

Produktentwicklung eines luteinhaltigen, kolloidalen Nahrungsergänzungsmittels: Physikochemische und ernährungsphysiologische Aspekte

vorgelegt von

Kristine Wolf

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

"doctor rerum naturalium"

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin "Physiologie und Pathophysiologie"

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Institut für Ernährungswissenschaft

Universität Potsdam

Potsdam, 04. Dezember 2020

Hauptbetreuer: apl. Prof. Dr. Harshadrai M. Rawel

Zweitbetreuer: Prof. Dr. Florian J. Schweigert

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. Matthias F. Melzig

Published online on the
Publication Server of the University of Potsdam:
<https://doi.org/10.25932/publishup-48774>
<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-487743>

Meiner lieben Familie

Zusammenfassung

Sekundäre Pflanzenstoffe und ihre gesundheitsfördernden Eigenschaften sind in den letzten zwei Jahrzehnten vielfach ernährungsphysiologisch untersucht und spezifische positive Effekte im humanen Organismus zum Teil sehr genau beschrieben worden. Zu den Carotinoiden zählend ist der sekundäre Pflanzenstoff Lutein insbesondere in der Prävention von ophthalmologischen Erkrankungen in den Mittelpunkt der Forschung gerückt. Das ausschließlich von Pflanzen und einigen Algen synthetisierte Xanthophyll wird über die pflanzliche Nahrung insbesondere grünes Blattgemüse in den humanen Organismus aufgenommen. Dort akkumuliert es bevorzugt im Makulapigment der Retina des menschlichen Auges und ist bedeutend im Prozess der Aufrechterhaltung der Funktionsfähigkeit der Photorezeptorzellen. Im Laufe des Alterns kann die Abnahme der Dichte des Makulapigments und der Abbau von Lutein beobachtet werden. Die dadurch eintretende Destabilisierung der Photorezeptorzellen im Zusammenhang mit einer veränderten Stoffwechsellage im alternden Organismus kann zur Ausprägung der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) führen. Die pathologische Symptomatik der Augenerkrankung reicht vom Verlust der Sehschärfe bis hin zum irreversiblen Erblinden. Da therapeutische Mittel ausschließlich ein Fortschreiten verhindern, bestehen hier Forschungsansätze präventive Maßnahmen zu finden. Die Supplementierung von luteinhaltigen Präparaten bietet dabei einen Ansatzpunkt. Auf dem Markt finden sich bereits Nahrungsergänzungsmittel (NEM) mit Lutein in verschiedenen Applikationen. Limitierend ist dabei die Stabilität und Bioverfügbarkeit von Lutein, welches teilweise kostenintensiv und mit unbekannter Reinheit zu erwerben ist. Aus diesem Grund wäre die Verwendung von Luteinestern als die pflanzliche Speicherform des Luteins im Rahmen eines NEMs vorteilhaft. Neben ihrer natürlichen, höheren Stabilität sind Luteinester nachhaltig und kostengünstig einsetzbar.

In dieser Arbeit wurden physikochemische und ernährungsphysiologisch relevante Aspekte in dem Produktentwicklungsprozess eines NEMs mit Luteinestern in einer kolloidalen Formulierung untersucht. Die bisher einzigartige Anwendung von Luteinestern in einem Mundspray sollte die Aufnahme des Wirkstoffes insbesondere für ältere Menschen erleichtern und verbessern. Unter Beachtung der Ergebnisse und der ernährungsphysiologischen Bewertung sollten u.a. Empfehlungen für die Rezepturzusammensetzungen einer Miniemulsion (Emulsion mit Partikelgrößen $<1,0 \mu\text{m}$) gegeben werden. Eine Einschätzung der Bioverfügbarkeit der Luteinester aus den entwickelten, kolloidalen Formulierungen konnte anhand von Studien zur Resorption- und Absorptionsverfügbarkeit *in vitro* ermöglicht werden.

In physikalischen Untersuchungen wurden zunächst Basisbestandteile für die Formulierungen präzisiert. In ersten wirkstofffreien Musteremulsionen konnten ausgewählte Öle als Trägerphase sowie Emulgatoren und Löslichkeitsvermittler (Peptisatoren) hinsichtlich ihrer Eignung zur Bereitstellung einer Miniemulsion physikalisch geprüft werden. Die beste Stabilität und optimale Eigenschaften einer Miniemulsion zeigten sich bei der Verwendung von MCT-Öl (engl. *medium chain triglyceride*) bzw. Rapsöl in der Trägerphase sowie des Emulgators Tween[®] 80 (Tween 80) allein oder in Kombination mit dem Molkenproteinhydrolysat Biozate[®] 1 (Biozate 1).

Aus den physikalischen Untersuchungen der Musteremulsionen gingen die Präemulsionen als Prototypen hervor. Diese enthielten den Wirkstoff Lutein in verschiedenen Formen. So wurden Präemulsionen mit Lutein, mit Luteinestern sowie mit Lutein und Luteinestern konzipiert, welche den Emulgator Tween 80 oder die Kombination mit Biozate 1 enthielten. Bei der Herstellung der Präemulsionen führte die Anwendung der Emulgiertechniken Ultraschall mit anschließender Hochdruckhomogenisation zu den gewünschten Miniemulsionen. Beide eingesetzten Emulgatoren boten optimale Stabilisierungseffekte. Anschließend erfolgte die physikochemische Charakterisierung der Wirkstoffe. Insbesondere Luteinester aus Oleoresin erwiesen sich hier als stabil gegenüber verschiedenen Lagerungsbedingungen. Ebenso konnte bei einer kurzzeitigen Behandlung der Wirkstoffe unter spezifischen mechanischen, thermischen, sauren und basischen Bedingungen eine Stabilität von Lutein und Luteinestern gezeigt werden. Die Zugabe von Biozate 1 bot dabei nur für Lutein einen zusätzlichen Schutz. Bei längerer physikochemischer Behandlung unterlagen die in den Miniemulsionen eingebrachten Wirkstoffe moderaten Abbauvorgängen. Markant war deren Sensitivität gegenüber dem basischen Milieu. Im Rahmen der Rezepturentwicklung des NEMs war hier die Empfehlung, eine Miniemulsion mit einem leicht saurem pH-Milieu zum Schutz des Wirkstoffes durch kontrollierte Zugabe weiterer Inhaltsstoffe zu gestalten.

Im weiteren Entwicklungsprozess des NEMs wurden Fertigrezepturen mit dem Wirkstoff Luteinester aufgestellt. Die alleinige Anwendung des Emulgators Biozate 1 zeigte sich dabei als ungeeignet. Die weiterhin zur Verfügung stehenden Fertigrezepturen enthielten in der Ölphase neben dem Wirkstoff das MCT-ÖL oder Rapsöl sowie α -Tocopherol zur Stabilisierung. Die Wasserphase bestand aus dem Emulgator Tween 80 oder einer Kombination aus Tween 80 und Biozate 1. Zusatzstoffe waren zudem als mikrobiologischer Schutz Ascorbinsäure und Kaliumsorbat sowie für sensorische Effekte Xylitol und Orangenaroma. Die Anordnung der Ba-

sisrezeptur und das angewendete Emulgierverfahren lieferten stabile Miniemulsionen. Weiterhin zeigten langfristige Lagerungsversuche mit den Fertigrezepturen bei 4°C, dass eine Aufrechterhaltung der geforderten Luteinestermenge im Produkt gewährleistet war. Analoge Untersuchungen an einem luteinhaltigen, marktgängigen Präparat bestätigten dagegen eine bereits bei kurzfristiger Lagerung auftretende Instabilität von Lutein.

Abschließend wurde durch Resorptions- und Absorptionsstudien *in vitro* mit den Präemulsionen und Fertigrezepturen die Bioverfügbarkeit von Luteinestern geprüft. Nach Behandlung in einem etablierten *in vitro* Verdaumodell konnte eine geringfügige Resorptionsverfügbarkeit der Luteinester definiert werden. Limitiert war eine Micellarisierung des Wirkstoffes aus den konzipierten Formulierungen zu beobachten. Eine enzymatische Spaltung der Luteinester zu freiem Lutein wurde nur begrenzt festgestellt. Spezifität und Aktivität von entsprechenden hydrolytischen Lipasen sind als äußerst gering gegenüber Luteinestern zu bewerten. In sich anschließenden Zellkulturversuchen mit der Zelllinie Caco-2 wurden keine zytotoxischen Effekte durch die relevanten Inhaltsstoffe in den Präemulsionen gezeigt. Dagegen konnten eine Sensibilität gegenüber den Fertigrezepturen beobachtet werden. Diese sollte im Zusammenhang mit Irritationen der Schleimhäute des Magen-Darm-Traktes bedacht werden. Eine weniger komplexe Rezeptur könnte die beobachteten Einschränkungen möglicherweise minimieren. Abschließende Absorptionsstudien zeigten, dass grundsätzlich eine geringfügige Aufnahme von vorrangig Lutein, aber auch Luteinmonoestern in den Enterocyten aus Miniemulsionen erfolgen kann. Dabei hatte weder Tween 80 noch Biozate 1 einen förderlichen Einfluss auf die Absorptionsrate von Lutein oder Luteinestern. Die Metabolisierung der Wirkstoffe durch vorherigen *in vitro*-Verdau steigerte die zelluläre Aufnahme von Wirkstoffen aus Formulierungen mit Lutein und Luteinestern gleichermaßen. Die beobachtete Aufnahme von Lutein und Luteinmonoestern in den Enterocyten scheint über passive Diffusion zu erfolgen, wobei auch der aktive Transport nicht ausgeschlossen werden kann. Dagegen können Luteindiester aufgrund ihrer Molekülgröße nicht über den Weg der Micellarisierung und einfachen Diffusion in die Enterocyten gelangen. Ihre Aufnahme in die Dünndarmepithelzellen bedarf einer vorherigen hydrolytischen Spaltung durch spezifische Lipasen. Dieser Schritt limitiert wiederum die effektive Aufnahme der Luteinester in die Zellen bzw. stellt eine Einschränkung in ihrer Bioverfügbarkeit im Vergleich zu freiem Lutein dar.

Zusammenfassend konnte für die physikochemisch stabilen Luteinester eine geringe Bioverfügbarkeit aus kolloidalen Formulierungen gezeigt werden. Dennoch ist die Verwendung als

Wirkstoffquelle für den sekundären Pflanzenstoff Lutein in einem NEM zu empfehlen. Im Zusammenhang mit der Aufnahme von luteinreichen, pflanzlichen Lebensmitteln kann trotz der zu erwartenden geringen Bioverfügbarkeit der Luteinester aus dem NEM ein Beitrag zur Verbesserung des Luteinstatus erreicht werden. Entsprechende Publikationen zeigten eindeutige Korrelationen zwischen der Aufnahme von luteinesterhaltigen Präparaten und einem Anstieg der Luteinkonzentration im Serum bzw. der Makulapigmentdichte *in vivo*. Die geringfügig bessere Bioverfügbarkeit von freiem Lutein steht im kritischen Zusammenhang mit seiner Instabilität und Kostenintensität. Bilanzierend wurde im Rahmen dieser Arbeit das marktgängige Produkt Vita Culus® konzipiert. Im Ausblick sollten humane Interventionsstudien mit dem NEM die abschließende Bewertung der Bioverfügbarkeit von Luteinestern aus dem Präparat möglich machen.

Summary

Secondary plant metabolites and their health-promoting properties have been studied and published over the past two decades. Their specificity with regard to positive properties and effects in the human organism has been described precisely. Among the carotenoids, the secondary plant metabolite lutein has become the focus of research, particularly in the prevention of ophthalmic diseases. The xanthophyll, which is synthesized exclusively by plants (incl. some algae), is absorbed into the human organism through plant food especially green leafy vegetables. There it accumulates preferentially in the macular pigment of the retina of the human eye and is important in the process of maintaining the functionality of the photoreceptors. As the aging progresses, the decrease in the density of the macular pigment and the depletion of lutein can be observed. The resulting destabilization of the photoreceptors in connection with a changed metabolism in the aging organism can lead to the development of age-related macular degeneration (AMD). The pathological symptoms of AMD range from loss of visual acuity to irreversible blindness. Since therapeutic agents only enable the disease to be decelerated or come to a standstill, research approaches exist to find preventive measures. The supplementation of preparations containing lutein offers a starting point to have a targeted positive effect on the stability of the macular pigment density and thus to maintain the quality of vision even in old age. Dietary supplements (DS) with lutein in various applications are available on the market. Limiting is the stability and bioavailability of lutein, which can be expensive and acquired with unknown purity. For this reason, the use of the storage form of lutein in plants, the lutein esters within the framework of a DS would be advantageous. In addition to their natural, higher stability, lutein esters can be used sustainably and inexpensively.

In this thesis, physicochemical and nutritionally relevant aspects in the product development process of a DS with lutein esters in a colloidal formulation were investigated. The hitherto unique use of lutein esters in oral spray applications should facilitate and improve the absorption of the active ingredient especially for older people. Taking into account the results and the nutritional assessment, recommendations for the recipe compositions of a miniemulsions (emulsion with particle sizes $<1.0 \mu\text{m}$) are given. An assessment of the bioavailability of the lutein esters from the developed colloidal formulations was realized by means of studies on the absorption accessibility and availability *in vitro*.

In physical investigations, the basic components for the colloidal formulations to be developed were first specified. In the first active ingredient-free sample emulsions selected oils as carrier

phase as well as emulsifiers and solubilizers (peptizers) could be physically tested with regard to their suitability for providing a miniemulsion. The best stability and optimal properties of a miniemulsion were found when using MCT oil (medium chain triglyceride) or rapeseed oil in the carrier phase and the emulsifier Tween[®] 80 (Tween 80) alone or in combination with the whey protein hydrolyzate Biozate[®] 1 (Biozate 1) in the aqueous phase.

The pre-emulsions were developed as prototypes from the physical examinations of the basic recipes. These contained the active ingredient lutein in various forms. Pre-emulsions with lutein, with lutein esters or with lutein and lutein esters were prepared. They contained the emulsifier Tween 80 or the combination with Biozate 1. In the preparation of the pre-emulsions the use of ultrasound emulsification techniques with subsequent high-pressure homogenization led to the postulated miniemulsions. Both emulsifiers used offered optimal stabilization effects. This was followed by the physicochemical characterization of the active substances in the pre-emulsions. In particular, lutein esters from oleoresin were found to be stable against various storage conditions. A short-term treatment of the active ingredients under specific mechanical, thermal, acidic and basic conditions also demonstrated the stability of lutein and lutein esters. The addition of Biozate 1 offered further protection for lutein. In the case of prolonged physicochemical treatment, the active substances incorporated in the miniemulsions were subject to moderate degradation processes. The sensitivity of the active ingredients in the formulations to a basic environment was striking. As part of the formulation development of the DS, the recommendation was given to design a miniemulsion with a slightly acidic environment by the controlled addition of further ingredients to protect the active ingredient.

In the further development process of the DS, refined formulations with the active ingredient lutein ester and modifications of the emulsifiers were then set up. The sole use of the emulsifier Biozate 1 turned out to be unsuitable and these formulations were rejected. The refined formulations that were still available contained the carriers MCT oil or rapeseed oil as well as α -tocopherol for stabilization. The water phase consisted of the emulsifier Tween 80 or a combination of Tween 80 and Biozate 1. Additives were ascorbic acid and potassium sorbate for microbial protection such as xylitol and orange aroma for sensory effects. The arrangement of the basic recipe and the emulsifying process used provided stable miniemulsions. Long-term storage tests with the ready formulations at 4°C showed that the required amount of lutein ester is maintained in the product. Analogous tests on a preparation containing lutein confirmed the instability of lutein, which occurs even in the case of short-term storage.

Finally, the bioavailability of the lutein esters was investigated using the pre-emulsions and refined formulations in studies of absorption accessibility and availability *in vitro*. For these studies an *in vitro* digestion model was confirmed. After treatment of the formulations in this model a slight absorption accessibility of the lutein esters could be classified. Micellarization process and enzymatic cleavage of the lutein esters to free lutein has only been found to a limited extent. The specificity and activity of corresponding hydrolytic lipases to lutein esters can be rated as extremely low. In subsequent cell culture experiments with the Caco-2 cell line, no cytotoxic effects were shown by the relevant ingredients in the pre-emulsions. In contrast, sensitivity to the refined formulations could be observed. This should be considered in connection with irritation of the mucous membranes of the gastrointestinal tract. A less complex formulation could possibly prevent the observed restrictions. In studies of absorption availability *in vitro* a low uptake of primarily free lutein, but also lutein monoesters in the enterocytes from miniemulsions could be observed. Neither Tween 80 nor Biozate 1 have a beneficial influence on the absorption rate of lutein or lutein esters. But micellarization of the active ingredients through previous *in vitro* digestion increased the cellular uptake of lutein and lutein esters from the formulations. This gives an evidence of the relevance of micellarization in absorption of lipophilic substances. The uptake of lutein and lutein monoesters in the enterocytes seems to be possible via passive diffusion, although active transport cannot be ruled out either. On the other hand, due to their molecular size, lutein diesters cannot enter into the enterocytes via micellarization or simple diffusion. Their absorption in the small intestine epithelial cells requires prior hydrolytic cleavage by specific lipases. This step in turn limits the effective absorption of the lutein esters into the cells or represents a restriction in their bioavailability in comparison to free lutein.

In summary, a low bioavailability for the physicochemically stable lutein esters from colloidal formulations was shown. Nevertheless, the use as a source of active ingredients for the xanthophyll lutein in a DS is recommended. In connection with the intake of plant foods rich in lutein, a contribution to improving the lutein status can be achieved despite the expected low bioavailability of the lutein esters from the DS. Corresponding publications showed clear correlations between the intake of preparations containing lutein ester and an increase in serum lutein concentrations or the macular pigment density *in vivo*. The slightly better bioavailability of free lutein is critically linked to its instability and cost intensity. On the basis of this work, the product Vita Culus[®] was designed and is available on the market. As a prospect of future research,

Summary

human intervention studies with the DS should be conducted to assess the total bioavailability of lutein esters from miniemulsions in detail.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Summary

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Altern und altersbedingte Erkrankungen.....	2
1.2	Altersbedingte Makuladegeneration (AMD).....	4
1.3	Sekundäre Pflanzenstoffe.....	10
1.3.1	Carotinoide	11
1.4	Lutein	12
1.4.1	Biosynthese, chemische Struktur und Vorkommen von Lutein und Luteinestern... 12	
1.4.2	Bedeutung in der Pflanze	13
1.4.3	Bedeutung für den humanen Organismus	14
1.5	Nahrungsergänzungsmittel	21
1.5.1	Miniemulsionen als Basis eines Nahrungsergänzungsmittels.....	22
1.5.2	Kolloidale Formulierungen mit dem sekundären Pflanzenstoffen Lutein	27
2	ZIELSTELLUNG	29
3	MATERIAL UND METHODEN.....	33
3.1	Probenmaterial	33
3.1.1	Wirkstoffträger	33
3.1.2	Formulierungen	33
3.2	Methoden	35
3.2.1	Herstellung der lutein- bzw. luteinesterhaltigen Formulierungen.....	35
3.2.2	Quantitative und qualitative Analytik von Lutein und Luteinestern mittels RP-HPLC.....	36
3.2.3	Photometrische Bestimmung der Reinheit der Stammlösung Lutein zur externen Kalibrierung	38
3.2.4	Extraktion lutein- und luteinesterhaltiger Proben zur Analyse mittels RP-HPLC... 40	
3.2.5	Partikelgrößenanalyse zur physikalischen Charakterisierung von Miniemulsionen 41	
3.2.6	Bestimmung des Strömungspotentials mittels Partikelladungsdetektor PCD-03 44	
3.2.7	Physikochemische Charakterisierung von Lutein und Luteinestern in Ölen, Miniemulsionen und Fertigrezepturen	45

3.2.8	Charakterisierung der Resorptionsverfügbarkeit von lutein- und luteinesterhaltigen Formulierungen <i>in vitro</i>	47
3.2.9	Zellkultur	51
3.2.10	Statistik.....	59
4	ERGEBNISSE	61
4.1	Qualitative und quantitative Analytik von Lutein und Luteinestern mittels RP-HPLC.....	61
4.1.1	Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Methode.....	63
4.2	Konzeption des NEMs in Form einer Miniemulsion mit dem Wirkstoffträger Lutein bzw. Luteinestern.....	65
4.2.1	Wahl des Wirkstoffträgers	65
4.2.2	Wahl der Trägerphase und der Emulgatoren unter Berücksichtigung der physikalischen Stabilität.....	66
4.2.3	Wahl des Emulgiervfahrens zur Herstellung von stabilen, wirkstoffhaltigen Miniemulsionen.....	72
4.3	Physikochemische Charakteristik von Lutein und Luteinestern in Ölen, Miniemulsionen und Fertigrezepturen	79
4.3.1	Stabilität der Wirkstoffe gegenüber Lagerung	79
4.3.2	Stabilität der Wirkstoffe gegenüber Ultraschallbehandlung	86
4.3.3	Stabilität der Wirkstoffe gegenüber physiologischer Körpertemperatur	88
4.3.4	Stabilität der Wirkstoffe gegenüber unterschiedlichen pH-Bedingungen.....	91
4.4	Charakterisierung der Resorptionsverfügbarkeit von lutein- und luteinesterhaltigen Formulierungen <i>in vitro</i>	96
4.4.1	Wirkstoffverhalten von Lutein und Luteinestern in Miniemulsionen gegenüber synthetischen Verdauungssäften – Einzelkompartimente.....	96
4.4.2	Resorptionsverfügbarkeit von Lutein und Luteinestern nach chronologischer Passage im <i>in vitro</i> Verdaumodell <i>basic</i>	98
4.4.3	Wirkstoffverhalten von Lutein und Luteinester in kolloidalen Formulierungen gegenüber verschiedenen industriellen Enzymen	101
4.4.4	Simulierte Esterhydrolyse durch Verseifung mit ethanolischer Kaliumhydroxidlösung (Positivkontrolle).....	105
4.5	Charakterisierung zytotoxischer Effekte und der Wirkstoffabsorption durch Caco-2 Zellen aus lutein- und luteinesterhaltigen Formulierungen <i>in vitro</i>	106
4.5.1	Zytotoxische Einordnung der Wirkstoffe und Substanzen in den kolloidalen Formulierungen	106
4.5.2	Zelluläre Aufnahme von Lutein und Luteinestern aus kolloidalen Formulierungen	120
5	DISKUSSION	131

