fullscan leichter wieder zu finden, wurde die Aufnahme diesmal erst bei 8 min gestartet. Dabei zeigte das Massenspektrum, dass es sich bei den gefundenen Peaks nicht um  $\alpha$ -Bisabolol handelt (Abb. 4.16). Die Massen 109, 119 und 204 sind nicht deutlich erkennbar (grüne Pfeile in der Abbildung). Der Vergleich mit Bibliotheken bestätigte, dass es sich hierbei nicht um  $\alpha$ -Bisabolol handelte.

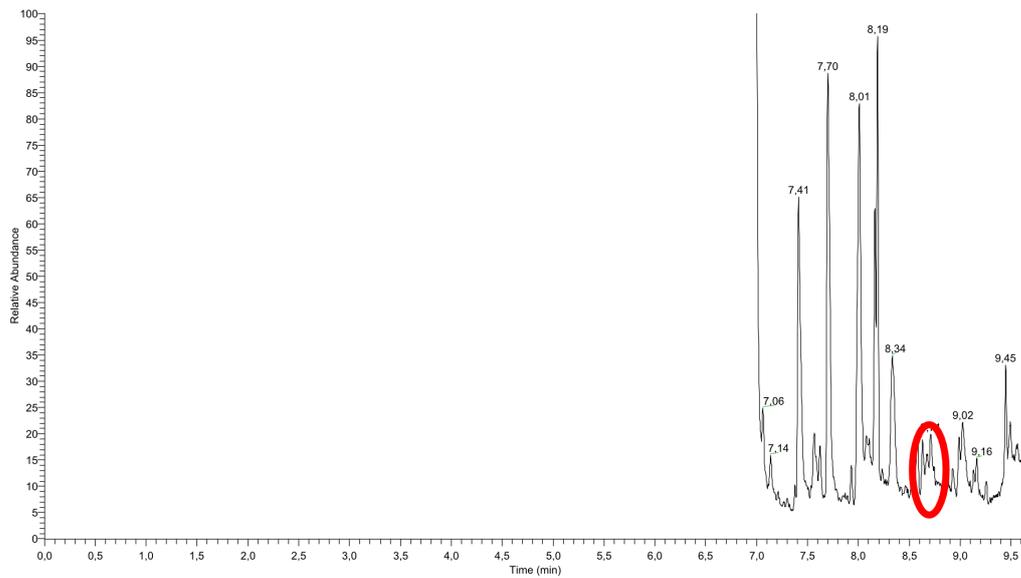


Abbildung 4.12: SV1 1. Harnprobe aus dem Selbstversuch vor der Massage mittels SPME, Blindprobe