5.1 Frühe Phasen zur Konzeption des NEMs in Form einer Miniemulsion mit dem Wirkstoffträger Lutein bzw. Luteinestern	132
5.1.1 Wahl des Wirkstoffträgers	132
5.1.2 Wahl der Trägerphase und der Emulgatoren.....	133
5.1.3 Zugabe von Peptisatoren	140
5.1.4 Wahl des Emulgiervfahrens	141
5.1.5 Entwicklung von Prototypen (Präemulsionen)	144
5.1.6 Einfluß des Emulgiervfahrens auf die Wiederfindung des Wirkstoffes in Miniemulsionen.....	145
5.2 Physikochemische Charakterisierung der konzipierten Präemulsionen und entwickelter Fertigrezepturen <i>in vitro</i>	147
5.2.1 Stabilität der Wirkstoffe gegenüber Lagerung	147
5.2.2 Effekte von Ultraschall, Temperatur und pH-Milieu auf die Stabilität der Wirkstoffe in MCT-Öl und Präemulsionen	149
5.2.3 Fortschreiten des Entstehungsprozesses: Entwurf der Fertigrezepturen mit Zugabe weiterer Inhaltstoffe	153
5.2.4 Langfristiger Effekt der Lagerung auf die Wirkstoffstabilität in den Fertigrezepturen	156
5.3 Charakterisierung der Resorptionsverfügbarkeit von lutein- und luteinesterhaltigen Formulierungen <i>in vitro</i>	158
5.3.1 Wirkstoffverhalten von Lutein und Luteinestern in Miniemulsionen gegenüber synthetischen Verdauungssäften – Einzelkompartimente.....	161
5.3.2 Resorptionsverfügbarkeit von Lutein und Luteinestern nach chronologischer Passage im <i>in vitro</i> Verdaumodell <i>basic</i>	162
5.3.3 Wirkstoffverhalten von Lutein und Luteinestern in kolloidalen Formulierungen gegenüber verschiedenen industriellen Enzymen – Diskussionsansatz für eine Produkterweiterung	167
5.4 Charakterisierung zytotoxischer Effekte und der Wirkstoffabsorption aus lutein- und luteinesterhaltigen Formulierungen am Zellmodell Caco-2 <i>in vitro</i>	171
5.4.1 Zytotoxische Einordnung von relevanten Inhaltsstoffe und der Wirkstoffe in den kolloidalen Formulierungen über deren Effekte auf die lysosomale Membranintegrität und Stoffwechselaktivität von Caco-2 <i>in vitro</i>	171
5.4.2 Zelluläre Aufnahme von Lutein und Luteinestern aus kolloidalen Formulierungen	178
6 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	187
7 REFERENZEN	193
Lebenslauf	209
Veröffentlichungen	211
Danksagung.....	213

Eidestattliche Erklärung.....	215
8 ANHANG.....	217
8.1 Material.....	217
8.1.1 Chemikalien	217
8.1.2 Geräte	220
8.1.3 Verbrauchsmaterial	221
8.2 Methodenteil	223
8.2.1 Zusammensetzung der lutein- bzw. luteinesterhaltigen Formulierungen	223
8.2.2 Lösungen für die physikochemische Charakterisierung wirkstoffhaltiger Miniemulsionen.....	227
8.2.3 Synthetische Verdaulichkeiten und Lösungen für die <i>in vitro</i> Verdau-Versuche...	227
8.2.4 Medien und Lösungen für die Zellkulturversuche	227
8.3 Ergebnisteil	228
8.3.1 Qualitative und quantitative Analytik von Lutein und Luteinester mittels RP-HPLC	228
8.3.2 Konzeption des NEMs in Form einer Miniemulsion mit dem Wirkstoffträger Lutein bzw. Luteinester	230
8.3.3 Physikochemische Charakteristik von Lutein und Luteinestern in Ölen, Miniemulsionen und Fertigrezepturen	235
8.3.4 Charakterisierung zytotoxischer Effekte und Wirkstoffabsorption durch Caco-2 Zellen aus lutein- und luteinesterhaltigen Formulierungen <i>in vitro</i>	238

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 „Inflammaging“ Dysregulation von Cytokinen und NF- κ B-Aktivierung.	3
Abbildung 2 Lage des retinalen Makulapigments im gesunden, menschlichen Auge. Adaptiert von [19].	4
Abbildung 3 Pathologie der altersbedingten Makuladegeneration. Adaptiert von [19].	6
Abbildung 4 Chemische Strukturen von Carotinoiden.	13
Abbildung 5 Schematische Darstellung möglicher trans-, inter- und innerzellulärer Transportwege von Lutein und Luteinestern im Enterozyten. Modifiziert nach [82].	16
Abbildung 6 Schematischer Aufbau einer stabilen O/W-Emulsion und Destabilisierungseffekte.	24
Abbildung 7 Grundlagen der Laserbeugungsanalyse (Laserdiffraktometrie).	42
Abbildung 8 Grundlagen der Analyse dynamischer Lichtstreuung (Photonenkorrelationspektroskopie).	43
Abbildung 9 Chromatographische Darstellung des Luteinesterspektrums einer Oleoresinprobe (30 mg Oleoresin/mL MCT-Öl).	62
Abbildung 10 Chromatographische Darstellung des externen Standards Lutein vom Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau e.V.	63
Abbildung 11 Lagerstabilität der Wirkstoffe in den Fertigrezepturen und dem kommerziellen Produkt New Focus™.	84
Abbildung 12 Langfristige Effekte physiologischer Körpertemperatur auf die Stabilität von Lutein und Luteinestern in reiner Ölphase und in Miniemulsionen.	91
Abbildung 13 Einfluss von sauren und basischen Bedingungen auf die Stabilität von Lutein und Luteinestern in reiner Ölphase und in Miniemulsionen.	95
Abbildung 14 Effekte synthetischer Verdauungssäfte auf die Stabilität von Lutein und Luteinestern in Miniemulsionen.	96
Abbildung 15 Wirkstoffstabilität von Luteinestern in den Fertigrezepturen nach simulativer Metabolisierung mittels <i>in vitro</i> Verdaumodell <i>basic</i>	100
Abbildung 16 Viabilität von Caco-2 Zellen nach Behandlung mit den Wirkstoffen Lutein und Luteinestern <i>in vitro</i>	107
Abbildung 17 Viabilität von Caco-2 Zellen nach Behandlung mit Tween 80, Biozate 1 und MCT-Öl <i>in vitro</i>	110
Abbildung 18 Viabilität von Caco-2 Zellen nach Behandlung mit Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen (hochdruckhomogenisiert) <i>in vitro</i>	114
Abbildung 19 Zelluläre Aufnahme von Lutein und Luteinestern aus Fertigrezepturen und Miniemulsionen (hochdruckhomogenisiert) am Caco-2 Modell <i>in vitro</i>	126
Abbildung 20 Zelluläre Aufnahme von Lutein und Luteinestern aus Fertigrezepturen und Miniemulsionen (hochdruckhomogenisiert) <i>in vitro</i>	129

Abbildung 21 Produktentstehungsprozess eines kolloidalen Nahrungsergänzungsmittels zur altersgerechten Supplementierung mit dem sekundären Pflanzenstoff Lutein. ..	132
Abbildung 22 Frühe Phasen des Produktentwicklungsprozesses eines kolloidalen Nahrungsergänzungsmittels zur altersgerechten Supplementierung mit dem sekundären Pflanzenstoff Lutein.	145
Abbildung 23 Zusammensetzung der Fertigrezepturen 122 bis 127.....	155
Abbildung 24 Schematischer Ablauf der Untersuchungen zum Einfluss des Micellarisierungsgrades auf die zelluläre Aufnahme der Wirkstoffe aus Präemulsionen <i>in vitro</i> ..	181
Abbildung 25 Der Produktentstehungsprozess des kolloidalen Nahrungsergänzungsmittels „VITA Culus®“ ..	190
Abbildung A 1 Streudiagramm der unabhängigen Standardkonzentrationsreihen von Lutein zur Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen.....	229

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Anstieg der Prävalenz der altersbedingten Makuladegeneration ab dem 65. Lebensjahr in ausgewählten Studien [33, 34]	8
Tabelle 2 Klinisches Modell zur Einstufung des Stadiums der AMD nach dem AMD Classification Committee der Beckman Initiative für Makula-Forschung.	8
Tabelle 3 Konzentrationen des Xanthophylls Lutein in ausgewählten Organen, Geweben und Körperflüssigkeiten des Menschen. Modifiziert nach [102].	19
Tabelle 4 Untersuchungen zum sekundären Pflanzenstoff Lutein in kolloidalen Formulierungen.	28
Tabelle 5 Verwendete Wirkstoffträger.....	33
Tabelle 6 Präemulsionen mit Wirkstoff und Emulgatoren (Emulgiertechnik: Ultraschall und Hochdruckhomogenisation).	33
Tabelle 7 Präemulsionen mit Wirkstoff und Emulgatoren. (Emulgiertechnik: Ultraschall)....	34
Tabelle 8 Fertigrezepturen mit Luteinestern und Emulgatoren. (Emulgiertechnik: Ultraschall und Hochdruckhomogenisation).	34
Tabelle 9 Vergleichsprodukt New Focus™ Spray.	34
Tabelle 10 Bedingungen für die quantitative Analytik von Lutein und seiner Esterformen mittels RP-HPLC am Shimadzu HPLC-System modifiziert nach [140, 147].	38
Tabelle 11 Modifiziertes Extraktionsprotokoll zur quantitativen Analytik von lutein- bzw. luteinesterhaltigen Proben. Modifiziert nach [53, 140].....	40
Tabelle 12 <i>in vitro</i> Verdaumodell <i>basic</i>	48
Tabelle 13 Alternative Enzyme zum Pankreatin im synthetischen Intestinalsaft des <i>in vitro</i> Verdaumodells <i>basic</i>	51
Tabelle 14 Charakteristische Merkmale der Zelllinie Caco-2 nach [161].	52
Tabelle 15 Zelluläre Aufnahme von Lutein und Luteinestern aus kolloidalen Formulierungen <i>in vitro</i>	58
Tabelle 16 Relevante Wirkstoffträger für Lutein und Luteinester.	65
Tabelle 17 Veränderung der mittleren Partikelgrößen in wirkstofffreien Miniemulsionen mit verschiedenen Ölen über einen Zeitraum von 6 Monaten.....	67
Tabelle 18 Veränderung der mittleren Partikelgrößen in wirkstofffreien Miniemulsionen mit Überschuss an Biozate 1 über einen Zeitraum von 30 Tagen.	69
Tabelle 19 Veränderung der mittleren Partikelgröße in wirkstofffreien Miniemulsionen mit Tween 80 und Biozate 1 (1:1) über einen Zeitraum von 30 Tagen.....	70
Tabelle 20 Mittlere Partikelgrößen und Strömungspotentiale in Miniemulsionen in Abhängigkeit der Zugabe eines Peptisators.	72
Tabelle 21 Partikeldurchmesser in Miniemulsionen mit Leitungswasser, wirkstoffbeladenen Ölen und 0,03 g Tween 80/mL in Abhängigkeit der verwendeten Emulgiertechnik.	75

Tabelle 22	Wirkstoffveränderungen in den Miniemulsionen nach Behandlung mit Ultraschall- und Hochdruckhomogenisierung.	76
Tabelle 23	Durchschnittliche Partikelgrößen in Miniemulsionen mit Leitungswasser, wirkstoffbeladenen Ölen und Emulgatoren nach Behandlung mit Ultraschallhomogenisierung.....	79
Tabelle 24	Lagerstabilität von Luteinestern aus Oleoresin in MCT-Öl bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen.	80
Tabelle 25	Stabilität von Lutein und Luteinestern in Miniemulsionen bei Lagerung.	81
Tabelle 26	Einfluss von Ultraschall auf die Stabilität von Lutein und Luteinestern in reiner Ölphase und in Miniemulsionen.....	88
Tabelle 27	Kurzfristige Effekte physiologischer Körpertemperatur auf die Stabilität von Lutein und Luteinestern in reiner Ölphase und in Miniemulsionen.....	90
Tabelle 28	Wirkstoffstabilität von Lutein und Luteinestern in reinen Ölphasen bzw. in Miniemulsionen nach simulativer Metabolisierung mittels <i>in vitro</i> Verdaumodell <i>basic</i>	99
Tabelle 29	Hydrolyse von Luteinestern in Miniemulsionen bei Behandlung mit modifiziertem, synthetischem Intestinalsaft (Enzym: Cholesterolesterase).....	102
Tabelle 30	Einfluss verschiedener industrieller Lipasen von Pilzen auf Lutein und Luteinester in Miniemulsionen.....	104
Tabelle 31	Simulierte Hydrolyse von Luteinestern in Miniemulsionen und reiner Ölphase durch Verseifung mit ethanolischer Kaliumhydroxidlösung (Positivkontrolle).	105
Tabelle 32	Wirkstoffkonzentrationen in den Inkubationsmedien zur Bestimmung der Viabilität von Caco-2 Zellen bei Behandlung mit Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen (hochdruckhomogenisiert) <i>in vitro</i>	113
Tabelle 33	Viabilität von Caco-2 Zellen nach Behandlung mit Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen (hochdruckhomogenisiert) <i>in vitro</i>	117
Tabelle 34	Viabilität von Caco-2 Zellen nach Behandlung mit Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen (ultraschallbehandelt) <i>in vitro</i>	119
Tabelle 35	Viabilität von Caco-2 Zellen nach Behandlung mit Lutein und Luteinestern aus Fertigrezepturen <i>in vitro</i>	120
Tabelle 36	Zelluläre Aufnahme von Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen (hochdruckhomogenisiert) <i>in vitro</i>	123
Tabelle 37	Zelluläre Aufnahme von Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen (ultraschallbehandelt) <i>in vitro</i>	124
Tabelle 38	Zelluläre Aufnahme von Lutein und Luteinestern aus Fertigrezepturen und Miniemulsionen (hochdruckhomogenisiert) <i>in vitro</i>	128
Tabelle 39	Fettsäurezusammensetzung [%] ausgewählter Öle.	137
Tabelle 40	Stabilität von Lutein und Luteinestern gegenüber dem angewendeten Emulgierverfahren zur Herstellung von Präemulsionen.	146
Tabelle 41	Stabilität von Lutein und Luteinestern bei Lagerung.	148

Tabelle 42 Veränderungen der Wirkstoffe Lutein und Luteinester nach kurz- und langfristiger Exposition gegenüber physikochemischen Größen.	149
Tabelle 43 Endkonzentrationen von Tween 80, Biozate 1 und MCT-Öl in den Inkubationsmedien der Zellviabilitätsassays <i>in vitro</i>	173
Tabelle A 1 Codierung der Miniemulsionen zur Bestimmung der mittleren Partikelgrößen in wirkstofffreien Miniemulsionen mit verschiedenen Ölen über einen Zeitraum von 6 Monaten.	223
Tabelle A 2 Codierung der Miniemulsionen zur Bestimmung der mittleren Partikelgrößen bei Zusatz von Biozate 1 im Überschuss über einen Zeitraum von 30 Tagen.	223
Tabelle A 3 Codierung der Miniemulsionen zur Bestimmung der mittleren Partikelgrößen mit Zugabe gleichen Teilen an Tween 80 und Biozate 1 (1:1) über einen Zeitraum von 30 Tagen.	223
Tabelle A 4 Codierung der Miniemulsionen zur Bestimmung der mittleren Partikelgrößen und Strömungspotentiale in Miniemulsionen in Abhängigkeit der Zugabe eines Peptisators.	223
Tabelle A 5 Codierung der Miniemulsionen zur Bestimmung der mittleren Partikelgrößen in Abhängigkeit der verwendeten Emulgiertechnik.	224
Tabelle A 6 Codierung der Miniemulsionen zur Bestimmung der mittleren Partikelgrößen in Abhängigkeit der verwendeten Emulgiertechnik.	224
Tabelle A 7 Grundzusammensetzung der Miniemulsionen M1 bis M6.	225
Tabelle A 8 Grundzusammensetzung der Miniemulsionen MO3 bis MO6.	225
Tabelle A 9 Grundzusammensetzung der Fertigrezepturen 122 bis 127.	226
Tabelle A 10 Lösungen für die physikochemische Charakterisierung gegenüber verschiedenen pH-Bedingungen.	227
Tabelle A 11 Synthetische Verdauflüssigkeiten und Lösungen für die Charakterisierung der Resorptionsverfügbarkeit <i>in vitro</i>	227
Tabelle A 12 Medien zur Kultivierung von Caco-2 Zellen.	227
Tabelle A 13 Lösungen für die zellbiologische Methoden.	228
Tabelle A 14 Unabhängige Standardkonzentrationsreihen von Lutein zur Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen.	228
Tabelle A 15 Partikeldurchmesser in wirkstofffreien Miniemulsionen mit verschiedenen Ölen über einen Zeitraum von 6 Monaten.	230
Tabelle A 16 Partikeldurchmesser in wirkstofffreien Miniemulsionen mit Überschuss an Biozate 1 über einen Zeitraum von 30 Tagen.	231
Tabelle A 17 Partikeldurchmesser in wirkstofffreien Miniemulsionen mit Tween 80 und Biozate 1 (1:1) über einen Zeitraum von 30 Tagen.	231
Tabelle A 18 Partikeldurchmesser in Miniemulsionen in Abhängigkeit der Zugabe eines Peptisators.	232

Tabelle A 19 Partikeldurchmesser in Miniemulsionen mit Leitungswasser, wirkstoffbeladenen Ölen und 0,03 g Tween 80/mL in Abhängigkeit der verwendeten Emulgiertechnik.	232
Tabelle A 20 Partikeldurchmesser in den Fertigrezepturen 122 bis 127 über den gesamten Versuchszeitraum.	234
Tabelle A 21 Wirkstoffgehalte in den Ölphasen und Miniemulsionen zur Bestimmung des Einflusses des Emulgiervorgangs auf die Wiederfindung des Wirkstoffes in Miniemulsionen.	235
Tabelle A 22 Lagerstabilität der Wirkstoffe in den Fertigrezepturen und dem kommerziellen Produkt New Focus TM	237
Tabelle A 23 Herstellungsmethoden der Formulierungen in den Inkubationsmedien zur Bestimmung der Viabilität von Caco-2 Zellen <i>in vitro</i>	238
Tabelle A 24 Konzentrationen der Emulgatoren und von MCT-Öl in den Inkubationsmedien zur Bestimmung der Viabilität von Caco-2 Zellen bei Behandlung mit Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen (hochdruckhomogenisiert) <i>in vitro</i>	239
Tabelle A 25 Konzentrationen der Emulgatoren und von MCT-Öl in den Inkubationsmedien zur Bestimmung der Viabilität von Caco-2 Zellen bei Behandlung mit Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen (hochdruckhomogenisiert) <i>in vitro</i>	239
Tabelle A 26 Konzentrationen der Emulgatoren und von MCT-Öl in den Inkubationsmedien zur Bestimmung der Viabilität von Caco-2 Zellen bei Behandlung mit Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen (ultraschallbehandelt) <i>in vitro</i>	240
Tabelle A 27 Konzentrationen der Emulgatoren und Öle in den Inkubationsmedien zur Bestimmung der Viabilität von Caco-2 Zellen bei Behandlung mit Luteinestern aus Fertigrezepturen <i>in vitro</i>	240
Tabelle A 28 Viabilität von Caco-2 Zellen nach Behandlung mit den Wirkstoffen Lutein und Luteinestern <i>in vitro</i>	241
Tabelle A 29 Viabilität von Caco-2 Zellen nach Behandlung mit Tween 80, Biozate 1 und MCT-Öl <i>in vitro</i>	242
Tabelle A 30 Viabilität von Caco-2 Zellen nach Behandlung mit Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen (hochdruckhomogenisiert) <i>in vitro</i>	243

Abkürzungsverzeichnis

ABCA1	ABC-Transportprotein	COS	<i>Cardiovascular Outcome Studie</i>
ADI	<i>acceptable daily intake</i>	DMSO	Dimethylsulfoxid
AGF	<i>artificial gastric fluid</i>	DNA	Desoxyribonukleinsäure
AHS	<i>artificial human saliva</i>	Dp	passive Diffusion
AIF	<i>artificial intestine fluid</i>	DS	<i>dietary supplement</i>
ANS Panel	<i>Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food</i>	EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ApoA1	Apolipoprotein A1	ER	Endoplasmatisches Retikulum
Apocar	Apocarotinoide	EU	Europäische Union
AREDS	<i>Age Related Eye Disease Study</i>	FAD	<i>Food and Drug Administration</i>
ARPE-19	<i>Adult Retinal Pigment Epithelial-19</i> , humanes, retinales Pigmentepithel	FKS	fötales Kälberserum
ATBC	<i>Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Study</i>	GG-Studie	Gutenberg-Gesundheitsstudie
ATP	Adenosintriphosphat	GLUT	Glukosetransporter
AUC	<i>area under the curve</i>	GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
Biozate 1	Biozate [®] 1	HDL	<i>High Density Lipoproteins</i>
BLT-1	<i>Block lipid transport 1</i>	HLB	<i>Hydrophilic-Lipophilic Balance</i>
Caco-2	<i>Cancer coli-2</i> , humane Colonepithelialzellen	i.D.	im Dunkeln
CAL-B	rekombinante Lipase B <i>Candida Antarctica</i>	IAP	Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung
Car	Carotinoide	IGZ	Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau e.V.
CARET	<i>beta-carotene and retinol efficacy trial</i>	IL	Interleukin
CD 36	<i>Cluster Determinat 36</i> , Thrombozytenglykoprotein 4	IL-1 β	<i>Interleukin 1 beta</i>
ChE	Cholesterolesterase	IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
		IVLE	intravenöse Lipidemulsionen
		L/Z	Lutein/Zeaxanthin
		LÄ	Luteinäquivalent
		LCFA	<i>long chain fatty acid</i> , langkettige Fettsäure

LFG Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch	O/W Öl in Wasser
LUTEGA <i>Long Term Effects of Lutein/Zeaxanthin and Omega-3-Supplementation on Optical Density of AMD Patients</i>	PBS phosphatgepufferte Salzlösung
mAIF modifizierter, synthetischer Intestinalsaft	Pen/Strep <i>Penicillium/Streptomycin</i>
MCFA <i>medium chain fatty acid</i> , mittelkettige Fettsäure	PTFE Polytetrafluorethylen, Teflon
MCT <i>medium chain triglycerids</i> , mittelkettige Fettsäuren	PUFA <i>polyunsaturated fatty acid</i> , mehrfach ungesättigte Fettsäure
MEM <i>Minimum Essential Medium</i>	ROI <i>Reactive Oxygen Intermediates</i>
MP Molkenprotein	RPE retinales Pigmentepithel
MPI Molkenproteinisolat	RPE65 <i>Retinol pigment epithelium-specific 65 kDa protein</i>
MPOD optische Dichte des Makulapigments	RP-HPLC <i>Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography</i>
MUFA <i>monounsaturated fatty acid</i> , einfach ungesättigte Fettsäure	rpm <i>round per minutes</i> , Umdrehungen pro Minute
n.a. nicht analysiert	SCF <i>Scientific Committee on Food</i>
n.b. nicht bestimmt	SCFA <i>short chain fatty acid</i> , kurzkettige Fettsäure
n.d. nicht detektierbar	SD Standardabweichung
NADPH reduzierte Form von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat	SFA <i>saturated fatty acid</i> , gesättigte Fettsäure
ND1 Neuroprotectin D1	SGLT 1 Natrium/Glukose Cotransporter
NEA nicht essentielle Aminosäuren	SLAMENGI <i>Species of carotenoid, molecular Linkage, Amount of carotenoids consumed, carotenoid Matrix, Effectors of absorption and bioconversion, Nutrient status of the host, Genetic and hostrelated Interactions</i>
NemV	SP sekundäre Pflanzenstoffe
Nahrungsergänzungsmittelverordnung	SR-B1 Scavengerrezeptor Klasse B Typ 1
Neutralrot 3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazin-hydrochlorid	TG Trockengewicht, Trockengewicht
NFS New Focus TM Spray	TGF <i>Transforming Growth Factor</i>
NF-κB <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>	TNF Tumornekrosefaktor
NPC1L1 <i>Niemann-Pick C1-like protein 1</i>	TrinkwV Trinkwasserverordnung

TSLP Thymus-Stroma-Lymphopoetin

Tween[®] 40 Polyoxyethylen(20)-sorbitan-
monopalmitat

Tween[®] 80 Polyoxyethylen(20)-Sorbitan-
monooleat

UV Ultraviolettstrahlung

VEGF *Vascular Endothelial Growth
Factor*

VIS visueller Bereich

VLDL *Very Low Density Lipoproteins*

W/O Wasser in Öl

ZZulV Zusatzstoff-Zulassungsverordnung

1 EINLEITUNG

Soziale und wissenschaftliche Forschungsinhalte fokussieren sich in den letzten Jahren zunehmend auf das Altern der Menschen. Maßgebend sind dabei Aspekte, wie mit der Alterung verbundene degenerative, ernährungsphysiologische und biochemische Prozesse sowie einhergehende soziale und medizinische Notwendigkeiten im Hinblick auf Prävention und Intervention. Das „Warum?“ ist klar im weltweit zu beobachtenden demografischen Trend zum Bevölkerungswachstum erkennbar. Verbesserungen im Lebensstandard, in der gesundheitlichen Vorsorge und Sorge sowie sinkende Geburtenraten führten und führen in den letzten und nächsten Jahren auch in Deutschland zu einer hohen Bevölkerungsdichte von Menschen in den Altersgruppen über 50 Jahren. Die typische Pyramidenstruktur der Populationsdichten der Bevölkerung verschiebt sich zu einer Zunahme der Population im Bereich der über 60-jährigen Menschen. Der Zuwachs der Bevölkerung ab 67 Jahren beziffert sich dabei von derzeit 15,9 Millionen (2018) auf mindestens 20,4 Millionen Menschen im Jahr 2040 [1]. Dieser demografische Trend fordert den Anspruch an die Wissenschaft und Forschung altersbedingte Einschränkungen in physiologischen Prozessen bzw. Krankheiten methodisch präventiv und akut entgegenzuwirken, um die Lebensqualität mit dem bzw. bis in das hohe Alter zu gewährleisten. Grundlegend besteht ein enger Zusammenhang mit der steigenden Zahl der älteren Bevölkerung und der vermehrten Entstehung von Herz-Kreislauferkrankungen, Typ 2 Diabetes Mellitus, Krebs oder auch Adipositas [2, 3]. Das zunehmende Auftreten von altersbedingten Beschwerden betrifft ebenso spezifische ophthalmologische Erkrankungen, wie Diabetische Retinopathie, Katarakt (Grauer Star) und die altersbedingte Makuladegeneration [4]. Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) stellt dabei eine der häufigsten Ursachen für irreversibles Erblinden in Deutschland dar. Bereits jetzt sind in Deutschland mehr als 270.000 Menschen der über 50-jährigen von AMD betroffen [5]. Global wird im Jahr 2040 bei schätzungsweise 288 Millionen Menschen eine AMD auftreten [6]. Die Therapie beschränkt sich auf das Aufhalten der Erkrankung. Eine Heilung ist bisher nicht möglich. Ansatzpunkte bieten gegebenenfalls präventive Maßnahmen, welche im Kontext mit dem Altern eine weitere Forschung und Aufklärung notwendig machen. Neben ernährungsphysiologischen sowie physikalischen Empfehlungen und regelmäßigen Vorsorgeuntersuchungen stellt sich die Frage, inwiefern es möglich ist durch Supplementierung im Bereich der Ernährung degenerative Stoffwechselprozesse und ihre Folgen zu stoppen, zu verlangsamen bzw. zu beeinflussen. Speziell in der Prävention der AMD

bieten bioaktive Moleküle aus der Pflanzenwelt ein mögliches Potential. Im Mittelpunkt stehen dabei u.a. die positiven gesundheitsfördernden Eigenschaften des sekundären Pflanzenstoffes Lutein. Eine gezielte Supplementierung mit Lutein zum Erhalt der Augengesundheit und Sehqualität wird vielfach diskutiert [7, 8].

1.1 ALTERN UND ALTERSBEDINGTE ERKRANKUNGEN

Genpool, Lebensweise und Umweltbedingungen beeinflussen Quantität und Qualität des menschlichen Lebens [9-12]. Regulative, biochemische Prozesse sind die Grundlage für das Aufrechterhalten einer Homöostase im Organismus, welche ihm angepasst an äußere und innere Faktoren ein Über-/Leben, und damit im weiteren Sinne den Fortbestand der eigenen Spezies ermöglichen soll. Die Balance wird durch das ständige Zusammenspiel einfacher und komplexer Prozesse auf zellulärer Ebene, aber auch durch Inter- bzw. Reaktionen auf externe Reize aus Umwelt und Lebensumstände/-stil gewährleistet. Ernüchternd ist dabei jedoch das Wissen, dass diese Regulationsmechanismen unumkehrbar, unaufhaltsam und erschöpfend wirksam sind. Altern steht in enger Verbindung mit der irreversiblen Schädigung bzw. dem Abbau von wichtigen Bausteinen des Organismus, wie z.B. DNA und Proteinen, einem steigenden Ungleichgewicht in der Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies, sukzessiver mitochondrialen Dysfunktion sowie Dysregulation einer Vielzahl von zellulären Signalprozessen z.B. endokriner Funktionalitäten, cytokinvermittelter Prozesse [13, 14].

Phänotypisch lassen sich altersbedingte Veränderungen ebenfalls definieren. Auch hier liegt der Ursprung in Modifikationen von biochemischen Vorgängen im Organismus im Zusammenspiel mit genetischen und umweltbedingten Faktoren. Markant sichtbar erscheinen dabei z.B. Veränderungen der Haut (Falten, Erschlaffung, Pigmentfleckenbildung, Depigmentierung des Haares), welche als Folge chronologischen Alterns bzw. umweltinduzierten Photoageing ausgelöst durch die Exposition der Haut mit UVA- und UVB-Strahlung auftreten [15]. Es wird ein Zusammenhang der Hautalterung mit der vermehrten Bildung endogener reaktiver Sauerstoffspezies, oxidativer, destruktiver, mitochondrialer Prozesse und der zellulären Seneszenz diskutiert [16]. Diese führen u.a. zur Veränderung von Hautstrukturen, im engeren Sinne zur Reduktion von strukturgebenden Bestandteilen wie Elastin und Kollagen [15]. Eine weitere Erscheinung mit dem Alterungsprozess ist die Veränderung des Körperbaus, wobei ein Umbau in der Körperfettverteilung eine Verringerung der Muskelmasse und der Knochendichte zu verzeichnen ist. Während es zu einer Abnahme von subkutanen Fettspeichern kommt, nimmt die viszerale Fettmasse zu [13]. Als Ursache werden ein verringerter Energieumsatz und eine

gleichzeitig auftretende erhöhte Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen angenommen, welche zu einer Erhöhung der subkutanen Körperfettmasse beitragen. Außerdem besteht die Annahme, dass eine Umverteilung der Körperfettmasse zu Lasten der fettfreien Körperfettmasse erfolgt [17]. Allgemein wird kontrovers diskutiert, inwiefern Veränderungen in der Körperzusammensetzung Ursache für metabolische Modifikationen und Oxidationsprozesse im alternden Organismus sind oder daraus resultieren [18].

Die im Alterungsprozess ausgelösten Dysbalancen von relevanten, reaktiven bzw. deaktivierenden Molekülen sowie molekularen biochemischen Prozessen im Organismus können eine Modulation des Immunsystems in einem Maße hervorrufen, welche über das Altern hinaus altersbedingte Erkrankungen entstehen lässt. Die dabei ausgelösten Entzündungsprozesse basieren u.a. auf einem negativen zellulären Redoxzustand, einer erhöhten Menge an seneszenten Zellen sowie einer verringerten Autophagie. Die Regulation zwischen pro- und antiinflammatorischen Reaktionen ist nicht mehr gewährleistet (Abbildung 1). Zu diesen Erkrankungen zählen Herz-Kreislauferkrankungen, das Metabolische Syndrom, Diabetes sowie neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer, Morbus Parkinson und Multiple Sklerose.

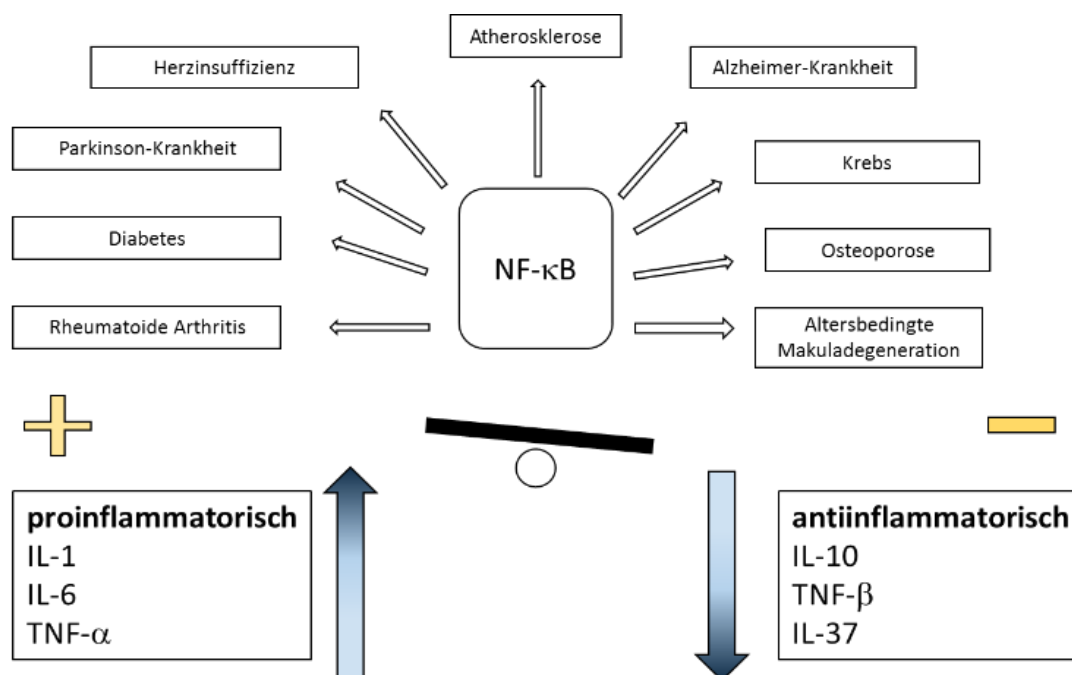


Abbildung 1 „Inflammaging“ Dysregulation von Cytokinen und NF-κB-Aktivierung.

Dysregulationen zu Gunsten der proinflammatorischen Cytokine sowie die Aktivierung von NF-κB und IL-1β-induzierte inflammatorische Cytokinkaskaden haben einen entscheidenden Einfluss auf das Immunsystem und die Entstehung von degenerativen Erkrankungen im Alter [9].

1.2 ALTERSBEDINGTE MAKULADEGENERATION (AMD)

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist eine degenerative Erkrankung im retinalen Pigmentepithel der *Fovea centralis* (Sehgrube) der Retina (Netzhaut) des Auges. An diesem sogenannten „Punkt des schärfsten Sehens“ ist ebenso die Makula (*Makula lutea* lat. gelber Fleck) lokalisiert (Abbildung 2). Die pathologische Entwicklung des dortigen retinalen Pigmentepithels (RPE) kann zu Seh-einschränkungen bis hin zur völligen Blindheit führen. Diskutiert wird ein Zusammenhang dieser Pathologie mit der Degeneration der Makula aufgrund der Abnahme der dort akkumulierten Xanthophylle insbesondere Lutein. Diese bieten basal eine schützende Funktion für das RPE und die Photorezeptorzellen gegenüber dem schädigenden Einfluss von Licht und Oxidationsvorgängen.

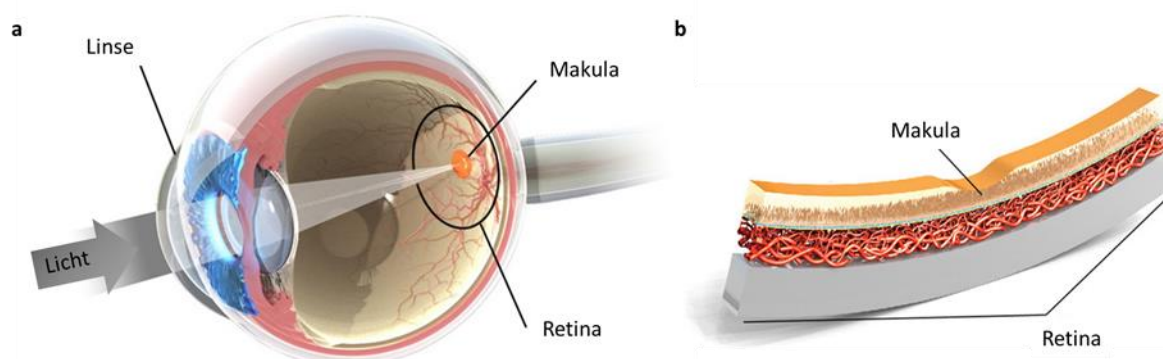


Abbildung 2 Lage des retinalen Makulapigments im gesunden, menschlichen Auge. Adaptiert von [19].

Die Makula ist in der zentralen Region der Retina lokalisiert (*Fovea centralis*). Diese Region weist die höchste und dichteste Population an Photorezeptorzellen auf. Hier liegt der Ursprung zur Fähigkeit des zentralen, scharfen Sehens.

In der Entwicklung einer AMD unterscheidet man im Allgemeinen zwei Formen. Die trockene Form, welche auch als frühe AMD bezeichnet wird, und die feuchte Form, welche ebenso als späte AMD definiert wird. Die Wahrscheinlichkeit eine AMD zu entwickeln steigt mit dem Alter [20]. Trotz der weiten Verbreitung der Erkrankung, insbesondere auch in Deutschland, ist die Krankheit noch wenig fokussiert in den Mittelpunkt von Bevölkerung und Wissenschaft gerückt. Insbesondere deutsche epidemiologische Studien, welche Messdaten hinsichtlich Prävalenzen und Inzidenzen geben könnten, gibt es nur wenige. Prävalenzen und Inzidenzen sind ein wichtiges Maß für die Bedeutung und die Entstehungswahrscheinlichkeit von Erkrankungen. Dabei gibt die Prävalenz an, wie häufig eine Erkrankung in der Bevölkerung innerhalb eines Untersuchungszeitraums vorkommt. Die Inzidenz zeigt, wie viele Personen innerhalb eines definierten Betrachtungszeitraums neu erkranken werden. Epidemiologische Studien ma-

chen es möglich Aussagen über diese beiden Größen treffen zu können. Es werden damit Basisdaten gewonnen, die die Notwendigkeit von Forschung hinsichtlich Diagnostik, Prävention und Behandlungen von Erkrankungen begründen. Die Prävalenz und die Inzidenz der AMD wurden weltweit in verschiedensten Studien belegt. In der Rotterdam-Studie konnte eine Prävalenz von 17,1% für die frühe AMD [21] und von 1,7% für die späte AMD beziffert werden [22]. Eine der wenigen deutschen Studien, die Gutenberg-Gesundheitsstudie (GG-Studie), zeigte eine Prävalenz der frühen AMD von 11,9% bzw. der späten AMD von 0,2% [23]. Inzidenzen können z.B. aus der Rotterdam-Studie bezogen werden. Die Inzidenz für die frühe AMD über einen Zeitraum von 5 Jahren betrug hier 13,0%, für die späte AMD 1,7% [24].

Die Entstehung der AMD beginnt häufig zunächst über das frühe Stadium, der trockenen AMD. Hier kommt es zur Drusenbildung zwischen dem RPE und der *Choroidea* (Aderhaut) des Auges (Abbildung 3). Der Bereich wird auch als Bruch-Membran bezeichnet. Die Drusen sind gelbe Ablagerungen, welche durch den unzureichenden Abtransport von Makromolekülen wie z. B. Proteinen und Lipiden aus dem RPE in das Blutgefäßsystem entstehen. Es wird angenommen, dass mit Zunahme des Alters die Permeabilität der Bruch-Membran für Makromoleküle immer mehr abnimmt, was die vermehrte Zunahme der Ablagerungen erklärt [25]. Der Anstieg der Anzahl und die vermehrte Komplexität der Drusen können im weiteren Krankheitsverlauf bis zum Einwachsen dieser in das RPE und dort zur Ausbildung einer Atrophie und Degeneration führen. Allgemein kommt es zur Störung der Aufnahme und Verarbeitung von Lichtreizen in den Photorezeptorzellen im RPE. Die langsam auftretenden Sehstörungen sind zunächst nur geringfügig [26]. Teilweise werden graue Schatten im zentralen Gesichtsfeld bemerkt. Ist nur ein Auge betroffen, wird die Einschränkung meist durch das gesunde Auge kompensiert. Dieser Sachverhalt erschwert wiederum eine frühzeitige Diagnostik. Die regelmäßige Kontrolle der Augen durch einen Arzt ist ab dem 35. Lebensjahr empfehlenswert. Bereits in diesem Alter konnten in der GG-Studie Symptome der frühen AMD festgestellt werden. Die Prävalenz für die frühe AMD in der Altersgruppe 35 - 44 Jahre betrug in dieser Studie 3,8% [23]. Derzeit gibt es keine Behandlungsmöglichkeiten der frühen AMD, weshalb eine Prävention, gesunder Lebensstil und Ernährung von großer Bedeutung sind. Zur Verbesserung der Seheinschränkungen werden vergrößernde Sehhilfen eingesetzt.

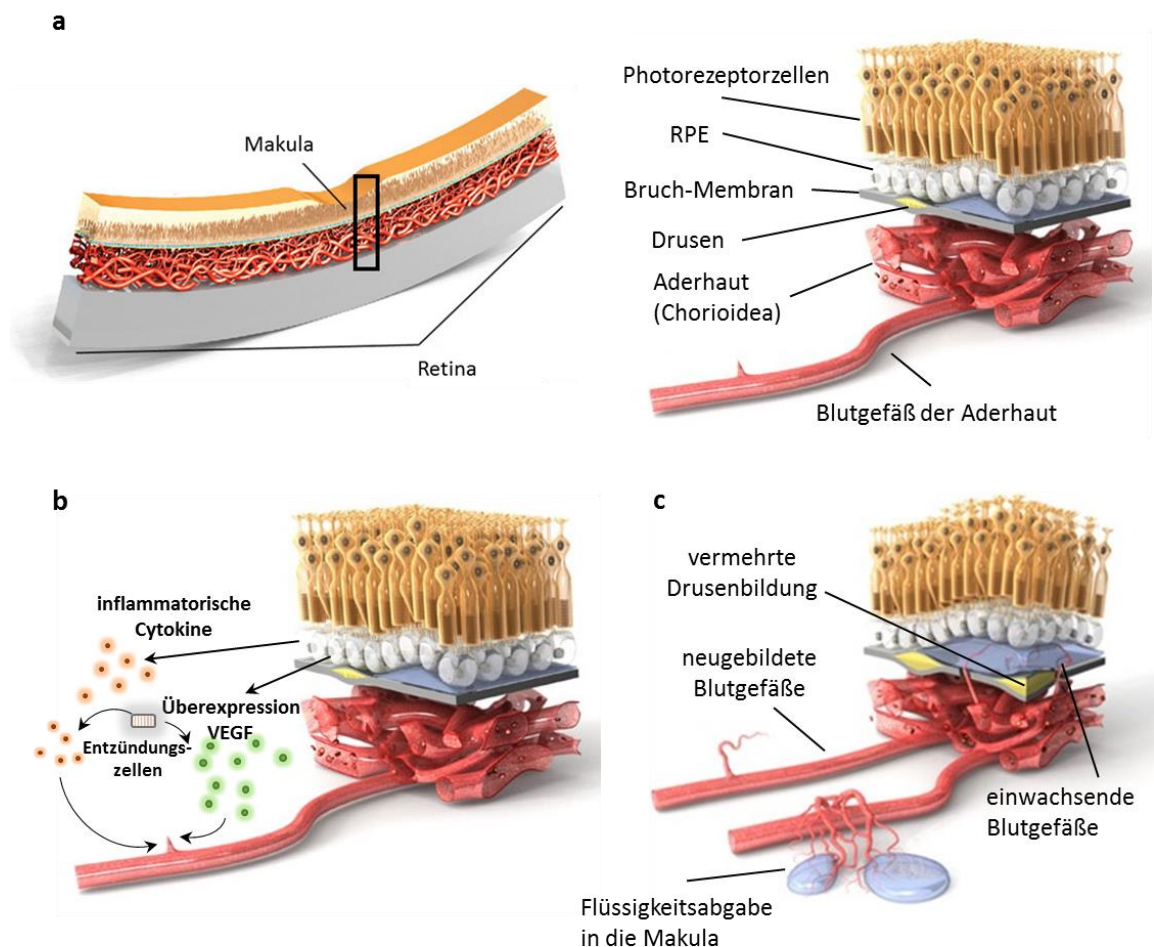


Abbildung 3 Pathologie der altersbedingten Makuladegeneration. Adaptiert von [19].

a) Schematischer Aufbau der gesunden Retina. b) Die pathologische Ausbildung von Drusen in der Bruch-Membran der Retina führt zur Rekrutierung von Entzündungszellen in das Makulapigment, welche wiederum die Freigabe von Cytokinen und dem Wachstumsfaktor VEGF (*Vascular Epithelial Growth Factor*) stimulieren. c) Als Folge der Stimulation kommt es zur Ausprägung einer Angiogenese. Dabei wachsen Blutgefäße in die Bruch-Membran, bis in die Schicht der Photorezeptoren ein (choroidale Neovaskularisation). Flüssigkeitsabgabe und Einbluten in das Retinagewebe führen zur Degeneration der Photorezeptoren und damit zur weiteren Verschlechterung der Sehfähigkeit. Die Ausbildung von Narbengewebe bzw. das Ablösen der Retina können die Folge sein. Dies kann wiederum zum irreversiblen Erblinden führen.