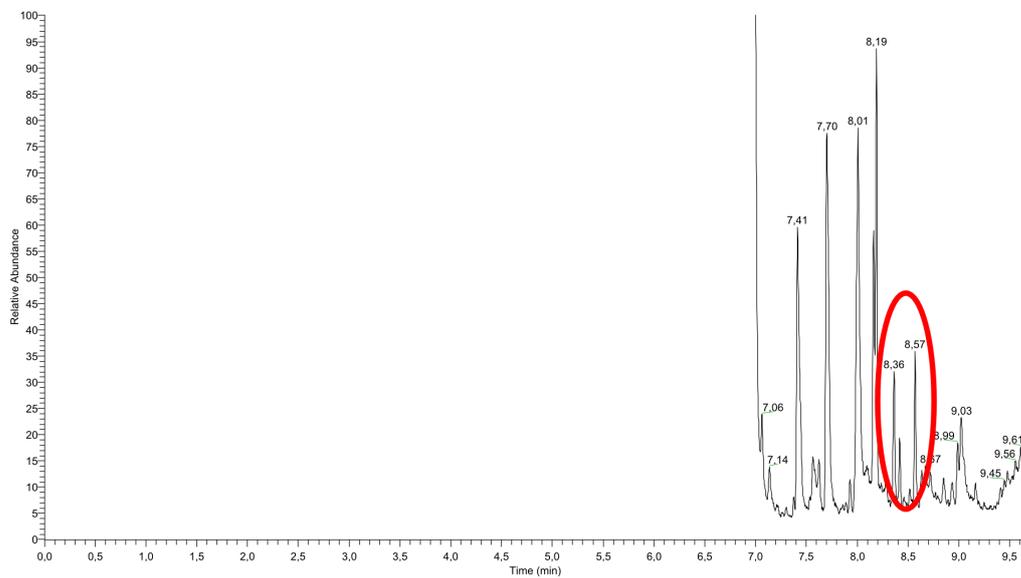


Abbildung 4.13: SV2 2. Harnprobe aus dem Selbstversuch mittels SPME

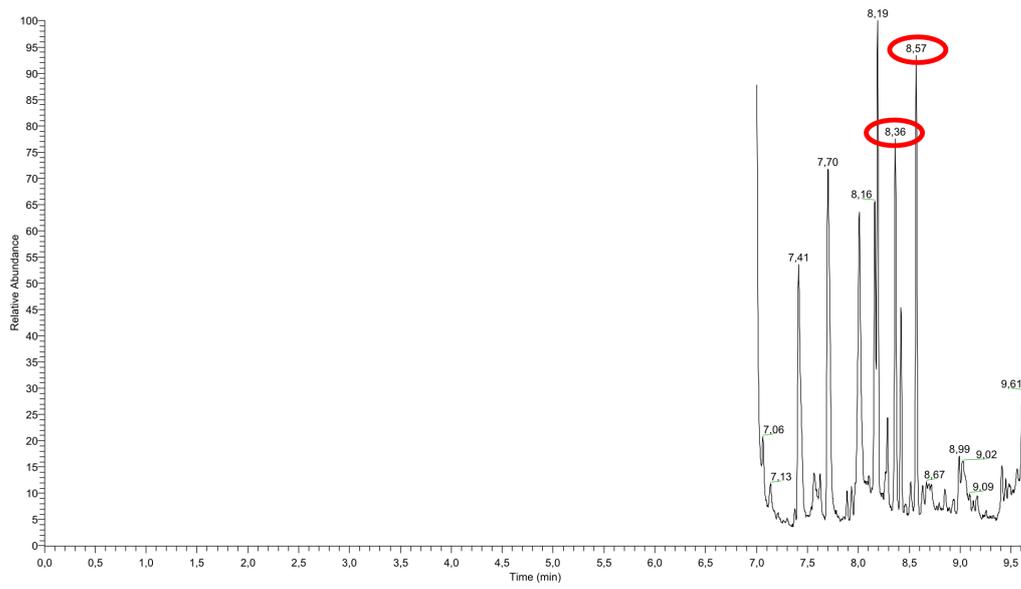


Abbildung 4.14: SV3 3. Harnprobe aus dem Selbstversuch mittels SPME

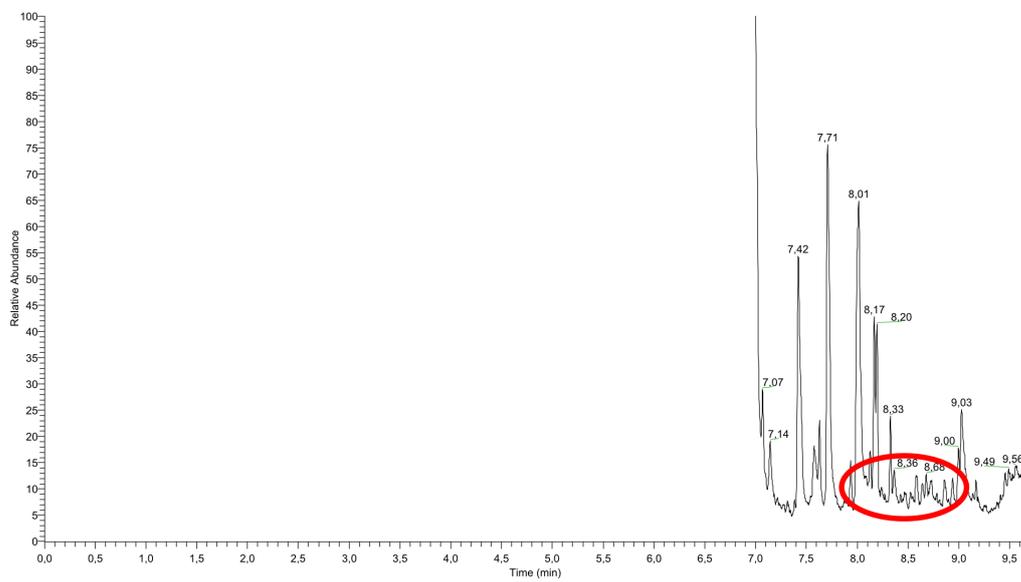


Abbildung 4.15: SV4 4. Harnprobe aus dem Selbstversuch mittels SPME

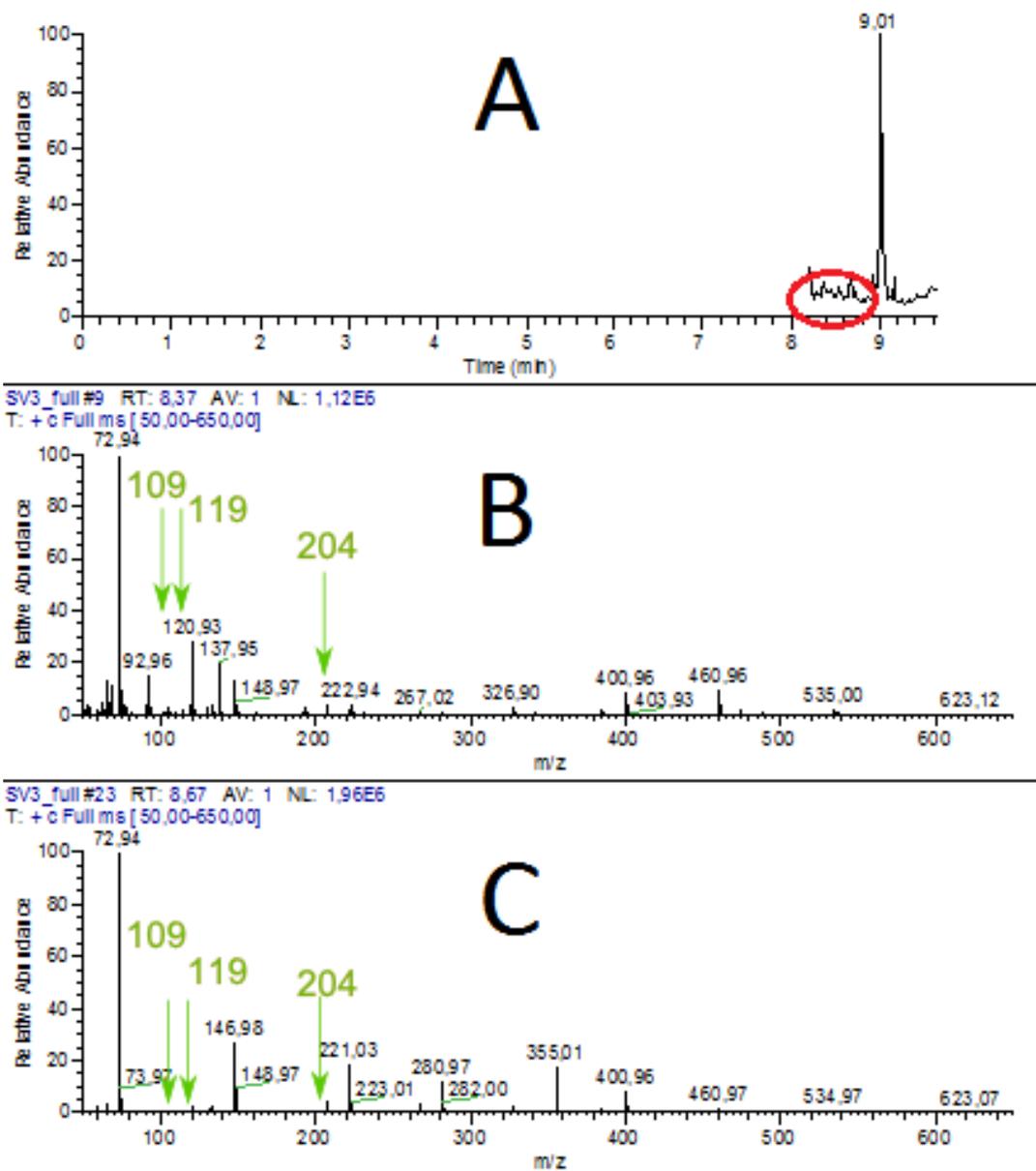


Abbildung 4.16: Fullscan von SV3 3. Harnprobe aus dem Selbstversuch mittels SPME  
 A: Gaschromatogramm, B: Massenspektrum des Peaks bei 8.4 min,  
 C: Massenspektrum des Peaks bei 8.6 min

#### 4.1.4 Peakspaltung

Bei der Analyse der Harnproben zeigte sich, dass die bereits erwähnte Peakspaltung von Nachteil war. Dies hatte mehrere Gründe.

Zum einen erschienen in den Spektren mit Harn ohnehin schon sehr viele Peaks. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein einzelner Peak durch Substanzen aus dem Harn überlagert werden würde, ist geringer. Daher war es sinnvoll, die gesuchte Substanz auf einen Peak ein zu schränken. Im Umkehrschluss war die Möglichkeit höher, dass einer der Peaks überlagert wird, wenn die gesuchte Substanz in mehrere Peaks aufgespalten wurde. So wie im Fall des Selbstversuches. Die Blindprobe zeigte Peaks von geringer Intensität bei den relevanten Retentionszeiten. In diesem spezifischen Fall wurde die Auswertung nicht weiter davon beeinträchtigt.

Zum anderen entspricht die Intensität eines Peaks der Konzentration der Substanz in der Probe. Bei einer Peakspaltung wird die Intensität auf mehrere Peaks aufgeteilt. Dadurch sind sie im Gaschromatogramm schwerer zu erkennen, da sie nun kleiner sind.

In den vorangegangenen Massenspektren von  $\alpha$ -Bisabolol zeigten sich die gesuchten Peaks bei den Massen 109, 119 und 204 auch nur mit sehr schwacher Intensität.

Als Erstes wurde untersucht, ob die Peakspaltung von der Ausgangssubstanz verursacht wurde. Der Reinheitsgrad des  $\alpha$ -Bisabolol erschien als mögliche Ursache der Peakspaltung. Aus diesem Grund wurde von nun an 100%iges  $\alpha$ -Bisabolol verwendet, von dem ein Analysenzertifikat vorlag (Abb. 3.1).

Die Peakspaltung wurde dadurch jedoch nicht behoben (Abb.4.17). Im Gaschromatogramm waren wieder beide Peaks bei Minute 8.4 und 8.6 sichtbar. Im Massenspektrum erkannte man die gleiche Aufspaltung wie bei dem bisher verwendeten  $\alpha$ -Bisabolol mit 95% (Abb. 4.1).

Der nächste Schritt bestand darin, die SPME-Nadel zu erneuern.

Des Weiteren wurde versucht, die Peakspaltung zu beheben indem die Säule über Nacht ausgeheizt wurde. Dadurch sollten eventuelle Verunreinigungen und mögliche Rückstände der vorangegangenen Messungen beseitigt werden.

Diese Methoden zeigten jedoch nicht den gewünschten Erfolg.

Da das Ausheizen der Säule nicht ausreichte, wurde sie vollständig erneuert. Dadurch wurde die geforderte Reinheit der Säule erreicht (Abb. 4.18).

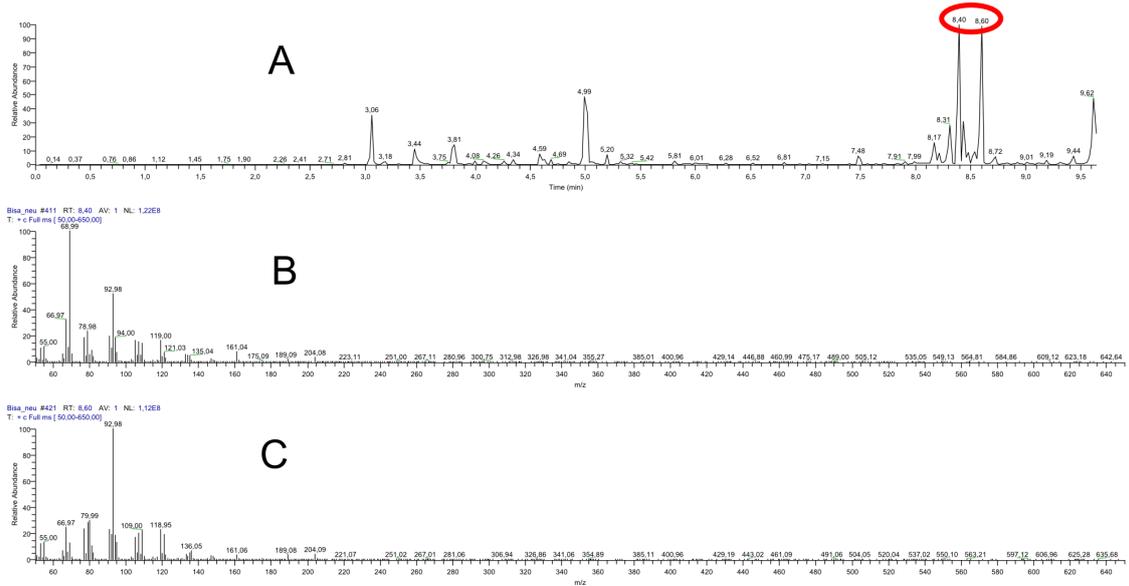


Abbildung 4.17:  $\alpha$ -Bisabolol 100% mittels SPME  
 A: Gaschromatogramm, B: Massenspektrum des Peaks bei 8.4 min,  
 C: Massenspektrum des Peaks bei 8.6 min

Alle Parameter der vorangegangenen Untersuchungen wurden für die Messung mit der neuen Säule beibehalten. Die genauen Daten zu den Säulen sind im Kapitel Geräte 3.2 aufgelistet.

Aufgrund des Längenunterschiedes, nur mehr 30 m statt den ursprünglichen 60 m, verschob sich die Retentionszeit des  $\alpha$ -Bisabolols auf 6.8 min (Abb. 4.18).

Im Massenspektrum waren nun die Peaks, die für die SIM-Methode ausgewählt wurden, klar ersichtlich (rote Kreise in der Abbildung). Auch die Intensität der Peaks war vergleichbar mit denen des Analysenzertifikates (Abb. 3.1).