Im weiteren Verlauf kann aus einer trockenen AMD die schwerwiegendere Form, die feuchte oder späte AMD entstehen. Dies betrifft bis zu 15,0% der Patienten mit früher AMD. Das Vorschreiten wird dabei begünstigt durch die vermehrte Bildung und Vergrößerung der Drusen, Zunahme der Dicke der Bruch-Membran und dem reduzierten metabolischen Austausch zwischen RPE und Blutgefäßensystem u.a. aufgrund der voranschreitenden räumlichen Trennung [25, 27]. Es kommt zur Ischämie mit einhergehender Hypoxie. Dies wiederum fördert die Bildung des Wachstumsfaktors VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) [27]. Als Folge kommt es zum Einwachsen von Blutgefäßen (choroidale Neovaskulation) durch die Bruch-

Membran in das RPE verbunden mit Abgabe von Flüssigkeiten, weiteren Entzündungsmediatoren und Enzymen bis hin zu Blutungen [28]. Der Verlauf der Erkrankung ist sehr viel schneller als bei der frühen AMD. Eine Nichtbehandlung kann zum vermehrten Einbluten in das RPE bzw. die Retina einhergehend mit Narbenbildung, bis hin zum Ablösen der Retina führen. Irreversibles Erblinden ist die Folge.

Eine Vielzahl von Behandlungsmöglichkeiten der späten AMD sind bereits vorhanden, welche den Krankheitsverlauf teilweise stoppen bzw. verlangsamen, jedoch ist eine vollständige Heilung nicht möglich. Neben einer eingehenden Aufklärung über Krankheitsverlauf, möglichen Ernährungsempfehlungen sowie Einweisung in Selbstkontrollen des zentralen Gesichtsfeldes bei ausreichendem Sehvermögen (Amsler-Karte), kommen Sehhilfen, elektronische Vorlesegeräte bzw. Computer mit Sprachausgaben als Therapiemaßnahmen der AMD in Frage [29]. In den 1980er Jahren erfolgten erste Behandlungen mittels Laserphotokoagulation. Aufgrund der hohen Gefahr der Zerstörung von Photorezeptorzellen wird diese Behandlung generell nicht mehr angewendet [30, 31]. Eine weitere Behandlungsmöglichkeit bietet die im Jahr 2000 entwickelte photodynamische Therapie. Hier wird der photoaktive Stoff Verteporfin intravenös injiziert und gelangt in das Auge [32]. Eine Bestrahlung mit nichtthermischen Laserlicht führt zur Aktivierung des Farbstoffs. Dieser löst wiederum biochemische Vorgänge im RPE aus, die zur Schädigung des endothelialen Gewebes, zur Bildung von Blutgerinnseln und zum Verschluss krankhafter Blutgefäße führen [32]. Die derzeit zur Anwendung kommende und sehr effektive Behandlung ist die antiangiogene Therapie. Dabei werden in regelmäßigen Abständen Inhibitoren des VEGF in das Auge injiziert, welche sterisch das Andocken von VEGF an seine Rezeptoren verhindern [28]. Die Bildung des Wachstumsfaktors wird eingeschränkt sowie ein weiteres Einwachsen von Gefäßen verhindert. Bereits vorhandene Ödeme werden nicht mehr gefördert und trocknen aus. Angewendete VEGF-Inhibitoren sind Macugen (Pegaptanib), Lucentis (Ranibizumab) und Avastin (Bevacizumab). Risiken dieser Therapien sind z.B. Augenentzündungen, Erhöhung des Augeninnendrucks, Ablagerungen im Glaskörper, Augenirritationen und Bindehautentzündungen [28].

Vielfach werden die Ursachen für die AMD diskutiert und eine vollständige Aufklärung der komplexen Entstehungsmechanismen ist bis heute nicht vorhanden. Durch epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass mit dem Alter das Risiko eine AMD zu entwickeln immer weiter steigt (Tabelle 1).

Tabelle 1 Anstieg der Prävalenz der altersbedingten Makuladegeneration ab dem 65. Lebensjahr in ausgewählten Studien [33, 34].

	Prävalenz [%] in der Altersgruppe		
	65+	75+	85+
<i>Rotterdam Study</i> [33]	2,2	4,7	11,8
<i>Baltimore Eye Study</i> [34]	2,6	4,8	13,1

Erste Untersuchungen zeigten zudem ein erhöhtes Risiko für Frauen [35], dies konnte z.B. die GG-Studie nicht bestätigen [23]. Verschiedene weitere Risikofaktoren eine AMD zu entwickeln, werden angenommen. Dazu zählen genetische Prädisposition, kaukasische Abstammung, Bluthochdruck [36-38], Rauchen [39] und die Exposition zum Sonnenlicht [40]. Die Diagnostik für deutsche Augenärzte ist u.a. in deren Leitlinie Nr. 21 des Berufsverbands der Augenärzte Deutschlands e.V. beschrieben. Zusammenfassend beinhaltet diese die Prüfung der Anamnese, einfache Sehtests (Amsler-Karte, Visuskontrolle, Kontrastsehen), Untersuchungen des Augenhintergrundes (Funduskopie), Darstellung der Netzhautgefäße (Fluoreszenzangiographie) und der Netzhautschichten (optische Kohärenztomographie). Bei Verdacht auf andere Erkrankungen können sich weitere diagnostische Mittel anschließen, z.B. Augeninnendruckmessung bei Glaukomverdacht [41]. Innerhalb der Diagnostik der AMD kann durch Anwendung eines Modells zur klinischen Einstufung des Phänotyps der Retina eine Aussage über das Stadium der AMD-Erkrankung getroffen und ein möglicher Therapieansatz entwickelt werden (Tabelle 2).

Tabelle 2 Klinisches Modell zur Einstufung des Stadiums der AMD nach dem AMD Classification Committee der Beckman Initiative für Makula-Forschung.

AMD = altersbedingte Makuladegeneration, *AMD-Pigmentveränderungen = jede definitive Hyper- oder Hypopigmentierung assoziiert mit mittleren oder großen Drusen, aber nicht assoziiert mit anderen bekannten Netzhauterkrankungen [42, 43]

Kategorie	Definition (bewertet innerhalb 2 Papillendurchmesser um die <i>Fovea</i> in einem von beiden Augen)
0 keine Altersveränderungen	keine Drusen, keine AMD-Pigmentveränderungen*
1 normale Altersveränderungen	minimale kleine Drusen $\leq 63 \mu\text{m}$, keine AMD-Pigmentveränderungen*
2 frühe AMD	mittelgroße Drusen $> 63 \mu\text{m}$ und $\leq 125 \mu\text{m}$, keine AMD-Pigmentveränderungen*
3 intermediäre AMD	große Drusen $> 125 \mu\text{m}$ und/oder jegliche AMD-Pigmentveränderungen*
4 späte AMD	neovasculäre AMD geographische Atrophie bis in die Fovea, neovasculäre AMD

Um den postulierten steigenden Erkrankungszahlen entgegenzuwirken, wurden u.a. in den Vereinigten Staaten von Amerika Langzeitstudien mit präventiven Ernährungsmaßnahmen durchgeführt. Neben möglichen Informationen über Risikofaktoren, Krankheitsverlauf, Prävalenz und Inzidenz können diese Studien über mögliche präventive Maßnahmen zu Lebensstil, Ernährungsweise, Supplementierung und Vermeiden des Rauchens Aufschluss geben. Zwei bedeutende Studien waren dabei die AREDS I und II (*Age Related Eye Disease Study*). Die bis 2001 durchgeführte AREDS I-Studie konnte zeigen, dass bei Supplementierung mit der sogenannten AREDS I-Formulierung (Vitamin C, Vitamin E, β -Carotin, Zink, Kupfer) die Wahrscheinlichkeit eines Fortschreitens der späten AMD um 25% und die Wahrscheinlichkeit eines Sehverlustes um 19% verringert wird. Die Entwicklung von Katarakten wurde nicht beeinflusst. Bei der weiterführenden Studie AREDS II wurde 2013 die Formulierung hinsichtlich der Zugabe von Lutein/Zeaxanthin (L/Z) statt β -Carotin verändert. Es erfolgte ein zusätzlicher Einsatz von Omega-3-Fettsäuren (Eicosapentaen-, Docosahexaensäure) sowie einer Verringerung der Zinkmenge. Der negative Effekt des vermehrten Auftretens von Lungenkrebs bei ehemaligen Rauchern nach erhöhter Gabe von β -Carotin konnte mit dieser Formulierung verhindert werden [7]. Die Gabe von L/Z führte jedoch nicht zur weiteren Reduktion des Fortschreitens von AMD, sondern es wurden ähnliche Einflüsse wie bei Gabe von β -Carotin festgestellt. Die alleinige Supplementierung von Omega-3-Fettsäuren hatte keinen Effekt auf das Fortschreiten der AMD. Eine deutsche Studie zum Einfluss von Lutein als Nahrungsergänzungsmittel auf die Ausprägung von AMD ist die sog. LUTEGA-Studie, welche 2013 von der Universität Jena durchgeführt wurde. Hierbei wurde der Effekt der täglichen Supplementierung einer Kombination von Lutein, Zeaxanthin und Omega-3-Fettsäuren auf die Makulapigmentdichte (MPOD, optische Dichte des Makulapigments) von Patienten mit später AMD untersucht. Die Daten der Studie zeigten einen Anstieg der MPOD, eine leichte Verbesserung der Sehleistung der Patienten und teilweise die Rückbildung von Drusen im RPE. Die Daten empfehlen die Gabe von Formulierungen mit Lutein, um die späte AMD in ihrer Progression einzugrenzen [8].

1.3 SEKUNDÄRE PFLANZENSTOFFE

Essentielle Bausteine des pflanzlichen Lebens sind die primären Metaboliten, wie Kohlenhydrate, Proteine und Fette. Neben diesen synthetisieren Pflanzen in spezifischen Zellkompartimenten außerhalb des primären Stoffwechsels Minorsubstanzen, wie z.B. die sog. sekundären Pflanzenstoffe (SP). SPs sind für die Pflanze grundsätzlich nicht (über)lebensnotwendig, ermöglichen ihr jedoch eine Interaktion mit der Umwelt bzw. eine Reaktion auf verschiedene Umweltfaktoren. Die Produktion von SPs durch die Pflanze hat für diese einen vielfältigen Nutzen. Sie können zum einen als Verteidigung dienen, aber auch mikrobiellen Befall verhindern oder diesem entgegenwirken. Aroma-, Duft- und Farbstoffe, die als SPs von Pflanzen synthetisiert werden, haben eine Anlockfunktion für die Pollenübertragung von Insekten oder auch von samenverbreitenden Tieren. Weiterhin wird ihre mögliche Funktion als Wachstumsregulatoren diskutiert [44]. In ersten frühen Untersuchungen standen die bis zu 100.000 Verbindungen aufgrund ihrer möglichen toxischen Eigenschaften im Fokus der Forschung. Unerwünschte Effekte von sekundären Pflanzenstoffen sind vielfältig zu beobachten. So wirken Glucoinosilate goitrogen, Polyphenole hemmen die Mineralstoffabsorption aus Lebensmittelmatrices, Saponine induzieren hämolytische Effekte und erhöhen die Darmpermeabilität. Heute werden zahlreiche SPs hinsichtlich ihrer positiven teils pharmakologischen Wirkungen bzw. ihrer gesundheitsfördernden Eigenschaften für den menschlichen Organismus untersucht sowie gezielt aus diesen Gründen in der Lebensmittel- und Nahrungsergänzungsmittelindustrie eingesetzt. Dabei bestehen Herausforderungen darin, diese Inhaltsstoffe effektiv aus Pflanzenquellen zu isolieren und gezielt in Applikationen einzubringen. Das Entwickeln von funktionellen Lebensmitteln bietet die Möglichkeit gesundheitsfördernde Substanzen in einer großen Bandbreite in Produkten in neuen Darreichungsformen zu integrieren. Darin resultieren vermehrte Forschungsarbeiten zu neuartigen Inhaltsstoffen in Lebensmittelmatrices. Es besteht der Bedarf an Untersuchungen zur Stabilität, Bioverfügbarkeit *in vitro/in vivo* und statistischer Absicherung positiver humaner Wirkungen *in vivo*, um Kombinationen von SPs in Nahrungsergänzungsmitteln unter präventiven bzw. generativen Aspekten einsetzen zu können.

Die Unterscheidung der sekundären Pflanzenstoffe kann in Abhängigkeit ihrer Synthese und chemischen Grundstruktur in drei verschiedene Gruppen erfolgen: isoprenoide-, phenolische- und stickstoffhaltige Verbindungen. Isoprenoide- auch Terpene genannt- werden in Anlehnung an den Acetat-Mevalonat-Weg über Zwischenstufen aus Mevalonsäure bzw. 3-Phosphoglycerat gebildet. Je nach Substitutionsgrad werden sie als Mono-, Sesqui-, Di- oder Triterpene bezeichnet. Sie dienen der Pflanze zur Abwehr von Fraßfeinden. Wichtige Vertreter sind u.a.

ätherische Öle wie auch Carotinoide. Den phenolischen Verbindungen sind die Anthocyane, Flavonoide, Lignine, Tannine und Phytoalexine zuzuordnen. In höheren Pflanzen werden diese über Endprodukte des Shikimisäurewegs (aromatische Aminosäuren, wie Phenylalanin oder Tryptophan) durch u.a. enzymatische Aktivität (Phenylalanin-Ammonium-Lyase) gebildet. Phenole dienen der Pflanze als farbliche Anreize bzw. der Abwehr, können aber auch toxisches Potential aufweisen. Eine eher negativ belastete Gruppe sekundärer Pflanzenstoffe sind die stickstoffhaltigen Verbindungen, zu denen Alkaloide, cyanogene Glykoside, Glykosinolate und nichtproteinogene Aminosäure zählen. Sie entstehen im sekundären Metabolismus aus Abbau- und Zwischenprodukten des Aminosäurestoffwechsels der Pflanzen.

1.3.1 Carotinoide

Carotinoide sind den Isoprenoiden zuzuordnen. Sie sind eine Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe mit einer hohen Vielfalt in Struktur, physikalischen sowie chemischen Eigenschaften und daraus resultierenden Funktionen. Aktuell sind mehr als 1.100 verschiedene Carotinoide von annähernd 700 verschiedenen Organismen bekannt [45]. Die Synthese der roten, gelben und orangefarbenen Pigmente erfolgt hauptsächlich in Pflanzen, aber auch in Bakterien. Ihre Verbreitung ist jedoch ubiquitär, nicht nur in pflanzlichen Bestandteilen und Mikroorganismen, sondern auch in tierischen und humanen Lebewesen [46]. Karrer et al. konnten 1930 erstmals die Carotinoidstruktur von Lycopin und β -Carotin nachweisen und waren damit Wegbereiter für die Aufklärung einer Vielzahl von Carotinoiden hinsichtlich Struktur und Funktion [47]. Die aus Isoprenoidvorstufen hervorgehende Grundstruktur der Carotinoide ist ein lineares, konjugiertes Doppelbindungssystem aus Kohlenstoffatomen (hauptsächlich C_{40} - Kohlenstoffgerüst), welches durch Modifikationen, wie Zyklisierung an einem oder beiden Enden (Ionon-Ringe), Variabilität im Hydrierungsgrad und/oder Addition sauerstoffhaltiger, funktioneller Gruppen die Biosynthese verschiedenster Carotinoide zulässt [48]. Die chemische Struktur der Carotinoide wird über die Nomenklatur der Carotinoide der IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) beschrieben [49]. Strukturelle Gegebenheiten ermöglichen den Carotinoiden u.a. das Agieren als Antioxidant über chemische Reaktionen mit oxidierenden Substanzen, verleihen ihnen lipophile, lichtabsorbierende und photochemische Eigenschaften und sind Ursprung für ihre Farb-, Duft- und Geschmacksgebung. Carotinoide werden in zwei Hauptgruppen unterteilt: die Carotine - azyklische und zyklische Hydroxycarbonyl- und sauerstoffhaltige Xanthophylle [50]. Wichtige Vertreter der Carotine sind Lycopin, β -Carotin und

α -Carotin. Zu den Xanthophyllen zählen neben Lutein und Zeaxanthin, auch Astaxanthin (Carotinoid in Lachs und Hummer) sowie Fucoxanthin (Farbstoff in Braunalgen). Durch den Einbau von Sauerstoffgruppen sind die Xanthophylle im Gegensatz zu den Carotinen weniger lipophil, wodurch ihre Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln beeinflusst wird.

1.4 LUTEIN

1.4.1 Biosynthese, chemische Struktur und Vorkommen von Lutein und Luteinestern

Die Biosynthese der Carotinoide hat ihre Grundlage bereits im Mevalonatweg. Hier entsteht über mehrere enzymatische Schritte und über Energieeintrag in Form von NADPH und ATP das Isopentenylidiphosphat. Durch weitere Isomerisierungs- und Kondensierungsreaktionen werden Geranyldiphosphatmoleküle gebildet aus denen durch das Enzym Phytoensynthase das farblose Phytoen synthetisiert wird. Dieser Schritt ist der Beginn der Biosynthese von Carotinen und wird durch die Anwesenheit von Geranyldiphosphatmolekülen reguliert bzw. begrenzt. Über weitere chemische Reaktionen entsteht zunächst all-trans- ζ -Carotin sowie folgend all-trans-Lycopin. Im weiteren Verlauf führen verschiedene Zyklisierungen von Lycopin zu den zwei Hauptgruppen zyklischer Carotinoide: β,β -Carotinoide und β,ϵ -Carotinoide. Durch die Aktivität verschiedener Cyclasen werden die jeweiligen sogenannten β -Iononringe oder ϵ -Iononringe synthetisiert [50]. Mit den vielfältig aktiven bzw. regulierten Enzymen im Biosyntheseweg der Carotinoide ist u.a. die entsprechende Vielzahl von Konfigurationen und somit die Vielfältigkeit der Carotinoide erklärbar. Das all-trans-Lutein (3R, 3'R- β,ϵ -carotin-3,3'-diol, Lutein) leitet sich innerhalb dieser Biosynthese vom α -Carotin ab, welches einen β - und ϵ -Iononring aufweist. Durch Hydroxylierung der Iononringe unter Beteiligung von Cytochrom P450 Enzymen (CYP97A3, CYP97C1) entsteht aus α -Carotin über mehrere Schritte Lutein [50, 51]. Seine Struktur klassifiziert Lutein zu einem Xanthophyll bzw. oxygenierten Carotinoid [52]. Als freies Lutein wird das unveresterte Lutein ohne Fettsäuren bezeichnet. In Pflanzen kommt Lutein hauptsächlich in seinen Esterformen vor. Hierbei können die freien Hydroxygruppen an den Iononringen des Luteins als Mono- oder Diester mit Fettsäuren verestert sein (Abbildung 4). Die Synthese von Lutein wie auch die anderer Carotinoide erfolgt ausschließlich in Pflanzen mit Ausnahme einiger Mikroorganismen. Der Mensch bzw. tierische Lebewesen nehmen diese mit der Nahrung auf. Lutein bzw. Luteinester findet man als lipophile Pigmentfarbstoffe in Früchten, Gemüse, Blättern und Blüten [53-56]. Luteinreiche Quellen sind u.a. Mais, Eigelb und dunkelgrünes Blattgemüse sowie Kohlgemüse, aber auch Algen [57, 58].

Die wichtigste Quelle für die veresterten Formen des Luteins stellen die Blütenblätter verschiedener Arten der Studentenblume (*Tagetes* oder Marigold) dar [59]. Unter der Kennzeichnung E 161b ist Lutein in Lebensmitteln als ein in der EU zugelassener Lebensmittelfarbstoff zu finden. Darüber hinaus wird es als Supplement in der Nahrungsergänzungsmittelindustrie eingesetzt.