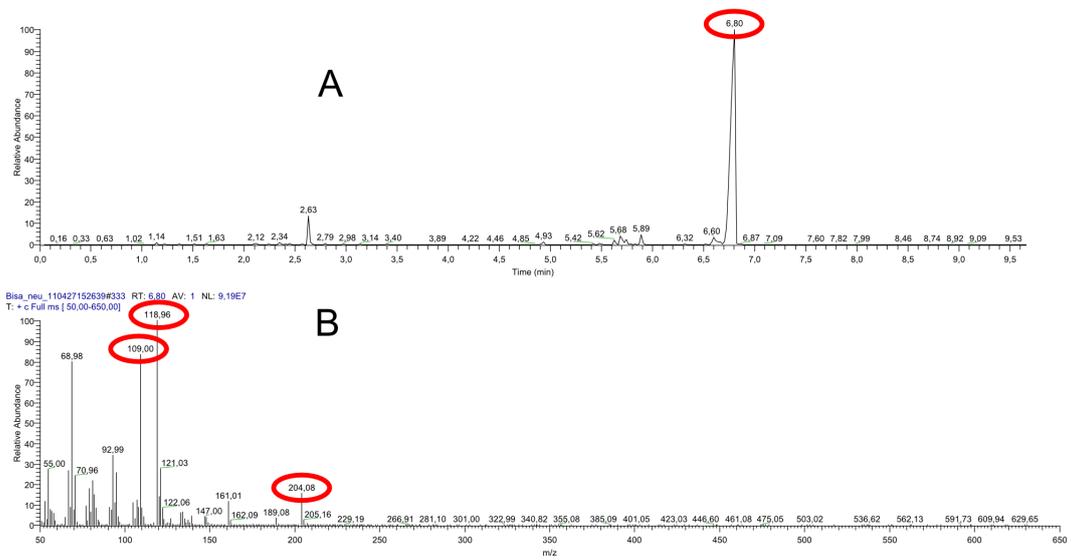


Abbildung 4.18:  $\alpha$ -Bisabolol 100% mit neuer Säule  
 A: Gaschromatogramm, B: Massenspektrum des Peaks bei 6.8 min

#### 4.1.5 Analyse der Harnproben der Probanden mittels SPME

Da  $\alpha$ -Bisabolol nun als einziger Peak gemessen werden konnte, wurden die Proben der Probanden vermessen. Die zeitlichen Abstände der Probennahme sind in Tabelle 3.3 angeführt.

In der ersten Probe (Abb. 4.19) war  $\alpha$ -Bisabolol nicht enthalten, da es sich um eine Blindprobe direkt vor der Behandlung mit Acthyderm zur Mesoporation handelt.

In den darauf folgenden Proben war kein Peak mit passender Retentionszeit für  $\alpha$ -Bisabolol zu finden. Dieser Bereich ist in den Abbildungen mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.

Das heißt, mit dem gewählten Versuchsaufbau war  $\alpha$ -Bisabolol nicht nachweisbar. Dies kann an der gewählten Methode liegen, oder es war in den analysierten Proben nicht enthalten.

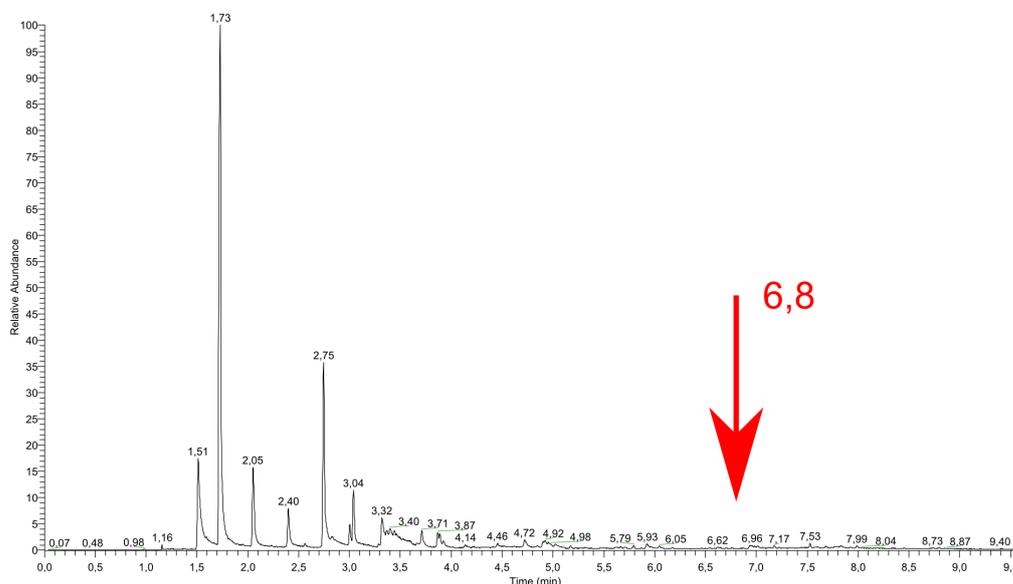


Abbildung 4.19: Proband 1, Probe 1 mittels SPME, Blindprobe

Die Vermessung der restlichen Proben (4, 6 und 7) und die der anderen Versuchspersonen ergaben vergleichbare Spektren und wurden daher nicht abgebildet.

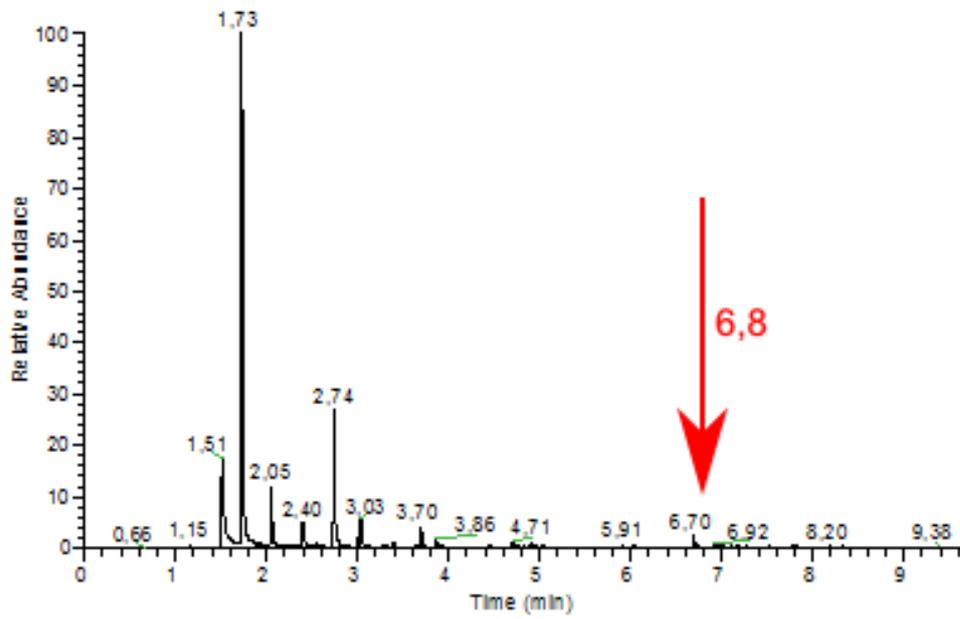


Abbildung 4.20: Proband 1, Probe 2 mittels SPME

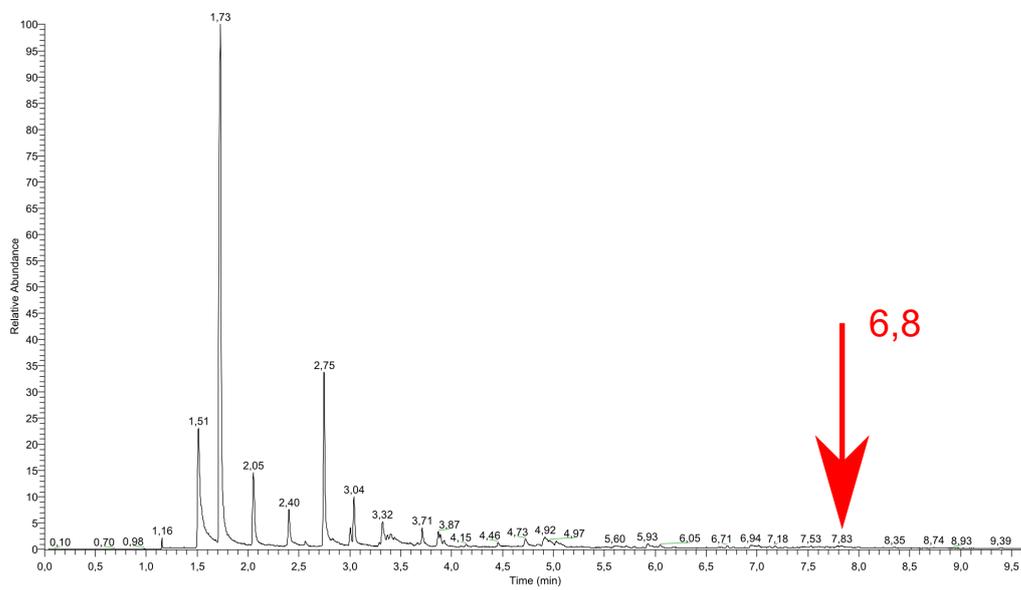


Abbildung 4.21: Proband 1, Probe 3 mittels SPME

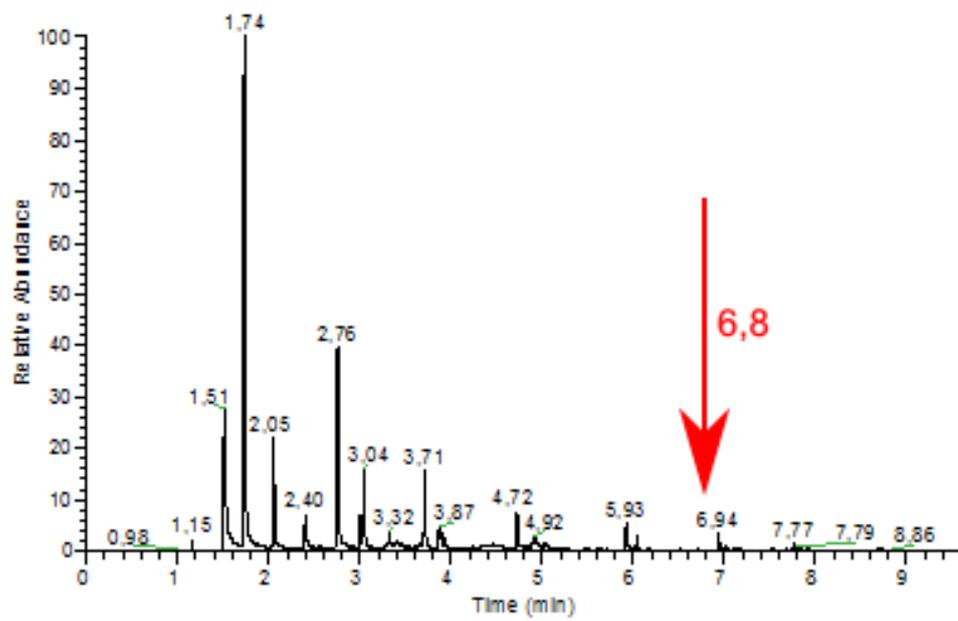


Abbildung 4.22: Proband 1, Probe 5 mittels SPME

## 4.2 HS-Analysen

### 4.2.1 HS-Methode 1

Die SPME-Analysen führten nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Daher mussten auch noch andere Untersuchungsmethoden in Betracht gezogen werden.

Im Department für Klinische Pharmazie und Diagnostik an der Universität Wien, Studiengang Pharmazie, dienten bereits einige andere ätherische Öle für Diplomarbeiten und wissenschaftliche Untersuchungen als Studienobjekt. Die Suche nach anderen Möglichkeiten um  $\alpha$ -Bisabolol aus dem Urin nachzuweisen, beschränkte sich daher auf bereits bekannte Methoden. Diese wurden in der Abteilung schon getestet, hatten sich aber nicht auf das hier gesuchte Sesquiterpen spezialisiert. Der Fokus lag auf Monoterpenen. [26] [27]

Zu Beginn wurde wiederum ein Tropfen reines  $\alpha$ -Bisabolol vermessen. Die Retentionszeit betrug 11.83 min (roter Kreis in Abb. 4.23).

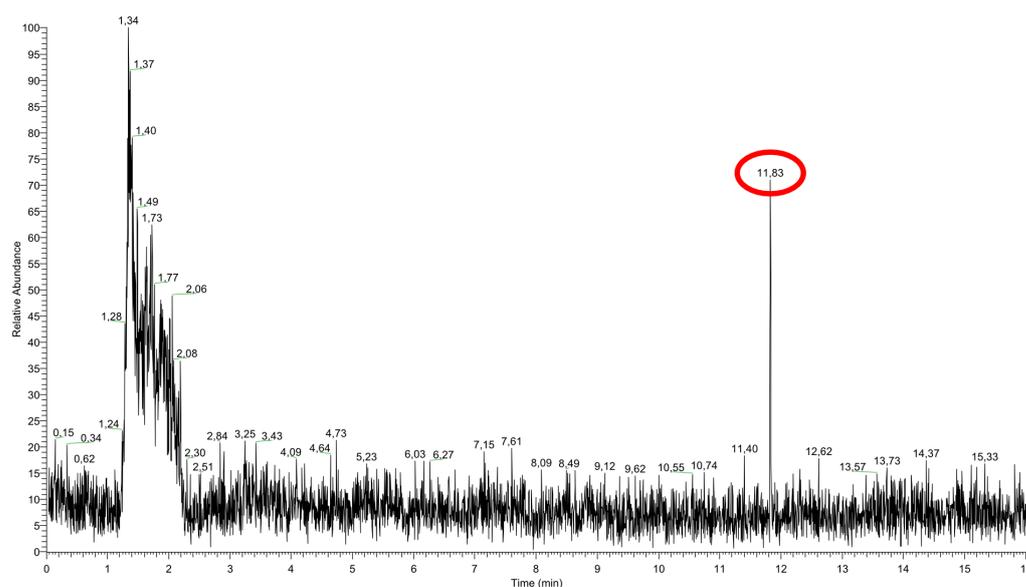


Abbildung 4.23:  $\alpha$ -Bisabolol mittels Headspace-Methode 1

Da nun die Retentionszeit des  $\alpha$ -Bisabolols bekannt war, wurden auch die Harnproben der Probanden untersucht.

In den Chromatogrammen waren kleine Peaks mit passender Retentionszeit (in den

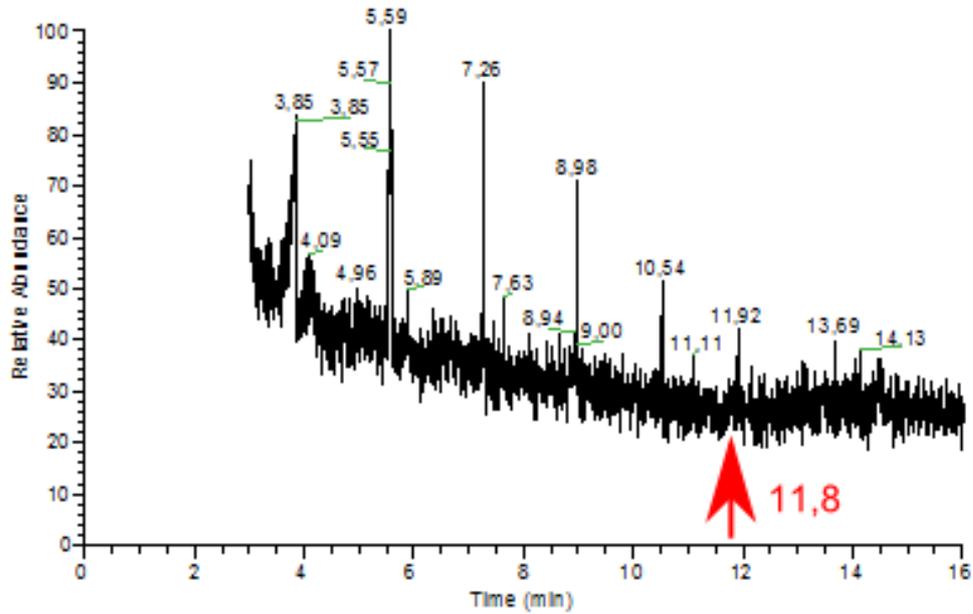


Abbildung 4.24: Proband 2, Probe 1 mittels Headspace-Methode 1, Blindprobe

Abbildungen mit roten Pfeilen gekennzeichnet). Diese stammten jedoch vom Grundrauschen.

Die Untersuchung der anderen Proben ergaben vergleichbare Spektren, wie die hier abgebildeten und sind daher nicht angeführt.

Mit der durchgeführten Testreihe (Abb. 4.24 bis Abb. 4.28) war  $\alpha$ -Bisabolol nicht nachweisbar. Es ist unklar, ob die Ursache am Fehlen des ätherischen Öls oder an den Geräteeinstellungen lag.