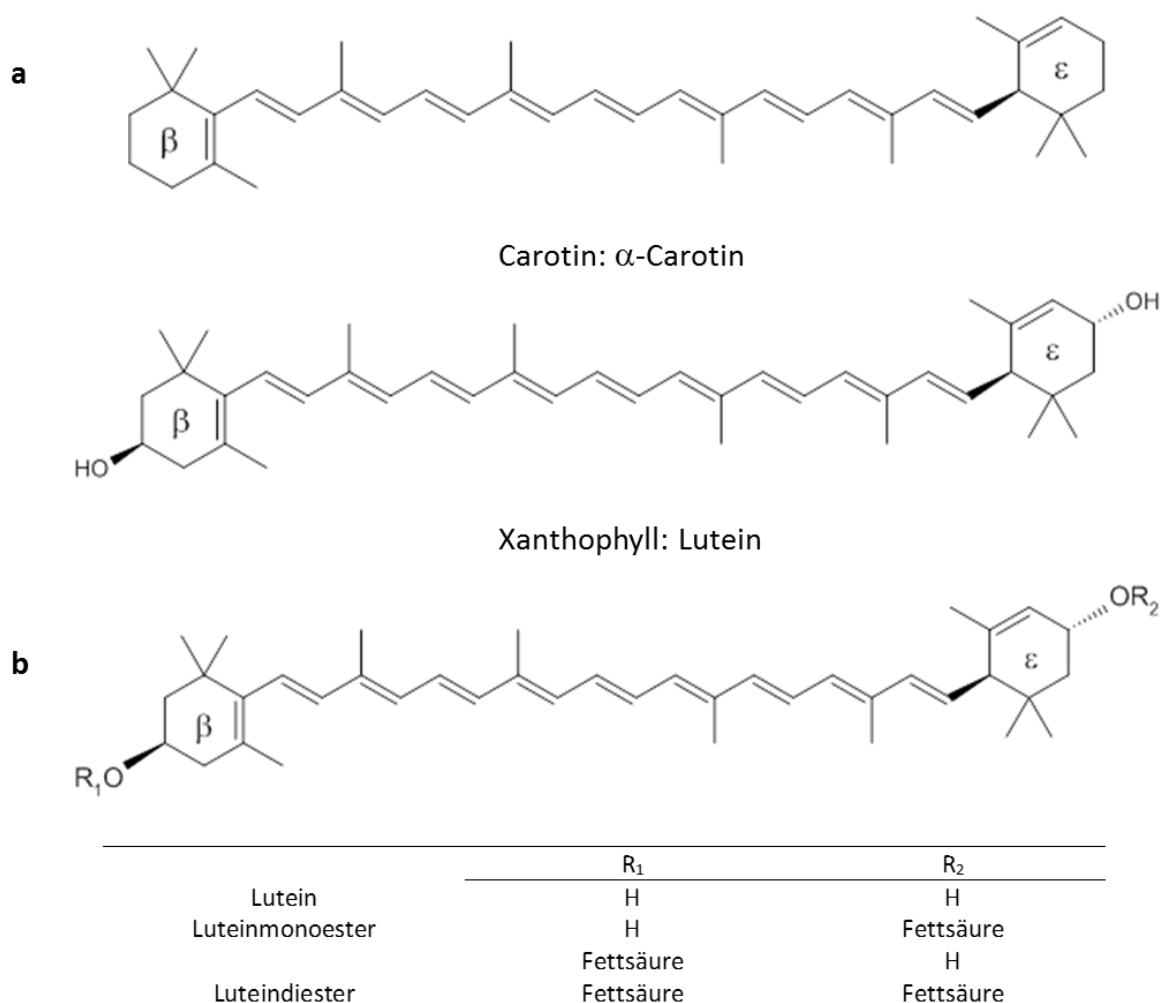


Abbildung 4 Chemische Strukturen von Carotinoiden.

Dargestellt sind die chemischen Strukturen a) wichtiger Vertreter der Carotine und Xanthophylle sowie b) von freiem Lutein und Luteinestern.

1.4.2 Bedeutung in der Pflanze

Lutein hat wichtige Funktionen im Photosystem der Pflanze und ist in den Plastidmembranen sowie in der Thylakoidmembran von höheren Pflanzen lokalisiert [50]. Dort akkumuliert es im Reaktionszentrum des Lichtsammelkomplexes, in der Antenna. Hier finden sich neben Lutein

außerdem Violaxanthin, Neoxanthin sowie Chlorophyll (α und β) [60]. Die Funktion von Lutein ergibt sich dort aus seiner Struktur, dem Doppelbindungssystem, welches es ihm ermöglicht Licht zu absorbieren und die Energie an das Reaktionszentrum von Chloroplasten weiterzugeben. Außerdem bietet das antioxidative Potential von Lutein den Schutz des Photosystems vor oxidativen Schädigungen [61].

1.4.3 Bedeutung für den humanen Organismus

1.4.3.1 *Metabolismus*

Lutein kann *de novo* nicht vom menschlichen Organismus gebildet werden. Die Aufnahme und Verteilung in die Gewebe und Organe erfolgt über Lebensmittel. Mit der pflanzlichen Nahrung aufgenommenes Lutein wird aufgrund seiner hydrophoben Charakteristik, ebenso wie andere Carotinoide im Rahmen des Lipidstoffwechsels metabolisiert. Dabei müssen Lutein bzw. die Luteinester zunächst aus den pflanzlichen Membrankomplexen gelöst werden [62]. Dies erfolgt zum einen durch Verarbeitung und Zubereitung der Nahrung, zum anderen durch Zerkleinerung der Nahrung beim Kauvorgang [26]. Die pflanzlichen Zellwände werden mechanisch zerstört und die Zellbestandteile freigesetzt. Es wird u.a. angenommen, dass einige verarbeitete bzw. gekochte Gemüse im Vergleich zur Rohkost zu einer deutlich höheren Verfügbarkeit von Lutein beitragen [63]. Inwiefern eine wirklich verbesserte Aufnahme durch erwärmende Zubereitungsmethoden erreicht wird, ist jedoch kontrovers diskutiert. Neue Studien zeigen, dass längere Kochprozesse bei hohen Temperaturen die Absorption von Lutein vermindern [64]. Über die Speiseröhre gelangt die zerkleinerte Nahrung in den Magen. Magenmotilität und dort befindliche Enzyme, wie z.B. Proteasen vermischen den Nahrungsbrei (Chymus), lösen Carotinoide aus Proteinkomplexen und überführen sie in emulgierte Lipidtröpfchen. Die Emulgierung des Chymus ermöglicht eine effiziente Verdauung der Bestandteile in der Lipidphase, da auf diesem Wege die Oberfläche der Substrate für die spezifischen Enzyme besser zugänglich bzw. vergrößert wird [65]. Die emulgierten Lipidtröpfchen gelangen nun in den oberen Dünndarm (Duodenum) und werden mit Intestinalsaft vermengt. Dieser enthält neben den spezifischen Pankreasenzymen wie z.B. Pankreasamylase und -lipasen, Trypsin ebenso Gallensalze und Gallensalz-aktivierte Lipase. Gallensalze bestehen aus Gallensäuren, welche in ihrer anionischen Form vorliegen und ebenfalls eine löslichkeitsvermittelnde Funktion besitzen. Durch die Anwesenheit von Pankreaslipasen, Colipasen und Phospholipasen werden die entsprechenden Substrate aus der Lipidphase gespalten. Es wird u.a. angenommen, dass Esterformen von Carotinoiden zunächst durch intestinale Enzyme hydrolysiert werden [66]. Das spezifische Enzym

insbesondere für die Hydrolyse von Luteinestern ist bis heute nicht bekannt [67]. Ein möglicher Kandidat, aufgrund seiner Affinität zu einer Vielzahl von lipophilen Substraten [68], ist die pankreatische Cholesterolesterase (ChE). Dies konnte jedoch bisher nicht belegt werden. Freie Carotinoide, wie auch die Lipolyseprodukte und Gallensalze werden anschließend in die sogenannten gemischten Micellen eingebaut. Diese besitzen einen sehr geringen Durchmesser (3 - 4 nm) und einen chemischen Aufbau, der es ihnen ermöglicht über die „*unstirred water layer*“ an die Mikrovilli der Bürstensaummembran und somit apikal an den Enterocyten zu gelangen. Die apikale Aufnahme von Carotinoiden bzw. Lutein in den Enterocyten erfolgt vorrangig durch einfache Diffusion. Eine Beteiligung von Membranproteinen beim Transport von Lutein wurde bereits beschrieben (Abbildung 5). So konnte gezeigt werden, dass eine Aufnahme von Lutein in den Enterozyten über den Scavengerrezeptor Klasse B Typ 1 (SR-B1) erfolgt [69, 70]. Der Rezeptor SR-B1 ist apikal an der Bürstensaummembran des Enterozyten lokalisiert und als Rezeptor für HDL (*High Density Lipoproteins*) bekannt [71-73]. Aufgrund seiner geringen Substratspezifität können neben Cholesterol, Cholesterolestern, Phospholipiden und Phytosterinen auch andere lipophile Substanzen, wie z.B. Carotinoide und im speziellen Lutein transportiert werden. Gleichzeitig ist ein Rücktransport – Reflux von Carotinoiden, welche nicht intrazellulär in die Chylomikronen eingebaut wurden, in das intestinale Lumen über diesen Transporter möglich. Als weiteres Transportprotein für Lutein wurde das transmembranständige *Niemann-Pick C1-like protein 1* (NPC1L1) untersucht, welches u.a. den Transport von Cholesterol in den Enterozyten gewährleistet und eine wichtige Komponente in der Lipidhomöostase darstellt [74, 75]. Sato et al. zeigten im Jahr 2012, dass durch Gabe des NPC1L1-Inhibitors Ezetimib, die Akkumulation von Lutein in der humanen Dünndarmepithelzelllinie Caco-2 bis zu 40% verringert wurde. Die Wissenschaftler konnten außerdem eine Hemmung der Akkumulation von Lutein bei Inkubation der Zellmonolayer mit *Block lipid transport 1* (BLT-1) detektieren [74]. BLT-1 ist ein potentieller Inhibitor des SR-BP 1 Transportproteins [76]. Innerhalb des Enterozyten wird Lutein wahrscheinlich über die mögliche Beteiligung von Bindeproteinen in Chylomikronen eingebaut, welche dann in das Lymphsystem abgegeben und über den Blutkreislauf an die entsprechenden Organe geleitet werden. In der Peripherie gelangen die Chylomikronen z.B. in die Adipozyten des Fettgewebes, aber auch in die Myozyten des Skelett- und Herzmuskels. Dort werden sie durch die Aktivität der Lipoproteinlipase (LPL) zu Chylomikronen-Remnants abgebaut. Die dabei freigesetzten Triglyceride werden von den Zellen als Energie genutzt bzw. im Fettgewebe gespeichert. Die Chylomikronen-Remnants werden in den Blutkreislauf abgegeben und von der Leber in die Hepatozyten

aufgenommen. Dort erfolgt der Wiedereinbau in Lipoproteine sehr kleiner Dichte (*Very Low Density Lipoproteins*, VLDL), welche in den Blutkreislauf abgegeben werden. Die VLDLs gelangen zu dem spezifischen Gewebe der Peripherie. Dort werden durch die Aktivität der LPL freie Fettsäuren abgespalten und es entstehen Lipoproteine mittlerer Dichte (*Intermediate Density Lipoproteins*, IDL), welche wiederum zur Leber abgeführt werden. Auch Carotinoide werden im Hepatozyten in Lipoproteinen eingelagert. Der Einbau von Lutein und auch Zeaxanthin findet bevorzugt an der Oberfläche von HDLs und LDLs statt [77]. Carotine, wie β -Carotin und Lycopin dagegen sind im Innern von LDLs lokalisiert [78].

Die spezifische Aufnahme von Lutein in das RPE des Auges wurde vielfältig untersucht. Sato et al. (2013) konnten bestätigen, dass der Transport in die retinalen Pigmentepithelzellen über den dortigen SR-B1 Transporter erfolgt [79]. Bereits During et al. (2008) konnten *in vitro* die Aufnahme von Xanthophyllen in die humane retinale Pigmentepithelzelllinie ARPE-19 über SR-B1 aufzeigen [80]. Auch das Transmembranglykoprotein CD 36 (*Cluster Determinat 36*) spielt beim Transport von Xanthophyllen in das RPE eine Rolle [81].

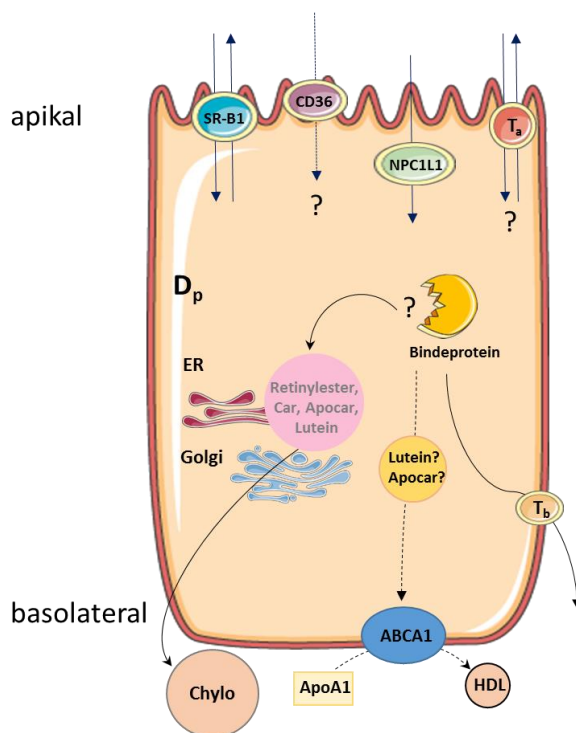


Abbildung 5 Schematische Darstellung möglicher trans-, inter- und innerzellulärer Transportwege von Lutein und Luteinestern im Enterozyten. Modifiziert nach [82].

Apikal/ Bürstensaummembran: SR-B1 = Scavengerrezeptor Klasse B Typ 1, CD 36 = Thrombozytenglykoprotein 4, NPC1L1 = *Niemann-Pick C1-like protein 1*, T_a = unbekannter apikaler Transporter. Lumen: D_p = passive Diffusion, ER = Endoplasmatisches Retikulum, Car = Carotinoide, Apocar = Apocarotinoide. Basolateral: Chylo = Chylomikronen, ApoA1 = Apolipoprotein A1, ABCA1 = ABC-Transportprotein, HDL = High Density Lipoprotein, T_b = unbekannter basolateraler Effluxtransporter.

1.4.3.2 Resorptions- und Bioverfügbarkeit

Die spezifische Resorptions- und Bioverfügbarkeit von Lutein bzw. seiner Esterformen sind Voraussetzung für die Aufnahme aus der Nahrung und Speicherung im humanen Zielorgan. Dabei hängen diese Verfügbarkeiten von einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren ab. Die Resorptionsverfügbarkeit gibt zunächst an, inwiefern eine mit der Nahrung aufgenommene Substanz chemisch bzw. strukturell so geschaffen ist oder innerhalb der oralen-, Magen- bzw. Dünndarmpassage entsprechend modifiziert wurde, dass sie durch darmspezifische Enterocyten absorbiert werden kann. Hingegen definiert sich die Bioverfügbarkeit als der prozentuale Anteil einer aufgenommenen Substanz bzw. eines Wirkstoffes, der resorbiert wird, in den systemischen Blutkreislauf des Organismus und folgend an seinen funktionsspezifischen Zielort gelangen kann. Eng mit dem Lipidverdau verknüpft, wird diskutiert, dass die Resorptionsverfügbarkeit von Lutein maßgeblich von der Freisetzung aus der Pflanzenmatrix, der Lösung in der Fettphase sowie der Effizienz des Einbaus in die gemischten Micellen beeinflusst wird [83-86]. Spezifische Einflussfaktoren, welche die Verfügbarkeit bestimmen, sind für jedes Carotinoid individuell und werden unter den Begriff „SLAMENGI“ (*Species of carotenoid, molecular Linkage, Amount of carotenoids consumed, carotenoid Matrix, Effectors of absorption and bioconversion, Nutrient status of the host, Genetic and hostrelated Interactions*) zusammengefasst [87]. Eine große Rolle spielen dabei die Aufbereitung und Verarbeitung der Pflanzenmatrix als Nahrungsmittel. Die mechanische Zerkleinerung, Kochprozesse, sowie Mastikation, Aktivität oraler Enzyme und das saure Magenmilieu führen zum Aufschluss der Pflanzenzellwände, Verkleinerung der Partikelgrößen in der Pflanzenmatrix und gleichzeitig zur Vergrößerung der Oberfläche auf die pankreatische Enzyme und Gallensalze wirken können [88, 89]. Unzureichend aufgeschlossene pflanzliche Nahrungsbestandteile könnten die Aufnahme von z.B. Carotinoiden hemmen. Es ist u.a. bekannt, dass Ballaststoffe im Intestinaltrakt Gallensalze und Fette binden und somit die Micellenformation hemmen können [90-92]. Ebenso ist es möglich, dass Carotinoide in die Ballaststoffphase eingebaut werden und nicht zur Resorption zur Verfügung stehen [93]. Vorteilhaft ist die Zufuhr der pflanzlichen Nahrung mit Fetten. So wird angenommen, dass sich die Resorptionsverfügbarkeit von Carotinoiden bei gleichzeitiger Aufnahme von Fetten entscheidend verbessert, da u.a. die Bildung von Micellen positiv beeinflusst wird. Dies konnten Yao et al. (2019) für Lutein beobachten [94]. Es wird vermutet, dass durch die Zugabe von z.B. MCT-Ölen (*medium chain triglycerids* engl. mittelkettige Fettsäuren) zu pflanzlichen Nahrungsmitteln die Freisetzung von freien Fettsäuren gesteigert, die Micellenformation gefördert und letztlich der Einbau von Lutein in diese Micellen positiv beeinflusst

wird [94]. Unveröffentlichte Daten von van het Hof et al. deuten darauf hin, dass bei gleichzeitiger Aufnahme von Lutein mit einer hohen Menge Fett die Resorptions- bzw. Bioverfügbarkeit gesteigert wird. Die Gabe eines luteinesterhaltigen Vollfettaufstrichs (35 g Fett/Mahlzeit) führte zu einem fast 100% höherem Plasmaresponse als bei Aufnahme mit 3 g Fett/Mahlzeit. Es wird vermutet, dass die geringe Fettzugabe die Löslichkeit der Luteinester vermindert und/oder die Freigabe und Aktivität hydrolytischer Enzyme wie z.B. Esterasen limitiert haben könnte [95]. Borel et al. (1998) berichteten außerdem, dass die in der Nahrung vorhandene Lipidart bei der Absorption ebenso bedeutend ist und nicht-absorbierbare, fettlösliche Verbindungen zu einer Verringerung der Carotinoid-Absorption führen können [96]. Interaktionen mit anderen sekundären Pflanzenstoffen bzw. Carotinoiden aus der Nahrung können die Resorptionsverfügbarkeit von Lutein ebenfalls verändern. Kostic et al. (1995) konnten eine Hemmung der intestinalen Absorption von Lutein bis zu 61% bei gleichzeitiger Gabe von β -Carotin nachweisen [97]. Eine Senkung der Luteinkonzentration im Serum nach sechswöchiger β -Carotin Supplementierung konnten ebenso Micozzi et al. (1992) zeigen [98]. Invers konnte durch van der Berg et al. (1998) eine Hemmung der intestinalen β -Carotin Absorption bei gleichzeitiger Gabe von Lutein, nicht jedoch bei Lycopingabe gezeigt werden [61]. Grundsätzlich gilt die Bioverfügbarkeit von Lutein u.a. aufgrund seiner Hydrophobizität als gering. Es wird nur ein Teil des Luteins aus den aufgenommenen Nahrungsmitteln resorbiert und vom Körper metabolisiert. Van het Hof et al. (1999) konnten in einer Humanstudie eine relative Bioverfügbarkeit von Lutein aus gemischtem Gemüse von 67% detektieren [99]. Bei Aufnahme von pflanzlichen Nahrungsmitteln liegen die Carotinoide wie z.B. Lutein darin meist in ihrer Esterform vor. Eine Absorption setzt eine Spaltung durch Hydrolasen voraus, weshalb für diese im Vergleich zur unveresterten Form eine geringe Resorptionsverfügbarkeit angenommen wird. Bowen et al. (2002) sowie Yoshizako et al. (2016) zeigten jedoch, dass eine Veresterung von Lutein die Bioverfügbarkeit beim Menschen nicht beeinträchtigt [100, 101].

Tabelle 3 Konzentrationen des Xanthophylls Lutein in ausgewählten Organen, Geweben und Körperflüssigkeiten des Menschen. Modifiziert nach [102].

TG = Trockengewicht, * = Gesamtcarotinoidgehalt, RPE = retinales Pigmentepithel.