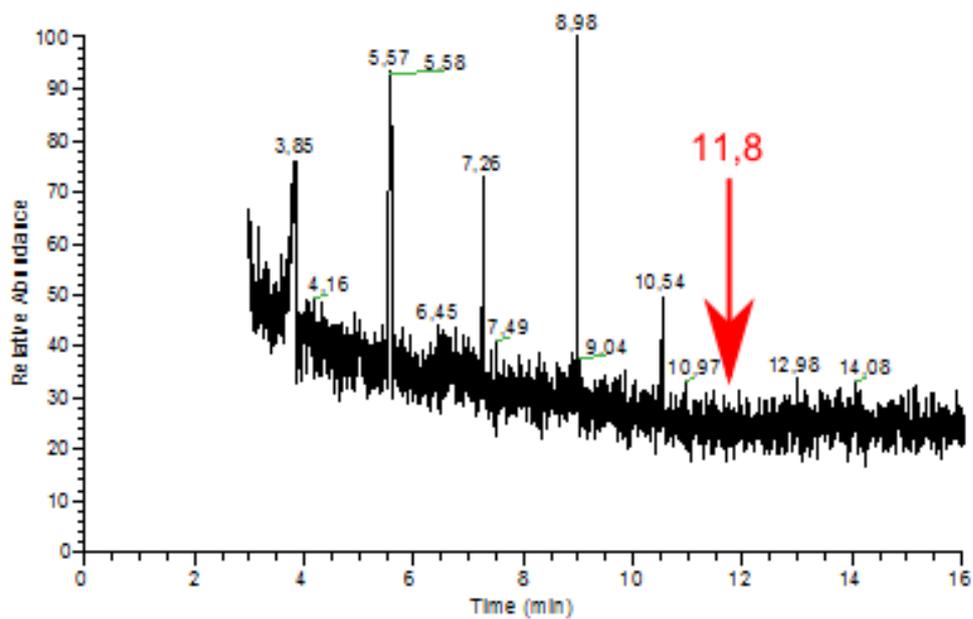


Abbildung 4.25: Proband 2, Probe 2 mittels Headspace-Methode 1

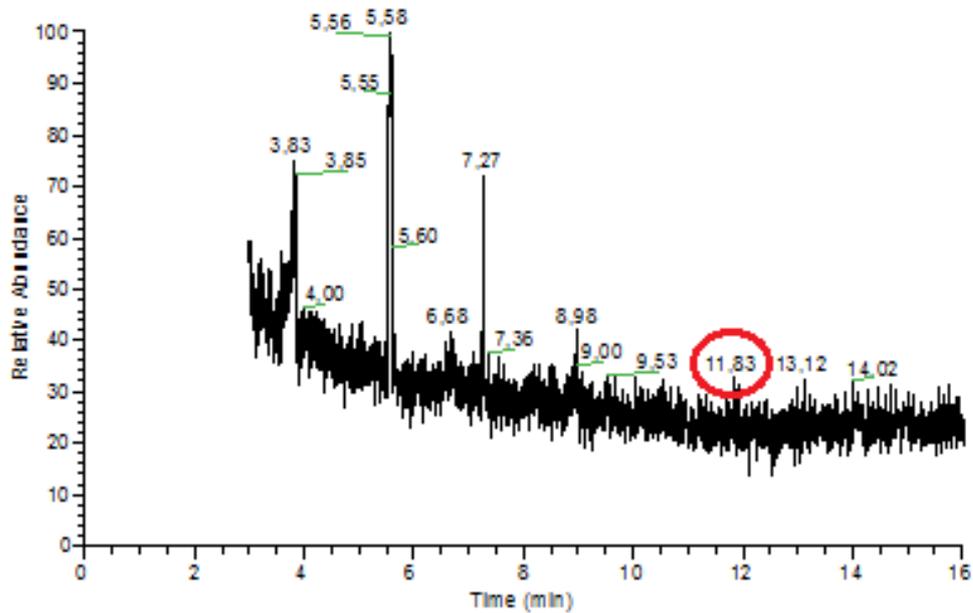


Abbildung 4.26: Proband 2, Probe 3 mittels Headspace-Methode 1

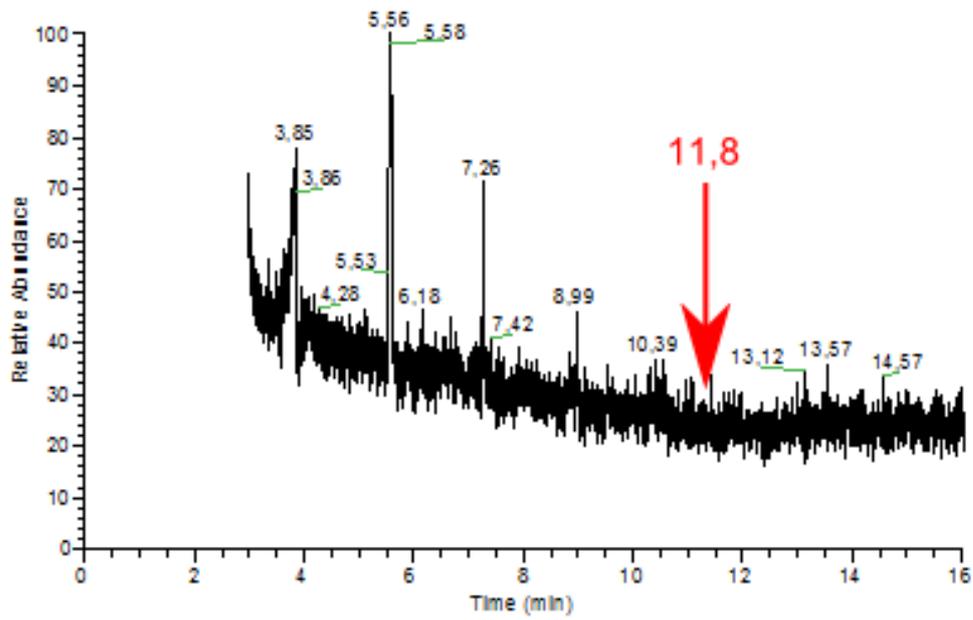


Abbildung 4.27: Proband 2, Probe 4 mittels Headspace-Methode 1

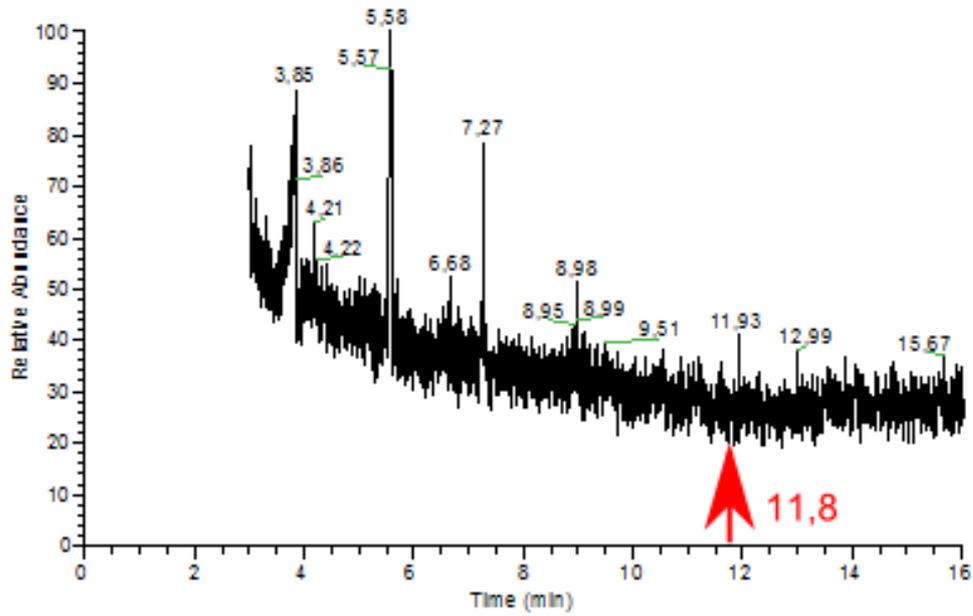


Abbildung 4.28: Proband 2, Probe 5 mittels Headspace-Methode 1

## 4.2.2 Amidosulfonsäure

$\alpha$ -Bisabolol wird im Körper möglicherweise metabolisiert. Solche Konjugate können mit Säure gespalten werden. Amidosulfonsäure liegt bei Raumtemperatur als Festsubstanz vor, daher beeinträchtigt sie den Dampfraum über der flüssigen Harnprobe nicht.

Diese Überlegung war die Grundlage für die nächste Versuchsreihe. Jede Probe wurde mit einer Spatelspitze Amidosulfonsäure versetzt und erneut mit den Einstellungen der 1. Headspace-Methode vermessen. Auf eine genaue Bestimmung der zugesetzten Menge wurde verzichtet, da bei der vorgegebenen Aufgabenstellung nicht quantitativ gearbeitet wurde.

Die meisten Spektren zeigten keine Unterschiede zu den vorherigen Untersuchungen ohne Zusatz von Säure.

Die dritte Probe aus dem Selbstversuch (Abb. 4.29) wies einen kleinen Peak mit passender Retentionszeit auf. Dieser hatte eine etwas höhere Intensität als das Grundrauschen (roter Pfeil in der Abbildung). Im Massenspektrum war jedoch ersichtlich, dass es sich hierbei nicht um  $\alpha$ -Bisabolol handelte. Peaks bei den Massen 109 und 119 waren nicht vorhanden (grüne Pfeile in der Abbildung). Bei einigen anderen Chromatogrammen war dies ebenso der Fall.

Da diese Testreihe zu keinen weiteren Erkenntnissen führte, wurden die anderen Chromatogramme nicht abgebildet.

Der Zusatz von Amidosulfonsäure führte nicht zum Nachweis von  $\alpha$ -Bisabolol. Die Ursache dafür blieb weiterhin unklar.

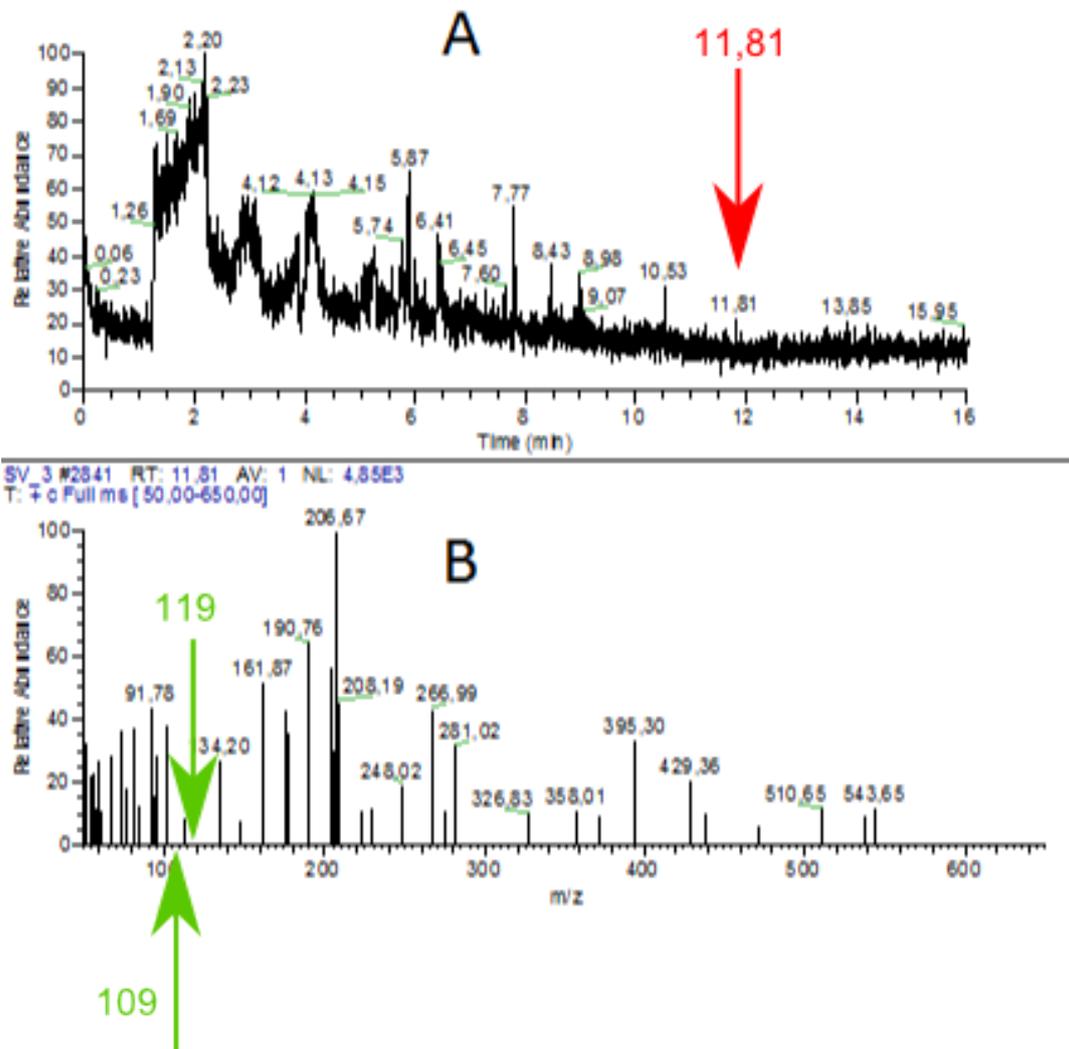


Abbildung 4.29: SV3 3. Harnprobe aus dem Selbstversuch nach Zusatz von Amidosulfonsäure  
A: Gaschromatogramm, B: Massenspektrum des Peaks bei 11.8 min

### 4.2.3 HS-Methode 2

Die bisher verwendeten Methoden zeigten nicht den gewünschten Erfolg. Daher wurde mit einer weiteren HS-Methode fortgesetzt.