	Konzentration Lutein	Referenz
Serum	0,251-0,337 $\mu\text{mol/L}$	[103]
Plasma	0,19-0,23 $\mu\text{mol/L}$	[104]
Haut	0,03 $\mu\text{mol/kg}$	[105]
Mundschleimhaut	4,45 $\mu\text{mol/kg}$	[106]
Fettgewebe	0,23 mol/kg TG	[106]
Retina	1-3 mmol/kg^*	[107]
RPE	5,1 nmol/kg Protein	[108]
Außensegment Stäbchen	1,70 pmol/mm TG	[108]
Lunge	0,1-2,3 $\mu\text{mol/kg}$	[109]
Leber	0,1-12,2 $\mu\text{mol/kg}$	[109]
Niere	0,1-10,4 $\mu\text{mol/kg}$	[109]

1.4.3.3 Verteilung

Nach der Metabolisierung über den Lipidstoffwechsel wird ausschließlich freies Lutein an die spezifischen Organe bzw. Gewebe des menschlichen Organismus weitergeleitet und - mit Ausnahme des retinalen Gewebes – in sehr niedrigen Konzentrationen akkumuliert (Tabelle 3). Esterformen konnten in humanen Organen bis heute nicht nachgewiesen werden. Lutein zirkuliert in geringen Mengen im Blut. Im basalen Serum von Probanden konnten Konzentrationen von 0,2 - 0,3 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt werden [103, 104]. Auch in Leber- und Fettgewebe sowie in der Haut, Bauchspeicheldrüse, Brust und Niere ist Lutein nachweisbar. Sehr niedrige Mengen finden sich in Lunge, Milz und Herz. Bedeutend ist die Akkumulation von Lutein sowie Zeaxanthin im retinalen Gewebe, insbesondere im Makulapigment der *Fovea centralis* (lat. zentrale Grube) [110-112]. Die *Fovea centralis* weist ebenso die höchste Dichte an Photorezeptorzellen auf und wird deshalb auch Punkt des schärfsten Sehens genannt. Die im Makulapigment hohen Konzentrationen an Lutein und Zeaxanthin lassen es gelb erscheinen, weshalb man dieses auch als *Makula lutea* (lat. gelber Fleck) bezeichnet. Auch das *meso*-Zeaxanthin kann hier nachgewiesen werden. Shyam et al. (2017) konnten zeigen, dass das Enzym RPE65 (*Retinol pigment epithelium-specific 65 kDa protein*), welches während des Sehvorgangs im retinalen Pigmentepithel die Umwandlung von all-trans Retinylester zu 11-cis-Retinol bewirkt, ebenso die Isomerisierung von Lutein zu meso-Zeaxanthin katalysieren kann [113]. Eine Akkumulation durch die Aufnahme mit der Nahrung ist eher unwahrscheinlich, da *meso*-Zeaxanthin nur

in einer limitierten Zahl und geringen Mengen in Lebensmitteln (Fischhaut, Hühnereigelb) vorkommt [114].

Die Konzentrationen von Lutein und Zeaxanthin im retinalen Gewebe schwanken von 0,1 bis 1,0 pmol/ mm² [111, 115, 116]. Im inneren Bereich der *Fovea* stellt Zeaxanthin mengenmäßig den höheren Anteil der beiden Xanthophylle dar. In der Literatur wird das Verhältnis zwischen Lutein und Zeaxanthin mit einem Ratio von 1:2 angegeben [115, 116]. Dieses Verhältnis verschiebt sich in den äußeren Bereichen des Makulapigments hin zum Lutein (1:2 bzw. 1:3, Zeaxanthin:Lutein) [115, 116]. Diskutiert wird ein möglicher Zusammenhang zur jeweiligen Photorezeptorendichte, welcher jedoch bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Im zentralen Bereich der *Fovea* finden sich die Sehzellen, welche als Zapfen bezeichnet werden und das farbliche Sehen ermöglichen. Im äußeren Bereich der Retina liegt eine hohe Dichte der lichtempfindlichen Sehzellen (Stäbchen) vor.

1.4.3.4 *Protektive Wirkung/physiologische Relevanz*

Die wesentliche Einlagerung von Lutein im Gewebe des Auges verdeutlicht bereits seine wichtige schützende Wirkung und Bedeutung im Auge, insbesondere bezüglich der Aufrechterhaltung der Sehqualität. Zwei Aspekte über die Wirkungsweise von Lutein werden dabei diskutiert. Seine Struktur macht es Lutein möglich Gewebe und Sehzellen vor photochemischer Schädigung zu schützen. So ist es in der Lage blaues bzw. kurzwelliges Licht des UV-Bereichs zu absorbieren. Damit wirkt Lutein zusätzlich indirekt der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in der lichtempfindlichen Retina entgegen. Ein zweiter Wirkmechanismus geht auf die ebenfalls strukturbedingte antioxidative Kapazität von Lutein zurück. Über den Mechanismus des "*singulet oxygen quenching*" kann Lutein Elektronen von einem Singulett-Sauerstoff aufnehmen, sich selbst durch physikalische Interaktionen bzw. Wärmeabgabe regenerieren und in der eigentlichen chemischen Struktur weiter bestehen [117]. Sein Doppelbindungssystem ermöglicht es Lutein außerdem als Elektronendonator im "*ROIs scavenging*" (*Reactive Oxygen Intermediates scavenging*) zu agieren. Freie Radikale haben das Bestreben Elektronen aufzunehmen. Sie entziehen somit Elektronendonatoren wie Lutein die Elektronen bzw. binden direkt an freie Elektronen unter Bildung einer konjugierten Doppelbindung [118]. Die effektive Wirkung von Lutein wird durch die Lage seiner polaren Endgruppen in der Lipidmembran verstärkt, da diese im intra- und extrazellulären Zytoplasma vorliegen [48]. Durch diese Mechanismen werden die Zellen selbst bzw. wichtige Zellkomponente (Lipide, Proteine und DNA)

vor Schädigungen durch Licht bzw. durch freie extrazelluläre, aber auch metabolische Radikale geschützt.

Weitere positive physiologische Funktionen durch die zusätzliche Aufnahme von Lutein bzw. mit anderen Carotinoiden z.B. hinsichtlich der Immunmodulation im humanen Organismus wurden diskutiert. Ein Einfluss auf die Immunfunktion konnte aber auf humaner Ebene nicht vollständig belegt werden [119]. In einer Studie, bei der Katzen mit Lutein supplementiert wurden, detektierte man eine erhöhte Expression von spezifischen Oberflächenproteinen der Immunabwehr [120]. Das antioxidative Potential von Lutein freie Radikale abzufangen, lässt ebenso die Vermutung einer antikanzerogenen bzw. antimutagenen Wirkung zu. So konnten Haegerle et al. *in vivo* eine inverse Korrelation zwischen der Aufnahme von Lutein sowie anderen Carotinoiden und der detektierten Menge an spezifischen Markern für DNA-Schädigungen und Lipidperoxidation, welche bei der Krebsentstehung von Bedeutung sind, feststellen. Während einige Studien antimutagene und antikanzerogene Effekte von Lutein *in vitro* belegen konnten [121-123], stehen dem gegenüber Untersuchungen, bei denen diese Effekte nicht oder nur begrenzt zu beobachten waren [124, 125]. Auch bei Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems könnte die Supplementierung mit Lutein eine Rolle spielen. In der Untersuchung des Radikalstatus von Peroxynitriten in LDL's konnte gezeigt werden, dass Lutein diese *in vitro* abmildert [126]. Die von Peroxynitriten vermittelte Oxidation von Lipoproteinen ist ein initialer Schritt in der Entstehung von arteriosklerotischen Läsionen [127]. Präventiv könnte Lutein hier dem pathologischen Verlauf entgegenwirken [126].

1.5 NAHRUNGSERGÄNZUNGSMITTEL

Die zusätzliche Anwendung von Nahrungsergänzungsmitteln (NEM) zu einer ausgewogenen Ernährung wird kontrovers diskutiert. Der Nutzen sollte hierbei kritisch betrachtet werden. Während NEM zum einen Mangelerscheinungen entgegenwirken und erhöhten Nährstoffbedarf kompensieren, stehen dem teilweise fehlende, wissenschaftliche Bestätigungen eines Vorteils, oder mögliche toxische Effekte bei zu hoher Aufnahme entgegen. So zeigte bereits 1994 die ATBC-Studie (*α-tocopherol β-carotene cancer prevention study*), dass eine erhöhte Zufuhr von Vitamin E und β-Carotin nicht wie erwartet antioxidative Effekte hervorrief, sondern zu einem signifikanten, vermehrten Auftreten von Lungenkrebs bei Rauchern führte [128]. Ähnliche negative Effekte bestätigte die CARET-Studie (*β-carotene and retinol efficacy trial*) [129]. Eine erhöhte Inzidenz, insbesondere von Lungenkrebs konnte hier bei der Gabe von β-Carotin-

und Retinolsupplementen beobachtet werden. Auch die wissenschaftliche Aufklärung theoretisch angenommener präventiver oder positiver gesundheitlicher Wirkungen von NEM bleibt teilweise unbestätigt oder sogar offen. Konkrete positive Effekte zeigen sich dagegen bei der Supplementierung von bestimmten Risikogruppen mit spezifischen Nährstoffen. Beispielhaft ist die empfohlene erhöhte Aufnahme von Eisen und Jod in der Schwangerschaft und während des Stillens zu nennen. Auch bei älteren Menschen ist die Zufuhr spezifischer Nährstoffe sinnvoll, um Defizite zu vermeiden bzw. denen entgegenzuwirken. Beispielsweise wird ein im Alter auftretender, möglicher Mangel an Vitamin D assoziiert mit einer Vielzahl von chronischen Erkrankungen [130]. Frühzeitig und präventiv ist die Beachtung einer ausreichenden UV-Licht-Exposition bzw. adäquaten Aufnahme der Vorstufen des Vitamin D (Calcio1-D₃, Ergocalciferol-D₂) sinnvoll.

NEM zählen zu den Lebensmitteln und können sog. Minornährstoffe, wie Vitamine und Mineralstoffe enthalten. Aber auch Ballaststoffe, pro- und präbiotische Formulierungen, Aminosäuren, Omega-3-Fettsäuren sowie sekundäre Pflanzenstoffe sind hier anwendbar. Diese Substanzen ermöglichen eine Versorgung des Organismus mit Molekülen, welche dieser nicht oder nur eingeschränkt selbst synthetisieren kann, jedoch zur Aufrechterhaltung der Körperfunktionen bzw. des allgemeinen Wohlbefindens benötigt. NEM unterliegen grundsätzlich keiner Zulassungspflicht, müssen aber beim Bund für Lebensmittel- und Verbraucherschutz registriert sein, um auf den Markt zu gelangen. Rechtliche Regelungen finden sich im Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB), der Nahrungsergänzungsmittelverordnung (NemV) und auf europäischer Ebene in der Richtlinie 2002/46/EG. Mit Einstufung als Lebensmittel müssen NEM bestimmte Anforderungen erfüllen. So sollen die in kleinen, dosierten Mengen vorliegenden Substanzen ernährungsphysiologische Wirkung aufweisen, sicher sein und keine Nebenwirkungen hervorrufen. Es besteht weiterhin eine Deklarationspflicht der Zutaten, eine besondere Kennzeichnung von Allergenen sowie Hinweispflicht für Höchstmengen bzw. die Angabe der empfohlenen täglichen Verzehrsmenge. Das Anbringen von gesundheits- und nährwertbezogenen Aussagen bedarf der Erlaubnis durch die EU. Regelungen dazu finden sich in der sogenannten *Health Claims* Verordnung (Verordnung (EG) NR. 1924/2006). Die Darreichungsform können Tabletten, Kapseln, Pillen oder ähnliches sein.

1.5.1 Miniemulsionen als Basis eines Nahrungsergänzungsmittels

Bei der Herstellung von NEM hat das Einbringen von ernährungsphysiologisch relevanten Nährstoffen in Emulsionen oder Nanoemulsionen immer mehr an Bedeutung gewonnen. Die

Verkapselung einer spezifischen Substanz bietet dieser Schutz gegenüber Degradationsprozessen beim Durchlaufen des Gastrointestinaltraktes und kann eine verbesserte Bioverfügbarkeit ermöglichen. Emulsionen sind fein verteilte Gemische aus mindestens zwei ineinander nahezu unlöslichen Flüssigkeiten bzw. Phasen. Die äußere Phase stellt dabei die kontinuierliche Phase bzw. das Dispergiermittel dar. Sie ist von der inneren - dispergierten Phase durch eine Phasengrenzfläche getrennt. Emulsionstyp, spezifisch verwendete Emulgierhilfsstoffe (Emulgatoren) sowie Emulgiertechniken, aber auch physikochemisches Milieu haben maßgeblich Einfluss auf Eigenschaften und Langzeitstabilität einer Emulsion (Dispersion). Je nach chemischer Beschaffenheit der jeweiligen Phasen unterscheidet man zwischen Öl-in-Wasser-(O/W) und Wasser-in-Öl-(W/O)-Emulsionen. Die Anwendung von Emulsionen ist in der Industrie weit verbreitet (Lebensmittel, Kosmetik, Pharmazie, Pflanzenschutz) [131]. So stellen Milch- und Milcherzeugnisse, Lotionen und Hautcremes in der Regel O/W Emulsionen dar. Butter und Margarine dagegen sind W/O Emulsionen. Hier liegen die Wassermolekültropfen verteilt in der Ölphase vor. Der Begriff Emulsion gilt im Allgemeinen für Dispersionen mit einem Tropfendurchmesser von 0,1 bis 100 µm (Makroemulsionen). In den Makroemulsionen besteht das Bestreben vorhandene Tröpfchen zu vereinigen (Koaleszenz), um die hohe Grenzflächenenergie zwischen den Phasen herabzusetzen. Sie gelten deshalb als thermodynamisch instabil. Zu ihnen zählen als Untergruppe die Miniemulsionen, auch als submikrone Emulsionen bezeichnet [132]. Hier liegen die Partikelgrößen im Bereich zwischen 0,1 und 1,0 µm vor. Eine weitere Differenzierung der Form der Makroemulsionen stellen die Nanoemulsionen dar [132]. Sie weisen Partikel kleiner als 0,1 µm auf. Gegensätzlich zu den thermodynamisch instabilen Formulierungen gestalten sich Mikroemulsionen mit einer Tropfengröße im Bereich unter 100 nm. Ihre thermodynamische Stabilität ergibt sich aus hoher Tropfenzahl und herabgesetzter Grenzflächenspannung in der Dispersion. Dies wird hauptsächlich durch den vermehrten Zusatz von Emulgatoren und sog. Co-Tensiden erreicht, welche nicht immer lebensmittelkonform sind [132]. Inwiefern ein zu verwendender Emulgierhilfsstoff für die Lebensmittelherstellung zugelassen ist, kann der „Liste der in der Europäischen Union zugelassenen Lebensmittelzusatzstoffe“ entnommen werden. Europaweit sind zugelassene Lebensmittelzusatzstoffe mit einheitlichen E-Nummern versehen. In Deutschland ist ihre Anwendung unmittelbar mit der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung (ZZuLV) geregelt. Grundlegend sind Emulgatoren Moleküle mit ambiphiler Eigenschaft (lat./griech. beides liebend). Sie weisen einerseits einen hydrophilen Strukturanteil auf, der ihnen Wasserlöslichkeit vermittelt. Weiterhin sind sie strukturell mit einem lipophilen Anteil ausgestattet, der ihnen eine Löslichkeit in organischen Substanzen ermöglicht. Aufgrund

dieser Eigenschaft können Emulgatoren an der Grenzfläche zwischen kontinuierlicher und disperser Phase einer Emulsion adsorbieren, die Grenzflächenspannung herabsetzen, abstoßende Kräfte zwischen den Tropfen hervorrufen und das Gemisch somit gegenüber destabilisierenden Mechanismen schützen (Abbildung 6) [132, 133].

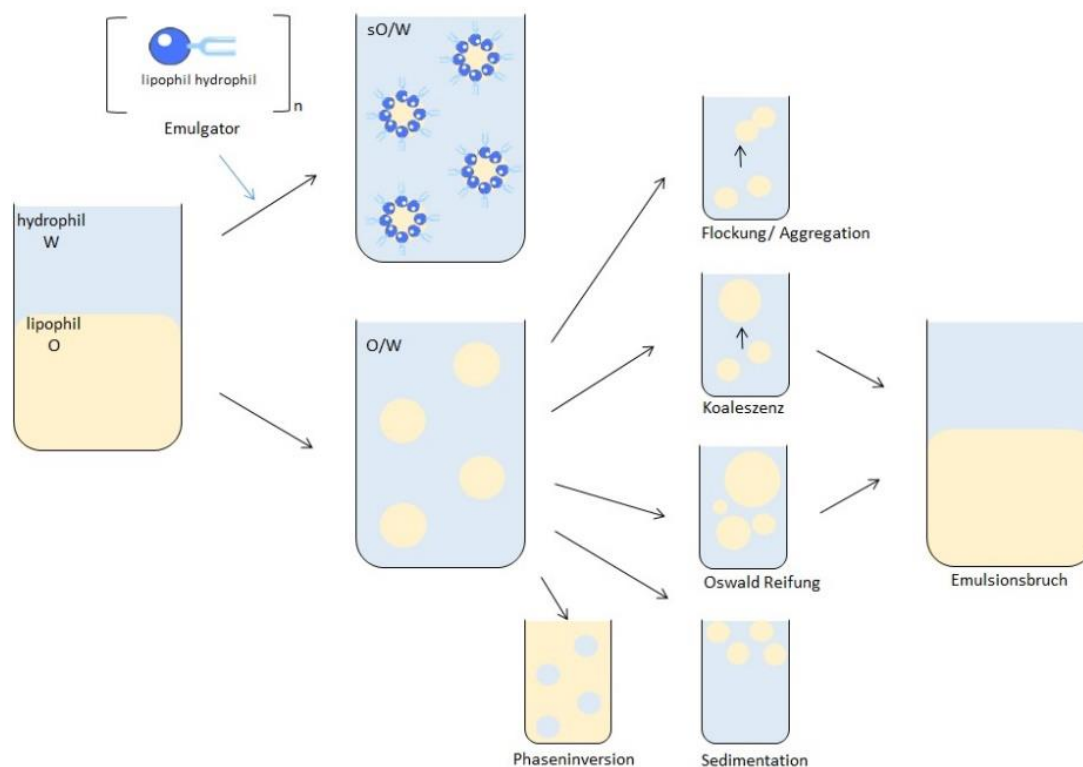


Abbildung 6 Schematischer Aufbau einer stabilen O/W-Emulsion und Destabilisierungseffekte.

Durch Emulgiertechniken kann ein Zwei-Phasen-System in eine Emulsion überführt werden. Die Zugabe von geeigneten Emulgatoren kann langfristig zum Schutz der Emulsion vor Destabilisierung beitragen. Destabilisierungseffekte können einzeln, aber auch parallel ablaufen. Uneingeschränkte Koaleszenz (Zusammenfließen der Tropfen) und Aggregation führen letztlich zum Bruch der Emulsion und Entstehung des ursprünglichen Zwei-Phasen-Systems. W = Wasserphase, O = Ölphase, sO/W = stabilisierte Öl/Wasser Emulsion, O/W = Öl/Wasser Emulsion.

Bei der Emulgatorwahl sind neben Lebensmittelkonformität bzw. toxischen Aspekten, Sensorik, gustatorischer Wahrnehmung, Eignung als Langzeitstabilisator und Emulsionstyp ausschlaggebende Faktoren. Ein allgemein bekanntes Modell zur Einteilung und Feststellung der Eignung von Emulgatoren für die Anwendung in einer spezifischen Emulsion ist das HLB-Konzept nach Griffin (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*) [134]. Nach diesem Konzept berechnet sich der HLB-Wert aus dem Quotienten der Masse des hydrophilen Molekülanteils und der Gesamtmasse des Moleküls multipliziert mit dem Skalierungsfaktor 20. Ein HLB-Wert von 1 weist auf einen Emulgator mit lipophilem Charakter hin. Ein Wert von 20 begründet hydrophile

Eigenschaften. Der HLB-Wert gibt so indirekt Auskunft über die Wasserlöslichkeit eines Emulgators, woraus sich wiederum der bei Verwendung entstehende Emulsionstyp ableiten lässt. Für die Herstellung einer W/O Emulsion sind Emulgierhilfsstoffe mit einem HLB von 3-8 geeignet (z.B. Cetylstearylalkohol, Sorbitan-Fettsäureester). Für eine O/W Emulsion sind Emulgatoren mit einem HLB-Wert von 8-15 nutzbar. Dazu zählen z.B. die Polysorbate (Tweens[®]), Zuckerreste von Speisefettsäuren, Lysolecithin. Auch mit Hilfe der Bancroft'schen Regel ist eine Herleitung der Emulgatorform möglich. Wesentliche Aussage ist hier, dass die Ausbildung des Emulsionstyps (O/W oder W/O) von der zügigen und besseren Löslichkeit des Emulgators in einer der beiden Phasen bestimmt wird. Diese Phase bildet dann die kontinuierliche, äußere Phase der Emulsion. Für die Herstellung von wirkstoffhaltigen O/W Emulsionen sind u.a. Emulgatoren in Form von Molkenproteinen interessante Kandidaten. Sie stellen neben Casein die zweite, große Fraktion der Milchproteine dar. Im Verarbeitungsprozess wird Casein aus der Milch durch Labgerinnung oder Säurefällung abgesondert, während Molkenproteine als wasserlösliche Moleküle in der Milch zurückbleiben. Wichtigste Vertreter der Molkenproteine sind β -Lactoglobulin, Immunoglobulin und Serumalbumin. Eine modifizierte Form eines Molkenproteingemisches ist Biozate[®] 1 (Biozate 1). Dabei handelt es sich um ein Peptidgemisch, welches durch spezifische Isolierung und Hydrolyse aus partiell verdauten Molkenproteinen gewonnen wird. Neben seiner emulgierenden Eigenschaft stellt Biozate 1 gr \ddot{u} ndenbedingt ein leicht resorbierbares Peptidgemisch sowie eine Quelle f \ddot{u} r ernährungsphysiologisch relevante, essentielle Aminosäuren, wie z. B. Leucin, Isoleucin und Lysin dar. Es kann, wie auch andere Molkenproteine, als bioaktives Peptid eingestuft werden, dessen positive Effekte im menschlichen Organismus nach weiterer hydrolytischer Spaltung während des Verdauungsprozesses wirksam werden. Für Molkenproteine sind eine Vielzahl von gesundheitsfördernden Eigenschaften bekannt, weshalb sie u.a. als Nahrungsergänzungsmittel angeboten werden. So zeigten Molkenproteine in Studien immunmodulatorische Wirkung oder induzierten die Wachstumshemmung von Krebszellen. Von großer Bedeutung ist die blutdrucksenkende Wirkung von Molkenproteinen, indem sie als Hemmstoff des Angiotensin-I-Converting Enzym auftreten [135, 136].