Um die Retentionszeit des  $\alpha$ -Bisabolols mit dieser Methode zu bestimmen wurde wiederum ein Tropfen reines ätherisches Öl vermessen. Daraus ergab sich eine Retentionszeit von 7.03 min (Abb. 4.30).

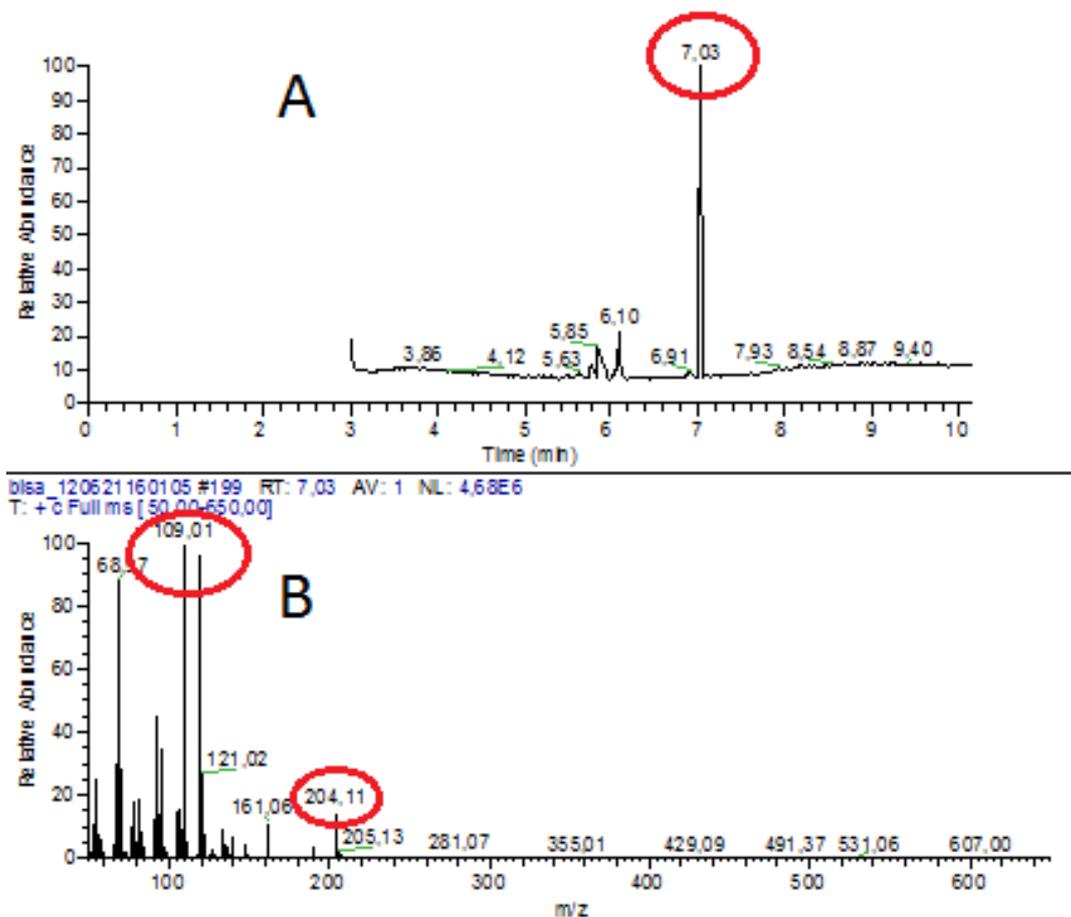


Abbildung 4.30:  $\alpha$ -Bisabolol mittels Headspace-Methode 2  
A: Gaschromatogramm, B: Massenspektrum des Peaks bei 7.03 min

Für die Analyse der Proben wurden 4 ml Harn mit einer Spatelspitze Amidosulfonsäure versetzt. Wenn Glucuronide oder andere Konjugate des  $\alpha$ -Bisabolols vorlagen, sollten diese nun gespalten werden. Waren diese nicht in der Probe enthalten, hätte die Säure keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Messung wie in Kapitel 4.2.2 festgestellt wurde.

Um die relative Intensität der Peaks zu erhöhen, wurde der Startpunkt der Messungen auf 6 min festgelegt.

Bei den Analysen zeigte sich, dass auch die Blindproben vor dem Auftragen der  $\alpha$ -Bisabolol-Mischung mit Aloe vera Öl einen Peak mit der Retentionszeit von 7.0 min aufwiesen. Als Beispiel ist hier Abb. 4.31 dargestellt.

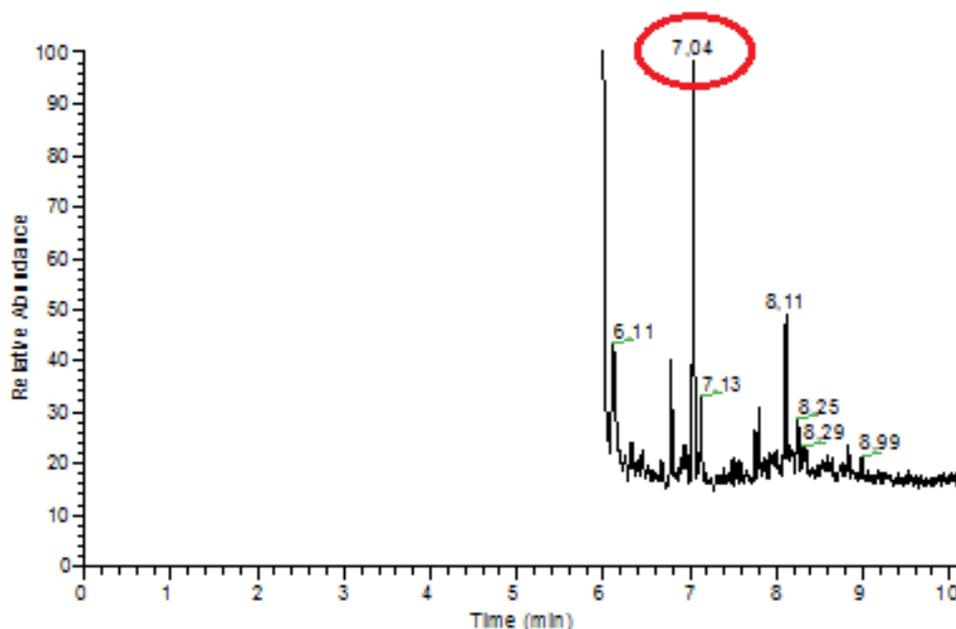


Abbildung 4.31: SV1 1. Harnprobe aus dem Selbstversuch vor der Massage mittels Headspace-Methode 2, Blindprobe

Alle anderen Proben wiesen diesen Peak ausnahmslos ebenfalls auf. Dabei ist zu beachten, dass alle Messungen im SIM-Modus durchgeführt wurden.

Da die Blindproben ebenso wie die Harnproben nach dem Selbstversuch und die Urinproben nach der Mesoporation mit Acthyderm einen Peak bei 7.0 min aufweisen konnten keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielt werden. Aus diesem Grund musste das Pilotprojekt an dieser Stelle abgebrochen werden.

Bei einem Vergleich zwischen Fullscan-Modus und SIM-Modus wurde ein weiterer Peak detektiert. Diese Fullscan-Aufnahme diente zunächst nur zu Vergleichszwecken zwischen Fullscan und SIM-Modus (Abb. 4.32 und Abb. 4.33).

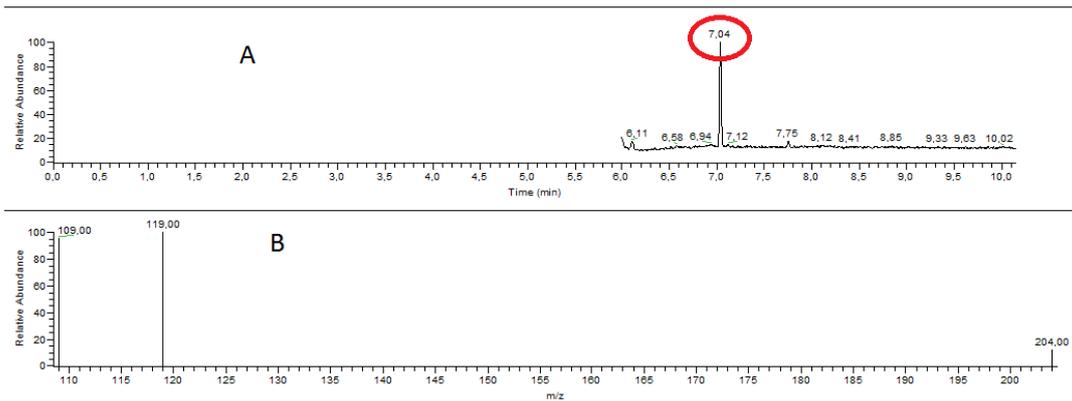


Abbildung 4.32: Proband 1, Probe 3 mittels Headspace-Methode 2, SIM-Modus  
A: Gaschromatogramm, B: Massenspektrum des Peaks bei 7.04 min

Im Massenspektrum der Abbildung 4.33 zeigten sich typische Peaks des  $\alpha$ -Bisabolols (109, 119, 204, in der Abbildung mittels rotem Kreis und rotem Pfeil gekennzeichnet). Der Peak mit der Masse 207 stammte wahrscheinlich von der Säule („typischer Gerätepeak“).

Die Verteilung der Peaks im Massenspektrum wies auf  $\alpha$ -Bisabolol hin. Beim Vergleich mit Bibliotheken von Massenspektren erschien es möglich, dass es sich bei diesem speziellen Peak um  $\alpha$ -Bisabolol handelte. Mit den verfügbaren Bibliotheken konnte das vorhandene Massenspektrum aber nicht eindeutig zu  $\alpha$ -Bisabolol zugeordnet werden.