Ein weiterer in Lebensmitteln und Kosmetikprodukten, aber auch in der Arzneimittelherstellung angewendeter relevanter Emulgierhilfsstoff ist das Tween[®] 80 (Polyoxyäthylen(20)-Sorbitan-Monooleat). Als nichtionisches Tensid weist es die typische amphiphile Molekülstruktur und somit die Eigenschaften eines Emulgators auf. Mit der E-Nummer 433 wird Tween[®] 80 (Tween 80) als Nahrungsmittelzusatzstoff in der Europäischen Union (EU) gelistet [137]. Eine konkrete Begrenzung des Zusatzstoffes bei der Zugabe in Lebensmittel in Form

von Höchstmengen gibt es in Deutschland nicht. Laut Zusatzstoff-Verkehrsverordnung Anlage 4 gilt für Polysorbate die sog. „*quantum satis*“-Regelung (lat. so viel wie nötig). Der wissenschaftliche Lebensmittelausschuss der EU (*Scientific Committee on Food*, SCF) legt eine erlaubte Tagesdosis (*acceptable daily intake*, ADI) von 10 mg/kg Körpergewicht (KG) fest. Dieser Wert gilt als Summenwert für die Gruppe der Polysorbate (Tween® 20, 40, 60, 65, 80). In einer wissenschaftlichen Erklärung der EFSA (*European Food Safety Authority*) von 2018 wird der von FAO/WHO deklarierte ADI als Orientierung angegeben [138]. Dieser liegt bei 25 mg/kg KG/ Tag für die Gruppe der Polysorbate. Polysorbate werden demnach in kleinen Mengen vom Körper absorbiert und führen grundsätzlich nicht zu einer akuten Toxizität [138]. Ergänzend besteht die Möglichkeit der Stabilisierung von Emulsionen durch die Zugabe von Peptisatoren. Dazu zählen geladene Ionen (Elektrolyte), wie z.B. Natriumcitrat oder Natriumphosphat. Ihre Ladungen ermöglichen ihnen das Anlagern an der Oberfläche der Tröpfchen einer Dispersion, was zur Steigerung der dort vorliegenden Oberflächenladung führt. Die Folge ist eine erhöhte Abstoßung zwischen den Tröpfchen und das Verhindern der Destabilisierung der Emulsion. Inwiefern die Zugabe von Peptisatoren notwendig ist, muss hinsichtlich Aufwand und Nutzen betrachtet werden, da auch ihre Verwendung in Lebensmitteln der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung unterlegen ist.

Emulsionen bieten vielfältige Einsatzmöglichkeiten sowohl in der Lebensmittelindustrie, als auch bei der Herstellung von Nahrungsergänzungsmitteln. Es ist bekannt, dass die Applikation eines Wirkstoffes in Form von feindispersen Emulsionen sensorische und qualitative Eigenschaften von Produkten langandauernd positiv beeinflussen [132]. Außerdem wird durch das Einbringen lipophiler Substanzen, wie z.B. Lutein in O/W Emulsionen, eine wasserdispergierbare Formulierung bereitgestellt, bei der der Wirkstoff in gelöster Form vorliegt. Diese Form kann ebenso eine verbesserte Beständigkeit gegenüber den verschiedenen vorhandenen Milieus sowie eine verbesserte Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes beim Passieren des Magen-Darm-Trakts bewirken [139]. Der Einsatz einer Miniemulsion erhöht ebenso die Möglichkeit der Versprühbarkeit der wirkstoffbeladenen Dispersion und den Einsatz des Wirkstoffes in einem Sprühstift zur oralen Aufnahme. Diese Form der Applikation umgeht die notwendige Akzeptanz von Tabletten und Kapseln. Gleichzeitig bietet sich die Möglichkeit der zusätzlichen Aufnahme des Wirkstoffes über die Mundschleimhaut. Bei einer möglichen sublingualen Aufnahme gelangt der Wirkstoff direkt und schnell in den Blutkreislauf, da venöses Blut von der Mundschleimhaut ausgehend in die obere Hohlvene fließt. Im Weiteren bietet sich die weitere

Wirkstoffaufnahme über den üblichen Weg, der Resorption im Dünndarm nach Abschlucken der Dispersion.

1.5.2 Kolloidale Formulierungen mit dem sekundären Pflanzenstoffen Lutein

Die ernährungsphysiologischen und gesundheitsfördernden Effekte des sekundären Pflanzenstoffes Lutein bieten hohes Potential zur Einbindung des Wirkstoffes in einem NEM. Aufgrund seiner hohen Empfindlichkeit gegenüber oxidativer Degradation sind spezifische Anforderungen an die Darreichungsform gestellt. Weiterhin ergibt sich aufgrund der Hydrophobizität von Lutein nur eine begrenzte Löslichkeit im wässrigen Milieu. Das Einbringen und Stabilisieren von Lutein in verschiedenen Applikationen unter Verwendung spezifischer Löslichkeitsvermittler wurde bereits vielfältig beschrieben (Tabelle 4). Entsprechende Formulierungen mit Luteinestern wurden bis dato nur wenig untersucht. Khalil et al. (2012) ermittelten die Stabilität von Luteinestern in Emulsionen u.a. mit MCT-Öl und Molkenproteinen [140]. Es konnten eine verbesserte Stabilität der Luteinester gegenüber thermischer Behandlung und UV-Licht gezeigt werden. Verschiedene Nahrungsergänzungsmittel mit dem Wirkstoff Lutein sind marktgängig und käuflich zu erwerben (z.B. FloraGlo[®], OcuVite[®]Lutein Plus). Lutein liegt hier meist als Pulver oder Kapsel vor. Dessen Herkunft, Stabilität und Bioverfügbarkeit sind nicht immer eindeutig und klar belegt. Teilweise liegt der Wirkstoff auch als Luteinester vor (z.B. Biolut[™] Marigold Extrakt). Die Löslichkeit dieser Pulver mit dem hydrophoben Wirkstoff im wässrigen Milieu ist kritisch zu hinterfragen. Demnach kann von einer geringen Bioverfügbarkeit von Lutein und Luteinestern aus dieser Applikation ausgegangen werden. Vielversprechend sind Emulsionen als Applikation in einem Mundspray (z.B. New Focus[™], Maxi Focus[™]). Sublingual aufgetragen, kann hier eine erste effektive Resorption bereits über die Mundschleimhaut unter Beteiligung von Speichellipasen erfolgen. Im weiteren Magen-Darm-Trakt können die wirkstoffhaltigen Formulierungen in Abhängigkeit ihrer Zusammensetzung ebenso aufgenommen werden. Der direkte Einsatz von Luteinestern in einem Mundspray ist bisher nicht bekannt. Deren kostengünstiger und flexibler Erwerb, sowie ihre natürliche Stabilität machen sie im Austausch des eher labilen Luteins für einen Einsatz in einem NEM interessant.

Tabelle 4 Untersuchungen zum sekundären Pflanzenstoff Lutein in kolloidalen Formulierungen.

O/W = Öl in Wasser, pH = pH-Wert, MP = Molkenprotein, MPI = Molkenproteinisolat, Biozate® 1 = Molkenproteinhydrolysat, MCT-Öl = *medium chain triglycerids*-mittelkettige Fettsäuren, Tween® 80 = Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat, n.a. = nicht analysiert.

Formulierung	Emulgatoren, Trägerphasen	positiver Effekt	Referenz
mikroverkapselt	Phospholipide (Sojabohne) poröse Stärke, Gelatine	Lutein: verbesserte Stabilität gegenüber Hitze, pH, Licht und Sauerstoff, erhöhte Wasserlöslichkeit	[141]
O/W Emulsion	MP Biozate® 1 MCT-Öl	Lutein: Schutz vor Oxidation, verbesserte zelluläre Aufnahme in Abhängigkeit des Emulgators Emulsion: ↑ Stabilität	[53]
O/W Emulsion	Casein Maisöl	Lutein: labil gegenüber Temperatur, stabil gegenüber pH Emulsion: konträres Verhalten	[142]
O/W Nanoemulsion	MPI Maisöl	Lutein: verbesserte zelluläre Aufnahme (Caco-2) aus Nanoemulsionen Emulsion: stabil für 28 d	[143]
O/W Nanoemulsion	nichtionische Tweens® MCT-Öl, Maisöl	Lutein: n.a. Emulsion: beste Stabilität mit Tween® 80/ MCT-Öl	[144]
O/W Emulsion	Quillaja Saponin Tween® 80 MP Casein Maisöl	Lutein: nur visuell, leichte Farbabnahme Emulsion: beste Stabilität mit Quillaja Saponin	[145]
O/W Nanoemulsion	MPI polymerisiertens MPI Olivenöl	Emulsion: Stabilität bei Lagerung 4°C/ 4 Wochen	[146]

2 ZIELSTELLUNG

Der sekundäre Pflanzenstoff Lutein ist als Bestandteil des humanen Makulapigments in der Aufrechterhaltung der Sehqualität bis in das hohe Alter ein bedeutender Faktor. Lokalisiert in der *Fovea centralis*, bietet Lutein den dort ansässigen Photorezeptorzellen im retinalen Pigmentepithel (RPE) Schutz vor Schädigungen und Abbau durch eintretende energiereiche UV-Strahlung und oxidative Prozesse. Mit dem Alter einhergehend wird eine Minderung der Dichte des Makulapigments aufgrund von Abbau bzw. Verlust der eingelagerten Xanthophylle, insbesondere Lutein beobachtet. Die Stabilisierung der Photorezeptorzellen wird nicht mehr ausreichend gewährleistet. Im alternden Organismus kann diese Destabilisierung im Zusammenhang mit dem veränderten Stoffwechselfgeschehen die sog. altersbedingten Makuladegeneration (AMD) verursachen. Deren Verlauf kann zum Verlust der Sehschärfe bis hin zum irreversiblen Erblinden führen. Das pathologische Krankheitsbild der AMD ist weitreichend beschrieben. Diagnostische Mittel, Prädispositionen und symptomatischer Verlauf sind bekannt. Limitierend ist die Möglichkeit der Therapie, die ausschließlich ein Verbessern der Sehschärfe oder das Aufhalten der Erkrankung betrifft. Aufgrund dessen wurden bereits vielfach Bestrebungen getätigt frühzeitig präventive Maßnahmen insbesondere über das Ernährungsverhalten zu finden und zu schaffen. Dazu wurde in Untersuchungen die physiologische Bedeutung von Lutein als leitendes Xanthophyll im Makulapigment aufgegriffen. Humanstudien zeigten teilweise einen engen Zusammenhang zwischen der Supplementierung von luteinhaltigen Präparaten mit einem einhergehenden Anstieg der Makulapigmentdichte, Verbesserung des Sehvermögens und der Sehschärfe. Ebenso finden sich wissenschaftliche Publikationen, die Vorkommen, Bioverfügbarkeit und physiologische Bedeutung im humanen Organismus von Lutein aufzeigen. Aufbauend auf den Forschungserkenntnissen werden Nahrungsergänzungsmittel (NEM) mit Lutein in verschiedenen Formulierungen und Applikationen am Markt angeboten. Sehr viel weniger wissenschaftliche Aufmerksamkeit haben die Luteinester, die pflanzliche Speicherform des Luteins, bisher erhalten. Sie bieten den Vorteil einer natürlichen, höheren Stabilität als Lutein und wären nachhaltig sowie kostengünstig einsetzbar. Präparate sind in Form von Pulvern und Kapseln als Nahrungsergänzungsmittel erhältlich. Die Anwendung von Luteinestern in einer kolloidalen Formulierung als Mundspray stellt ein Novum dar.

Im Rahmen eines Projektes soll in Zusammenarbeit mit einem mittelständischen Unternehmen (Projektpartner) und dem Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung (IAP) ein

luteinesterhaltiges NEM in Form einer Miniemulsion konzipiert werden, welches in einem Mundspray flexibel anwendbar ist und eine effiziente Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes ermöglicht. Mit dem Präparat soll gezielt und präventiv den Einschränkungen der Sehqualität u.a. bei der AMD im Alter entgegengewirkt werden.

In dieser Arbeit sollen im Rahmen der Produktentwicklung des NEMs in Zusammenarbeit mit dem IAP grundlegende Basisbestandteile für wirkstoffhaltige Miniemulsionen (O/W) gewählt und auf ihre Eignung überprüft werden. Es werden verschiedene Formulierungen anhand von Partikelgrößenanalysen mit dem Mastersizer X definiert. Diese Messungen erfolgen ausschließlich von Dr. Bernd-Reiner Paulke am IAP. Die ermittelten Daten stehen für diese Arbeit zur Verfügung und werden in die Untersuchungen zur Bewertung der Miniemulsionen mit einbezogen. Aufgrund von personellen und räumlichen Änderungen im IAP werden einige Miniemulsionen im Verlauf der Arbeit am Zetasizer Nano S überprüft.

Die qualitativen und quantitativen Analysen der Wirkstoffe in den Formulierungen innerhalb der gesamten Arbeit erfolgen nach vorheriger Probenaufarbeitung (Extraktion) mittels Umkehrphasenflüssigkeitschromatographie mit angeschlossenen Diodenarraydetektor.

Nach Auswahl der grundlegenden Bestandteile der Öl- und Wasserphasen, sowie der Wirkstoffträger sollen erste Prototypen (Präemulsionen) hergestellt werden. Mit diesen Präemulsionen wird die physikochemische Charakterisierung von Lutein und Luteinestern in kolloidalen Formulierungen vorgenommen. Im Zusammenhang mit den bis dahin gesammelten Erkenntnissen sollen Fertigrezepturen des NEMs entwickelt werden. Diese enthalten den Wirkstoff in Form von Luteinestern. Folgend soll mittels einem *in vitro* Verdaumodell die Resorptionsverfügbarkeit der Wirkstoffe aus den Präemulsionen sowie aus den Fertigrezepturen untersucht werden. Die Resultate geben Aufschluß über die Zweckmäßigkeit der Basiszusammensetzung der Miniemulsionen und der verwendeten Wirkstoffe sowie die Resorptionsverfügbarkeit von Luteinestern *in vitro*. Ebenso werden Vergleiche zwischen der Resorptionsverfügbarkeit von Lutein und Luteinestern aus der vereinfachten Präemulsion bzw. komplexen Fertigrezeptur möglich sein. Weiterführend soll die hydrolytischen Luteinesterspaltung durch die Verwendung einer spezifischen Cholesterolesterase sowie industriellen Lipasen von Pilzen *in vitro* interpretiert werden. Hier wird sich die Frage stellen, inwiefern die Erweiterung der Applikation des NEMs durch Einbringen eines lyophilisierten Enzyms, die Resorptionsverfügbarkeit von Luteinestern verbessern würde.

Abschließend erfolgen Zellkulturversuche am Modell für das humane Dünndarmepithel, der Zelllinie Caco-2, um die zelluläre Aufnahme der Luteinester zu charakterisieren. Dabei werden

die Formulierungen und ausgewählte Bestandteile zunächst hinsichtlich zytotoxischer Effekte bewertet. Die Bestimmung der Zytotoxizitäten erfolgt unter Verwendung des Resazurin- und Neutralrotassays. In weiterführenden Zellkulturversuchen wird dann die zelluläre Aufnahme der Wirkstoffe aus den kolloidalen Formulierungen *in vitro* überprüft. Damit kann eine Beurteilung der Absorption von Luteinestern aus den kolloidalen Formulierungen erfolgen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 PROBENMATERIAL

Die genauen Zusammensetzungen der einzelnen Emulsionen und Lösungen sind dem Anhang (8.2) zu entnehmen.

3.1.1 Wirkstoffträger

Tabelle 5 *Verwendete Wirkstoffträger.*

Wirkstoffträger	Wirkstoff	Hersteller
Lutein 5%	Lutein	BulkSupplements.com, USA
Oleoresin Marigold (food grade)	Luteinester	NATECO2, Deutschland
Biolut™ Marigold Extract	Luteinester	Blue California, USA

3.1.2 Formulierungen

Tabelle 6 *Präemulsionen mit Wirkstoff und Emulgatoren (Emulgiertechnik: Ultraschall und Hochdruckhomogenisation).*

Die Ölphase und Wasserphase der jeweiligen Präemulsionen wurden zusammengeführt und zunächst mit einem Ultraschallhomogenisator (IKA Dispergierer Ultraturrax, IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Deutschland) für 5 min bei 200 Watt auf Eiswasser gemischt. Danach wurden die Lösungen sechsmalig im Hochdruckhomogenisator AVP Gaulin AP 40 (SPX Flow Inc., USA) mit 710 bar behandelt. Die Lagerung der entstandenen Miniemulsionen erfolgte bei 4°C im Dunkeln. MCT = *medium chain triglycerids*-mittelkettige Fettsäuren, Tween 80 = Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat, Biozate 1 = Molkenproteinhydrolysat.

Probenbezeichnung	Wirkstoff	Ölbasis	Emulgator(en)
M1	Lutein	MCT	Tween 80
M2	Lutein	MCT	Tween 80, Biozate 1
M3	Luteinester	MCT	Tween 80
M4	Luteinester	MCT	Tween 80, Biozate 1
M5	Lutein, Luteinester	MCT	Tween 80
M6	Lutein, Luteinester	MCT	Tween 80, Biozate 1

Tabelle 7 Präemulsionen mit Wirkstoff und Emulgatoren. (Emulgiertechnik: Ultraschall).

Die Ölphase und Wasserphase der jeweiligen Präemulsionen wurden zusammengeführt und zunächst bei 500 rpm für 10 min im Schüttler invertiert. Unter Verwendung eines Ultraschallhomogenisator Sonopuls® HD 2070 (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Deutschland) wurden die Lösungen auf Eis mit einer Beschallungszeit von 10 min (MO3, MO4) bzw. 20 min (MO5, MO6) und einem Energieeintrag von 70 Watt behandelt. Die Lagerung der entstandenen Miniemulsionen erfolgte bei 4°C im Dunkeln. MCT = *medium chain triglycerids*-mittelkettige Fettsäuren, Tween 80 = Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat, Biozate 1 = Molkenproteinhydrolysat.

Probenbezeichnung	Wirkstoff	Ölbasis	Emulgator(en)
MO3	Luteinester	MCT	Tween 80
MO4	Luteinester	MCT	Tween 80, Biozate 1
MO5	Lutein, Luteinester	MCT	Tween 80
MO6	Lutein, Luteinester	MCT	Tween 80, Biozate 1

Tabelle 8 Fertigrezepturen mit Luteinestern und Emulgatoren. (Emulgiertechnik: Ultraschall und Hochdruckhomogenisation).

Die Ölphase und Wasserphase der jeweiligen Fertigrezepturen wurden zusammengeführt und zunächst mit einem Ultraschallhomogenisators (IKA Dispergierer Ultraturrax, IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Deutschland) für 5 min bei 200 Watt auf Eiswasser gemischt. Danach wurden die Lösungen sechsmalig im Hochdruckhomogenisator AVP Gaulin AP 40 (SPX Flow Inc., USA) mit 710 bar behandelt. Die Lagerung der entstandenen Miniemulsionen erfolgte bei 4°C im Dunkeln. MCT = *medium chain triglycerids*-mittelkettige Fettsäuren, Tween 80 = Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat, Biozate 1 = Molkenproteinhydrolysat.

Probenbezeichnung	Wirkstoff	Ölbasis	Emulgator(en)
122	Luteinester	MCT	Tween 80
123	Luteinester	Rapsöl	Tween 80
124	Luteinester	MCT	Tween 80, Biozate 1
125	Luteinester	Rapsöl	Tween 80, Biozate 1
126	Luteinester	MCT	Biozate 1
127	Luteinester	Rapsöl	Biozate 1

Tabelle 9 Vergleichsprodukt New Focus™ Spray.

Es handelt sich um ein kommerziell erwerbliches Mundspray der Firma Good Health Naturally, United Kingdom. Der Wirkstoffträger ist das sog. FloraGLOLutein (Kemin Foods L.C., USA), ein Luteinextrakt aus Marigold.

Probenbezeichnung	Wirkstoff	Ölbasis
New Focus™ Spray (NFS)	Luteinextrakt	Posphatidylcholin (aus Sonnenblumenöl)-Glycerin-Komplex, Ölsäure

3.2 METHODEN

3.2.1 Herstellung der lutein- bzw. luteinesterhaltigen Formulierungen

3.2.1.1 *Physikalische Untersuchungen mit wirkstofffreien Miniemulsionen*

Die grundlegende Zusammensetzung der Miniemulsionen hinsichtlich der Komponenten der Öl- und Wasserphase sowie die Verwendung spezifischer Emulgiertechniken wurden vorab durch physikalische Stabilitätsuntersuchungen unter Einbezug der Partikelgrößen geprüft. Die konkreten Bezeichnungen, Bestandteile und Zuordnungen zu den Versuchen sind im Anhang aufgeführt. Zur besseren Übersicht werden in den Kapiteln Ergebnisse und Diskussion entscheidende Bestandteile direkt angegeben.

3.2.1.2 *Herstellung von reinen Ölphasen mit den Wirkstoffträgern in Öl*

Eine definierte Menge des Wirkstoffes wird eingewogen und mit der entsprechenden Menge Öl vermengt. Anschließend wird die Lösung für 2-6 h bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln invertiert (60 rpm), um eine homogene Ölphase zu erhalten. Die Herstellung erfolgte stets mindestens in Dreifachbestimmung.

3.2.1.3 *Herstellung der Miniemulsionen MO3 bis MO6 unter Verwendung von Ultraschall*

Im ersten Schritt wird die Ölphase der Miniemulsionen hergestellt. Dazu wird der Wirkstoff eingewogen, in MCT-Öl gelöst und für mindestens 2 h bis zur vollständigen Homogenität bei RT im Dunkeln invertiert (60 rpm). Die gesondert hergestellte Wasserphase besteht in den Präemulsionen ausschließlich aus den Emulgatoren und Leitungswasser. Das Zusammenführen der Öl- und Wasserphase erfolgt durch Mischen im Verhältnis 1:2,67 (v/v) und anschließendem Invertieren bei 500 rpm für 10 min im Schüttler. Unter Verwendung des Ultraschallhomogenisators Sonopuls® HD 2070 (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Deutschland) wird die Lösung auf Eis mit einer Beschallungszeit von 10 min (MO3, MO4) bzw. 20 min (MO5, MO6) und einem Energieeintrag von 70 Watt zu einer homogenen Emulsion überführt. Die Lagerung der Präemulsionen erfolgt bei 4°C im Dunkeln. Die Codierung und Zusammensetzungen der Präemulsionen sind der Tabelle 7 zu entnehmen. Die genaue Grundzusammensetzung der jeweiligen Formulierung findet sich im Anhang in der Tabelle A 8.