Weitere Untersuchungen diesbezüglich stehen noch aus.

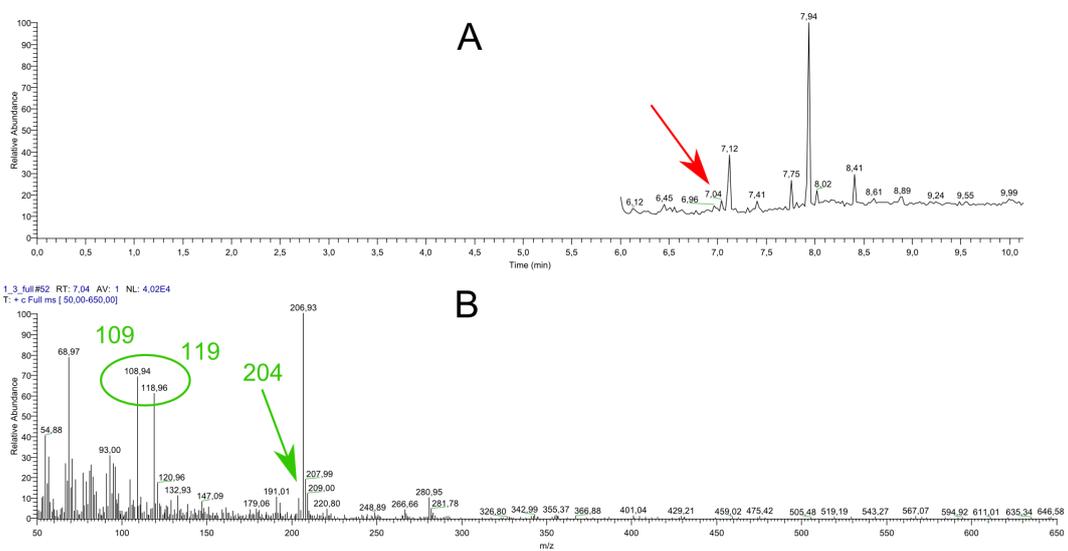


Abbildung 4.33: Proband 1, Probe 3 mittels Headspace-Methode 2, Fullscan-Modus  
A: Gaschromatogramm, B: Massenspektrum des Peaks bei 7.04 min

## 5 Diskussion

Zunächst konnte  $\alpha$ -Bisabolol mittels SPME-GC-MS-Analyse bis zu einer Konzentration von  $9.3 \cdot 10^{-10}$  g/l nachgewiesen werden.

Levomenol wurde mit zwei verschiedenen Methoden auf den Bauchberich der Probanden aufgetragen. In den anschließend genommenen Harnproben konnte  $\alpha$ -Bisabolol mittels SPME-GC-MS nicht belegt werden.

Bisher ist aber nichts über die Metabolisierung von  $\alpha$ -Bisabolol im menschlichen Organismus bekannt.

Da die Analyse mittels SPME-GC-MS nicht erfolgreich war, mussten auch andere Methoden in Betracht gezogen werden. Es wurden Headspace-Untersuchungen ausgewählt, die im Department bereits erfolgreich durchgeführt worden waren.

Bei der ersten Headspace-Methode führte auch der Zusatz von Amidosulfonsäure nicht zum gewünschten Erfolg.

Eine erneute Headspace-Analyse mit anderen Einstellungen zeigte auch in den Blindproben einen Peak mit der Retentionszeit des  $\alpha$ -Bisabolols. Bei einem Vergleich zwischen SIM-Modus und Fullscan wurde ein Peak gefunden, dessen Massenspektrum dem des  $\alpha$ -Bisabolols so sehr ähnelt, dass weitere Untersuchungen zu neuen Erkenntnissen führen.

Für neue Analysen wäre es von Nutzen mehr über den Metabolismus von  $\alpha$ -Bisabolol im menschlichen Körper zu wissen. Genaue Untersuchungen dazu stehen aber zum jetzigen Zeitpunkt noch aus.

Um  $\alpha$ -Bisabolol zweifelsfrei nachweisen zu können, sind weitere Untersuchungen mit der zuletzt durchgeführten Methode nötig. Eine Kombination mit SPME könnte ein weiterer Ansatz sein.

Levomenol besitzt nur geringe Toxizität. Diese ist in vielen Tierstudien belegt. Auch viele medizinisch interessante Wirkungen des  $\alpha$ -Bisabolols wurden nachgewiesen. Die

Wirkstärke ist teilweise mit therapeutisch verwendeten Wirkstoffen vergleichbar. So ist zum Beispiel die muskulotrop spasmolytische Wirkung gleich stark wie Papaverin.

Abschließend kann gesagt werden, dass dieses Pilotprojekt als Grundlage für weitere Untersuchungen des ätherischen Öls im menschlichen Körper herangezogen werden kann. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es möglich sein sollte,  $\alpha$ -Bisabolol im Harn nachzuweisen.

## 6 Zusammenfassung

Ziel dieser Diplomarbeit war es, (-)- $\alpha$ -Bisabolol im menschlichen Urin nach Massage auf den unteren Bauchbereich nachzuweisen.

Eine Verdünnungsreihe wurde mittels SPME-GC-MS-Analyse vermessen.

$\alpha$ -Bisabolol erwies sich bei der Inkubation als genügend stabil für dieses Pilotprojekt.

Zum Auftragen von  $\alpha$ -Bisabolol kamen zwei verschiedene Massagemethoden zur Anwendung. Als Trägersubstanz diente jeweils Aloe vera Öl.

Bei einem Selbstversuch wurde ein Peak mit der Retentionszeit des  $\alpha$ -Bisabolols gefunden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass es sich dabei aber nicht um das gesuchte Substanz handelte.

Eine 10%ige Mischung von  $\alpha$ -Bisabolol in Aloe vera Öl wurde durch Mesoporation mittels dem Gerät Acthyderm bei Versuchspersonen aufgetragen. Bei der Analyse der Urinproben der Probanden konnte  $\alpha$ -Bisabolol nicht nachgewiesen werden.

Die Urinproben wurden mit zwei unterschiedlichen HS-Methoden analysiert. Zur Spaltung von Konjugaten wurde Amidosulfonsäure zugesetzt.

Bei der zweiten HS-Methode wurden in allen untersuchten Proben Peaks zur Retentionszeit des  $\alpha$ -Bisabolols gefunden. Diese Messungen wurden alle im SIM-Modus durchgeführt. Bei einem Vergleich zwischen SIM-Modus und Fullscan zeigte sich ein Peak, dessen Massenspektrum mit dem des  $\alpha$ -Bisabolols vergleichbar aber nicht ident ist.

# Tabellenverzeichnis

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 2.1 | Verwendung von Bisabolol in kosmetischen Produkten, Quelle: Final Report on the Safety Assessment of Bisabolol[10] . . . . . | 23 |
| 3.1 | Konzentrationen der Verdünnungsreihe . . . . .   | 31 |
| 3.2 | Zeitpunkte der Probennahme des Selbstversuches . . . . .   | 37 |
| 3.3 | Harnproben der Probanden . . . . .   | 38 |

# Abbildungsverzeichnis

|      |  |    |
|------|--|----|
| 2.1  | Strukturformel von (-)-alpha-Bisabolol . . . . .   | 13 |
| 2.2  | Metabolite von $\alpha$ -Bisabolol in <i>Matricaria recutita</i> . . . . .   | 14 |
| 2.3  | Stereoisomere des $\alpha$ -Bisabolols . . . . .   | 15 |
| 2.4  | Acthyderm . . . . .  | 26 |
| 3.1  | Analysenzertifikat des $\alpha$ -Bisabolols (Kurt Kitzing) . . . . .   | 28 |
| 3.2  | Strukturformel von cis-Nerolidol . . . . .   | 32 |
| 3.3  | Strukturformel von (-)-Linalool . . . . .  | 35 |
| 4.1  | $\alpha$ -Bisabolol 95% mittels SPME . . . . .   | 40 |
| 4.2  | Harnprobe mittels SPME . . . . .   | 41 |
| 4.3  | Aloe vera Öl mittels SPME . . . . .  | 42 |
| 4.4  | 0.1 $\mu$ l $\alpha$ -Bisabolol in 10 ml Harn vor der Inkubation . . . . .   | 44 |
| 4.5  | 0.1 $\mu$ l $\alpha$ -Bisabolol 10 ml in Harn nach der Inkubation . . . . .  | 44 |
| 4.6  | Verdünnungsreihe, 0.1 $\mu$ l $\alpha$ -Bisabolol in 10 ml Harn . . . . .  | 45 |
| 4.7  | Verdünnungsreihe, 0.01 $\mu$ l $\alpha$ -Bisabolol in 10 ml Harn . . . . .   | 46 |
| 4.8  | Verdünnungsreihe, 1 nl $\alpha$ -Bisabolol in 10 ml Harn, Aufnahmebeginn bei<br>7 min . . . . .                                  | 46 |
| 4.9  | Verdünnungsreihe, 1 nl $\alpha$ -Bisabolol in 10 ml Harn, Aufnahmebeginn bei<br>7 min und verlängerter Adsorptionszeit . . . . . | 47 |
| 4.10 | Verdünnungsreihe, 0.1 nl $\alpha$ -Bisabolol in 1 ml Harn . . . . .  | 47 |
| 4.11 | Verdünnungsreihe, 0.01 nl $\alpha$ -Bisabolol in 10 ml Harn . . . . .  | 48 |
| 4.12 | SV1 1. Harnprobe aus dem Selbstversuch vor der Massage mittels SPME,<br>Blindprobe . . . . .                                     | 50 |
| 4.13 | SV2 2. Harnprobe aus dem Selbstversuch mittels SPME . . . . .  | 50 |
| 4.14 | SV3 3. Harnprobe aus dem Selbstversuch mittels SPME . . . . .  | 51 |
| 4.15 | SV4 4. Harnprobe aus dem Selbstversuch mittels SPME . . . . .  | 51 |
| 4.16 | Fullscan von SV3 3. Harnprobe aus dem Selbstversuch mittels SPME . . . . .   | 52 |
| 4.17 | $\alpha$ -Bisabolol 100% mittels SPME . . . . .  | 54 |

|   |    |
|---|----|
| 4.18 $\alpha$ -Bisabolol 100% mit neuer Säule . . . . .   | 55 |
| 4.19 Proband 1, Probe 1 mittels SPME, Blindprobe . . . . .  | 56 |
| 4.20 Proband 1, Probe 2 mittels SPME . . . . .  | 57 |
| 4.21 Proband 1, Probe 3 mittels SPME . . . . .  | 57 |
| 4.22 Proband 1, Probe 5 mittels SPME . . . . .  | 58 |
| 4.23 $\alpha$ -Bisabolol mittels Headspace-Methode 1 . . . . .  | 59 |
| 4.24 Proband 2, Probe 1 mittels Headspace-Methode 1, Blindprobe . . . . .   | 60 |
| 4.25 Proband 2, Probe 2 mittels Headspace-Methode 1 . . . . .   | 61 |
| 4.26 Proband 2, Probe 3 mittels Headspace-Methode 1 . . . . .   | 61 |
| 4.27 Proband 2, Probe 4 mittels Headspace-Methode 1 . . . . .   | 62 |
| 4.28 Proband 2, Probe 5 mittels Headspace-Methode 1 . . . . .   | 62 |
| 4.29 SV3 3. Harnprobe aus dem Selbstversuch nach Zusatz von Amidosulfonsäure                                      | 64 |
| 4.30 $\alpha$ -Bisabolol mittels Headspace-Methode 2 . . . . .  | 65 |
| 4.31 SV1 1. Harnprobe aus dem Selbstversuch vor der Massage mittels Headspace-<br>Methode 2, Blindprobe . . . . . | 66 |
| 4.32 Proband 1, Probe 3 mittels Headspace-Methode 2, SIM-Modus . . . . .  | 67 |
| 4.33 Proband 1, Probe 3 mittels Headspace-Methode 2, Fullscan-Modus . . . . .                                     | 68 |

# Literatur

- [1] Kubelka, W. und R. Länger (2001): *Phytokodex: pflanzliche Arzneispezialitäten in Österreich: 2001/2002*. Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, Pressestelle und Verlag der Österreichischen Ärztekammer, 308–311.
- [2] Martins, M.; M. Marques; S. Bussadori; M. Martins; V. Pavesi; R. Mesquita-Ferrari und K. Fernandes (2008): Comparative analysis between Chamomilla recutita and corticosteroids on wound healing. An in vitro and in vivo study. In: *Phytother Res*, 274–278.
- [3] Teuscher, E.; M. Melzig und U. Lindequist (2004): *Biogene Arzneimittel: Ein Lehrbuch der pharmazeutischen Biologie*. Wiss. Verlag-Ges., 406–408.
- [4] Singh, O.; Z. Khanam; N. Misra und M. Srivastava (2011): Chamomille (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. In: *Pharmacogn Rev* 5(9), 82–95.
- [5] Kamatou, G. P. P. und A. M. Viljoen (2010): A Review of the Application and Pharmacological Properties of a Bisabolol and a Bisabolol-Rich Oils. In: *Journal of The American Oil Chemists Society* 87 (1), 1–7.
- [6] Souza, A. T. de; T. L. Benazzi; M. B. Grings; V. Cabral; E. A. da Silva; L. Cardozo-Filho und O. A. C. Antunes (2008): Supercritical extraction process and phase equilibrium of Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil using supercritical carbon dioxide. In: *Journal of Supercritical Fluids* 47 (2), 182–187.
- [7] Waleczek, K.; H. Marques; B. Hempel und P. Schmidt (2003): Phase solubility studies of pure (-)-alpha-bisabolol and camomile essential oil with beta-cyclodextrin. In: *Eur J Pharm Biopharm* 55(2), 247–251.
- [8] Perbellini, L.; R. Gottardo; A. Caprini; F. Bortolotti; S. Mariotto und F. Tagliaro (2004): Determination of alpha-bisabolol in human blood by micro-HPLC-ion trap MS and head space-GC-MS methods. In: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 812(1-2), 373–377.
- [9] Habersang, S.; F. Leuschner; O. Isaac und K. Thiemer (1979): Pharmakologische Untersuchungen von Kamillen-Inhaltsstoffen. IV. Untersuchungen zur Toxizität des (-)- $\alpha$ -Bisabolols. In: *Planta Medica* 37, 115–123.

- [10] Cosmetic ingredient review. Final report on the safty assessment of bisabolol (1999). In: *International journal of Toxicology* 18 (Suppl. 3), 33–40.
- [11] Bhatia, S.; D. McGinty; C. Letizia und A. Api (2008): Fragrance material review on  $\alpha$ -bisabolol. In: *Food and Chemical Toxicology* 46 (11), 72–76.
- [12] Gomes-Carneiro, M.; D. M. Dias; A. De-Oliveira und F. J. Paumgartten (2005): Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of  $\alpha$ -bisabolol in the Salmonella/microsome assay. In: *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 585(12), 105–112.
- [13] Ames, B. N.; J. McCann und E. Yamasaki (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. In: *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 31(6), 347–363.
- [14] Achterrath-Tuckermann, U.; R. Kunde; E. Flaskamp; O. Isaac und K. Thiemer (1980): Pharmakologische Untersuchungen von Kamillen-Inhaltsstoffen. V. Untersuchungen über die spasmolytische Wirkung von Kamillen-Inhaltsstoffen und von Kamillosan<sup>®</sup> am isolierten Meerschweinchen-Ileum. In: *Planta Medica* 39, 38–50.
- [15] Gardiner, P. (1999): *Chamomile*. URL: <http://longwoodherbal.org/chamomile/chamomile.pdf>.
- [16] Torrado, S.; S. Torrado; A. Agis; M. Jimenez und R. Cadórniga (1995): Effect of dissolution profile and (-)-alpha-bisabolol on the gastrotoxicity of acetylsalicylic acid. In: *Die Pharmazie* 50(2).
- [17] Jakovlev, V.; O. Isaac; K. Thiemer und R. Kunde (1979): Pharmakologische Untersuchungen von Kamillen-Inhaltsstoffen. II. Neue Untersuchungen zur antiphlogistischen Wirkung des (-)- $\alpha$ -Bisabolols und der Bisabololoxide. In: *Planta Medica* 35, 125–140.
- [18] Piochon, M.; J. Legault; C. Gauthier und A. Pichette (2009): Synthesis and cytotoxicity evaluation of natural alpha-bisabolol beta-d-fucopyranoside and analogues. In: *Phytochemistry*, 228–236.
- [19] Pahlow, M. (2000): *Heilpflanzen: sanfte Behandlung von Alltagsbeschwerden*. Erlebnis Gesundheit. Hirzel.
- [20] Cavalieri, E.; A. Rigo; M. Bonifacio; A. C. de Prati; E. Guardalben; C. Bergamini; R. Fato; G. Pizzolo; H. Suzuki und F. Vinante (2011): Pro-apoptotic activity of  $\alpha$ -bisabolol in preclinical models of primary human acute leukemia cells. In: *Journal of translational medicine* 9, 45.

- [21] Cavaliere, E.; S. Mariotto; C. Fabrizi; A. C. de Prati; R. Gottardo; S. Leone; L. V. Berra; G. M. Lauro; A. R. Ciampa und H. Suzuki (2004):  $\alpha$ -Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315(3), 589–594.
- [22] Hahn, B. und J. Hölzl (1987): [Resorption, Verteilung und Metabolismus von<sup>14</sup>C]-Levomenol in der Haut]. In: *Arzneimittelforschung* 37(6), 716–720.
- [23] Richter, C. (2007). URL: <http://diepresse.com/home/diverse/gesundheit/57114/print.do#>.
- [24] Sacchi, A.: *A pilot study on the efficacy of Acthyderm on active compounds transdermal delivery*.
- [25] Amitrano, C.; R. Cappelletti und R. Torre (2007): New Trends in Drug Delivery Systems: Mesoporation, a Novel Technique. In: *The American Journal of Mesotherapy* 1, 24–25.
- [26] Lindmayr, M. (2012): »Nachweis von cis-Nerolidol im humanen Urin mittels GC-MS nach transdermaler Applikation«. Magisterarb. Universität Wien.
- [27] Friedl, S. M.; K. Oedendorfer; S. Kitzer; G. Reznicek; G. Sladek und E. Heuberger (2010): Comparison of liquid-liquid partition, HS-SPME and static HS GC/MS analysis for the quantification of (-)-linalool in human whole blood samples. In: *Nat. Prod. Commun* 5, 1447–1452.

## 7 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Maria Franziska Gundendorfer  
Staatsangehörigkeit Österreich  
Geburtsdatum, -ort 17.02.1985, Linz

### Schulbildung

1999-2004 Höhere Technische Bundeslehranstalt Wels  
Ausbildungsschwerpunkt chemische Betriebstechnik

### Studium

2004-2015 Studium der Pharmazie an der Universität Wien

### Diplomarbeit

Titel Vorversuche zum Nachweis von (-)- $\alpha$ -Bisabolol aus dem menschlichen Urin nach Massage mittels GC-MS-Analyse

Betreuer Mag. pharm. Dr. Iris Stappen  
Univ.-Prof. Dr. Mag. Gerhard Buchbauer

### Berufliche Tätigkeiten

2003-2007 Feriapraktika in Hoyer´s Nibelungen-Apotheke  
2007-2012 Geringfügige Beschäftigung in Hoyer´s Nibelungen-Apotheke  
2012-heute Vollzeitanstellung bei Hoyer´s Nibelungen-Apotheke