3.2.1.4 Herstellung von Miniemulsionen und Fertigrezepturen unter Verwendung von Hochdruckhomogenisation

Analog zur Anfertigung der Formulierungen erfolgt die Herstellung der Ölphase mit dem Träger des Wirkstoffes, welcher eingewogen und im jeweiligen Öl (MCT- bzw. Rapsöl) gelöst wird. Das Lösen erfolgt über Invertieren im Dunkeln bis zur vollständigen Homogenität. Ebenso wird die Wasserphase gesondert hergestellt. Sämtliche Bestandteile werden eingewogen und in einem Becherglas mit dem entsprechenden Volumen Leitungswasser unter Rühren zusammengeführt (Tabelle A 7, -A 9). Anschließend erfolgt die moderate Mischung der Ölphase mit Wasserphase im Verhältnis 1:2,67 (v/v) unter Verwendung eines Magnetührstäbchens auf einem Rührer. Zur Herstellung von Miniemulsionen werden die Lösungen zunächst mit einem Ultraschallhomogenisators (IKA Dispergierer Ultraturrax, IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Deutschland) für 5 min bei 200 Watt auf Eiswasser vorbehandelt. Im Folgenden werden die Lösungen sechsmalig im Hochdruckhomogenisator AVP Gaulin AP 40 (SPX Flow Inc., USA) mit 710 bar behandelt. Die Lagerung der Miniemulsionen erfolgt bei 4°C im Dunkeln. Die Codierung und Zusammensetzungen der Miniemulsionen und Fertigrezepturen sind der Tabelle 6 und Tabelle 8 zu entnehmen.

3.2.2 Quantitative und qualitative Analytik von Lutein und Luteinestern mittels RP-HPLC

Prinzip

Chromatographische Analyseverfahren können die Trennung von Substanzgemischen nach den spezifischen physikalischen und chemischen Eigenschaften der zu analysierenden Substanzen bzw. Wirkstoffe ermöglichen. Dabei passiert die zu untersuchende Substanz zusammen mit einem flüssigen Laufmittel (mobilen Phase) eine Trennsäule, welche Träger eines festen Adsorbens (stationären Phase) ist. Die Trennung der Analyten beruht auf den unterschiedlichen Affinitäten der Moleküle des Probengemisches zu dieser stationären Phase. Bei der in der Praxis am häufigsten angewendeten Umkehrphasenflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC, *Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography*) treten die Moleküle in Abhängigkeit ihrer eigenen Polarität unterschiedlich stark mit der Säulenmatrix in Wechselwirkung, d.h. die Trennung der Substanzen erfolgt nach ihrer Hydrophobizität. Dabei ist die stationäre Phase (Silicagel) infolge einer chemischen Modifikation hydrophob und unpolar. Die mobilen Phasen sind meist Mischungen aus Wasser oder Puffer und Acetonitril oder Methanol. Bei isokratischen Bedingungen wird die Zusammensetzung der mobilen Phase während der Analyse stets

konstant gehalten. Alternativ ist die Trennung auf Basis eines Gradienten möglich. Durch definierte Variation der Anteile wässriger und organischer Anteile im Eluenten zu bestimmten Zeitpunkten wird ein Eluentengradient erzeugt, der eine Auftrennung der Komponenten im zu analysierenden Gemisch nach Größe und Polarität ermöglicht. Die Elution einzelner zu detektierender Substanzen kann in Abhängigkeit ihrer Eigenschaften durch spezifische Detektoren (UV-VIS, Fluoreszenz) erfasst und mit Hilfe der entsprechenden Software an einem PC zur Auswertung übertragen werden. Die Darstellung erfolgt in Chromatogrammen, welche in Abhängigkeit der Zeit diese detektierten Signale in Form von Peakflächen sichtbar machen und eine Darstellung der sog. „*area under the curve*“ (AUC) ermöglichen. Die qualitative Auswertung dieser Chromatogramme kann z.B. bei Verwendung von UV-VIS Detektoren anhand von bekannten Retentionszeiten erfolgen. Eine quantitative Auswertung erfolgt mit Hilfe der Kalibrierung, welche durch Verwendung interner, externer Standards und/oder Standardaddition durchführbar ist.

Durchführung

Die quantitative Analytik von Lutein und Luteinestern mittels RP-HPLC erfolgt am Shimadzu HPLC-System. Die Bedingungen sind der Tabelle 10 zu entnehmen. Die verwendete Methode basiert auf den Publikationen von Piccaglia et al. (1998) und Khalil et al. (2012) [140, 147]. Für die quantitative Analytik mittels RP-HPLC wird ein UV-VIS Detektor verwendet. Es erfolgt eine externe Kalibrierung mit Lutein. Da reines Lutein eine sensible, instabile Substanz ist, wird mit jeder Messreihe eine spezifische externe Kalibrierung durchgeführt. Dazu erfolgt zunächst die Einwaage von 1 mg reinem Lutein und Lösung in 1 mL Ethanol. Nach Schütteln der Lösung über einen Zeitraum von maximal 3 h bei RT im Dunkeln wird aus dieser Stammlösung die Konzentrationsreihe (1-30 µg/mL) pipettiert mit deren Hilfe die Quantifizierung von Lutein, seiner Isomere und Esterformen als Luteinäquivalent (LÄ) in µg/mL erfolgen kann. Gleichzeitig wird die Reinheit der Stammlösung Lutein (1 mg/mL) unter Anwendung des bekannten Extinktionskoeffizienten von Lutein in Ethanol bei einer Wellenlänge von 445 nm photometrisch bestimmt [148].

Das Auftragen der detektierten Peakflächen zur jeweiligen Konzentration von Lutein in einem Streudiagramm ermöglicht die Aufstellung einer Geradengleichung der linearen Regression. Dabei gilt das Bestimmtheitsmaß R^2 als Gütemaß für die Beschreibung des linearen Zusammenhangs. Die qualitative Auswertung der erhaltenen Chromatogramme und die Zuordnung von

Lutein und der verschiedenen Luteinester in den jeweiligen Proben erfolgten anhand der Retentionszeiten auf Grundlage der Publikation [147].

Tabelle 10 Bedingungen für die quantitative Analytik von Lutein und seiner Esterformen mittels RP-HPLC am Shimadzu HPLC-System modifiziert nach [140, 147].

RP-HPLC = *Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography*-Umkehrphasenflüssigkeitschromatographie

Säule	PerfectSil Target ODS-3; 3,0 μm , 150 x 4,6 mm
Vorsäule	PerfectSil Target ODS-3; 3,0 μm , 20 x 4,6 mm
Eluent A	Acetonitril-Methanol (9:1, v/v)
Eluent B	Ethylacetat
Detektionswellenlänge	445 nm
Säulenofen	30°C
Flussrate	0,6 mL/min (B [%]: 20)
Injektionsvolumen	10 μL
Gradient Eluent B	15 min 100% , 30 min 20%, 31 min STOP

3.2.3 Photometrische Bestimmung der Reinheit der Stammlösung Lutein zur externen Kalibrierung

Zur Bestimmung der Stoffmengenkonzentration von Lutein in Ethanol können zwei Aspekte genutzt werden. Lutein ist ein orangefarbenes Xanthophyll, dessen Absorptionsmaximum bei 445 nm liegt. Weiterhin ist der Extinktionskoeffizient von Lutein in Ethanol bei 445 nm aus der Literatur bekannt. Er beträgt $2.550\%^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [148]. Die Reinheit des externen Standards Lutein kann daher bestimmt werden. Die Bestimmung erfolgt stets parallel zur Herstellung der Standardkonzentrationsreihe aus der entsprechenden Stammlösung (1 mg Lutein/mL). Dies ermöglicht die korrekte Konzentrationsberechnung in den Ansätzen der externen Standardreihe. Eine Anwendung der photometrischen Bestimmung für die Esterformen des Luteins ist aufgrund des fehlenden spezifischen Extinktionskoeffizienten nicht möglich. Nach Verdünnung der Stammlösung Lutein mit Ethanol (1:100, v/v) wird die Dichte von Ethanol bzw. von der verdünnten Stammlösung (Maßlösung MII) ermittelt. Dazu werden je 1 ml MII in Mehrfachbestimmung gewogen. Anschließend folgt eine weitere Verdünnung von MII mit Ethanol (1:5, v/v, Maßlösung MIII). Der Nullabgleich des Photometers erfolgt unter Verwendung von reinem Ethanol in einer Halbmikroküvette bei einer Wellenlänge von 445 nm. Anschlie-

ßend können die Extinktionen von MIII in Dreifachbestimmung gemessen werden. Die Berechnung der Luteinkonzentration erfolgt in der Einheit Massenprozent. Im Folgenden ist die Berechnung der Reinheit von Lutein in der Stammlösung Lutein 1 mg/mL aufgezeigt. Diese erfolgte stets in Doppelbestimmung.

Luteinkonzentration in der Küvette:

$$(1) E = \varepsilon \cdot c_1 \cdot d \quad (3-1)$$

$$(2) c_1 = \frac{E}{\varepsilon \cdot d} \quad (3-2)$$

$$(3) c_1 [\%] = \frac{E}{\frac{2.550 \cdot 1 \text{ cm}}{\% \cdot \text{cm}}} \quad (3-3)$$

mit E : Extinktion, ε : Extinktionskoeffizient, c_1 : Luteinkonzentration in der Küvette, d : Schichtdicke der Küvette

Luteinkonzentration in der Maßlösung MIII korrigiert um Verdünnungsfaktor:

$$c_2 = c_1 \cdot 500 \quad (3-4)$$

mit c_2 : Luteinkonzentration in der Maßlösung MIII

Luteinkonzentration in der Stammlösung:

$$c_{\text{Stammlösung}} = \frac{(c_2 \cdot m_1)}{m_2} \quad (3-5)$$

mit $c_{\text{Stammlösung}}$: Luteinkonzentration in der Stammlösung, m_1 : Gewicht von 100 mL Maßlösung, m_2 : eingewogene Menge Lutein in der Stammlösung

3.2.4 Extraktion lutein- und luteinesterhaltiger Proben zur Analyse mittels RP-HPLC

Zur Etablierung einer geeigneten Extraktionsmethode von Lutein und Luteinestern aus den Proben wurden Methoden zur Extraktion von Carotinoiden herangezogen und entsprechend modifiziert angewendet [53, 140]. Das Extraktionsprotokoll ist der nachfolgenden Tabelle 11 zu entnehmen. In Kürze: Die Extraktion lutein- bzw. luteinesterhaltiger Proben erfolgt mit einem organischen Lösungsmittelgemisch (iCheck™, Bioanalyt GmbH, Deutschland). Es werden 50 bzw. 100 µL Probenaliquot mit 1 mL deionisiertem Wasser in ein Reaktionsgefäß überführt und gevortext. Nach Zugabe von 1 mL Extraktionsmittel werden die Proben für 15 min über Kopf geschüttelt und anschließend bei 4.500 rpm für 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion wird zweimal wiederholt, die jeweiligen Überstände vereint und bis zur vollständigen Trockenheit unter einem Stickstoffstrom abgedampft. Der trockene Rückstand wird in einer definierten Menge Isopropanol resuspendiert und die homogene, klare Probe direkt bzw. verdünnt in ein Vial zur RP-HPLC Analyse überführt.

Tabelle 11 Modifiziertes Extraktionsprotokoll zur quantitativen Analytik von lutein- bzw. luteinesterhaltigen Proben. Modifiziert nach [53, 140].

rpm = round per minutes-Umdrehungen pro Minute.

Finales Extraktionprotokoll lutein- bzw. luteinesterhaltige Proben

- (1) Probennahme und Zugabe von destilliertem Wasser mit definiertem Volumen
 - (2) Zugabe eines Extraktionsmittels (iCheck™, Bioanalyt GmbH, Deutschland) mit definiertem Volumen
 - (3) 15 min schütteln, Zentrifugation 10.000 rpm für 10 min
 - (4) definiertes Volumen abnehmen, Wiederholung (3) bis (4)
 - (5) Überstände vereinen und unter Begasung mit Stickstoff abdampfen
 - (6) Rückstand in Isopropanol resuspendieren
 - (7) vortexen, 5 min Ultraschall
 - (8) bei Bedarf Zentrifugation 5.000 rpm für 5 min oder mit Spritzenfilter (0,20 µm) filtern
 - (9) in HPLC-Vial überführen
-

3.2.5 Partikelgrößenanalyse zur physikalischen Charakterisierung von Miniemulsionen

Die Analyse der Partikelgrößen dient der Überprüfung, ob die gewählten Komponenten und Emulgiertechniken zur Herstellung von Miniemulsionen mit gewünschter Partikelgröße ($\leq 1,0 \mu\text{m}$) geeignet sind. Weiterhin kann überprüft werden, inwiefern Partikelgröße und Tröpfchenverteilung über einen spezifischen Zeitraum stabil bleiben. Alle Messungen zur Partikelgrößenbestimmung erfolgten am Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung (IAP) in Golm. Die Analyse war anfangs mit dem Gerät Mastersizer X der Firma Malvern Instruments Ltd. (Niederlande) durchgeführt worden. Im weiteren Verlauf wurden, aufgrund von personellen und räumlichen Umstrukturierungen im IAP, die Partikelgrößenanalyse der Miniemulsionen MO3, MO4, MO5 und MO6 mit dem Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Niederlande) untersucht. Beide Funktionsweisen werden hier im Kurzen erläutert.

3.2.5.1 Mastersizer X

Prinzip

Im Mastersizer X kommt die Laserbeugungsanalyse (Laserdiffraktometrie) zur Anwendung. Dabei wird ein Laserstrahl generiert. Dieser Lichtstrahl ist monochromatisch, das bedeutet die Photonen im Laserstrahl emittieren alle mit der gleichen Wellenlänge. Trifft dieser Laserstrahl auf eine dispergierte Probe, wird das einfallende Licht in Abhängigkeit der Eigenschaften der Partikel in einem bestimmten Winkel gebeugt. Große Partikel streuen dabei das Licht mit einem kleinen Winkel zum Lichtstrahl, kleine Partikel dagegen streuen in einem großen Winkel (Abbildung 7 a). Mit der Messung werden aufgrund der Vielzahl von vorhandenen Partikeln in einer Formulierung entsprechend viele Beugungsmuster detektiert (Abbildung 7 b). Das Analysegerät fasst diese zusammen, die Software des Systems prüft unter Anwendung komplexer Algorithmen, inwiefern bestimmte Beugungsmuster und zugehörige Partikelgrößen mit den detektierten Mustern übereinstimmen. Die Darstellung der Ergebnisse ist als Verteilungskurve oder als Angabe der Partikeldurchmesser möglich. Die Verteilungskurve ermöglicht die Segmentierung der Partikel und die Aussage, ob in der Formulierung Partikel mit einer spezifischen Größe (monomodale Verteilung) vorliegen. Mittels der Angabe des Partikeldurchmessers ist es möglich die Partikelgrößenverteilung als Wert zu definieren. Die Angabe der Partikelgröße D50 stellt dabei die mittlere Partikelgröße dar, D10 entsprechend die kleinsten Partikel und D90 die größten Partikel in einer Lösung. Man unterscheidet außerdem zwischen numerischem und volumetrischem Durchmesser. Der numerische Durchmesser bezieht sich auf die

Anzahl der Partikel, der volumetrische Durchmesser auf das Volumen der Partikel. In den vorliegenden Untersuchungen wird stets der volumetrische Durchmesser überprüft. Es ist so möglich die exakte Verteilung der Emulsion auf die Partikel zu betrachten.

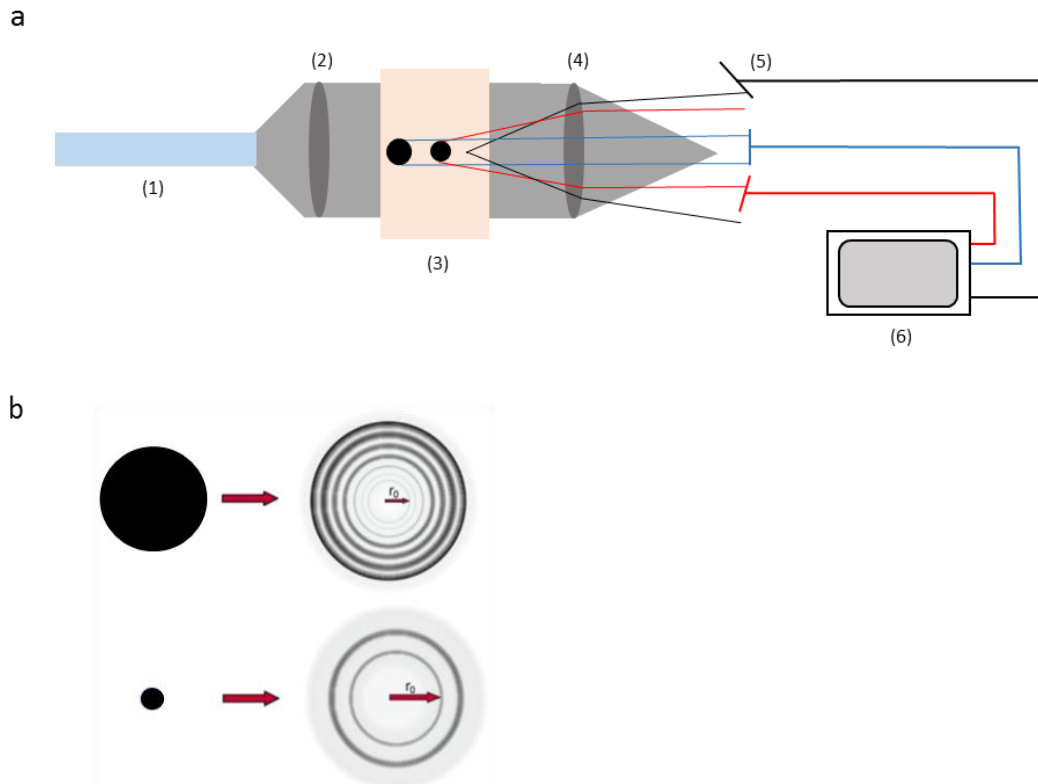


Abbildung 7 Grundlagen der Laserbeugungsanalyse (Laserdiffraktometrie).

a) schematischer Aufbau eines Laserdiffraktometers: (1) Laser, (2) optisches System, (3) Messzelle, (4) Fourier-Linse, (5) Detektoren, (6) Computer/Ausgabeeinheit. Modifiziert nach [149, 150]. b) Partikelgrößen und deren zugehörige Beugungsmuster: Große Partikel (oben) rufen ein Beugungsmuster mit hohen Wellenbergen, aber geringen Abständen (r_0) hervor. Konträr ist das Beugungsmuster eines kleinen Partikels (unten) [149].

Durchführung

Die Rührinheit des Mastersizer X wird mit deionisiertem Wasser befüllt, der Laser auf die Detektoren ausgerichtet und zunächst der Hintergrund gemessen. Die Messung erfolgt unter Verwendung einer 45 mm Linse. Vor der Messung wird das Probengefäß mit der jeweiligen zu untersuchenden Lösung einmal invertiert. Danach erfolgt die Probennahme per Einwegtropfer aus der Mitte der Miniemulsion und Überführung in die Rührinheit. Zunächst muss die Partikelkonzentration in der Probe überprüft und anwendbar eingestellt werden. Eine anwendbare Konzentration der Partikel liegt vor, wenn die Laserintensität beim Passieren der Probelösung

durch die Messzelle zwischen 10% und 30% abnimmt. Die Detektoren könnten nicht im ausreichenden Maße das gebeugte Licht erfassen, würden zu wenig Partikel in die Messzelle eingebracht werden. Bei einer zu hohen Anzahl an Partikeln würde das gebeugte Licht an anderen Partikeln erneut gebeugt werden. Liegt die korrekte Partikelkonzentration vor, kann die Partikelgrößenverteilung gemessen und analysiert werden. Nach der Messung wird die Rührereinheit mittels Pipette geleert und mit deionisiertem Wasser gespült.

3.2.5.2 Zetasizer Nano ZS

Prinzip

Das Analysegerät Zetasizer Nano ZS untersucht Proben mittels Messung der dynamischen Lichtstreuung (Photonenkorrelationsspektroskopie). Untersuchungen der Partikelgrößen einer Lösung erfolgen bei dieser Methode aufgrund unterschiedlicher Lichtstreuungsintensitäten zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Proben werden mit Laserlicht bestrahlt und die Schwankung der Intensität der Lichtstreuung, die durch die Brownsche Molekularbewegung der Partikel hervorgerufen wird, mittels Photodiode detektiert (Abbildung 8). Aufgrund der gemessenen Schwankungen bzw. Interferenzen der Intensität der Lichtstreuung kann die Größe der Partikel in der Probe ermittelt werden [151]. Je größer die Partikel sind, desto langsamer bewegen sie sich im Dispersionsmedium und desto geringer ist die Schwankung der Streulichtintensität bzw. die Interferenz ist ähnlich [149]. Die Analyseergebnisse werden als Partikeldurchmesser angegeben. Die Berechnung erfolgt durch die Software des Computers unter Verwendung der gemessenen Streulichtsignale und des ermittelten Partikelradius r .

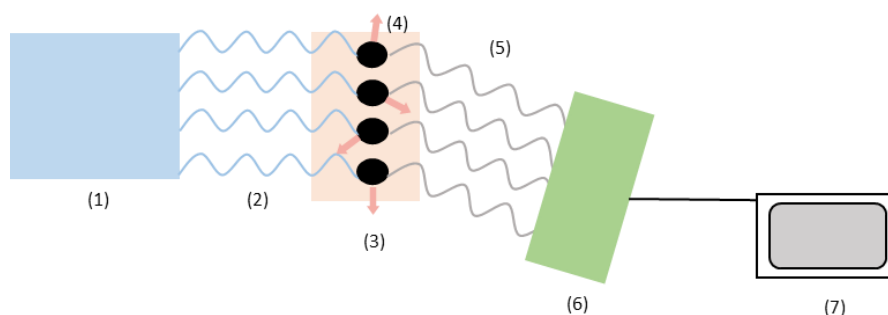


Abbildung 8 Grundlagen der Analyse dynamischer Lichtstreuung (Photonenkorrelationsspektroskopie).

Schematischer Aufbau und Strahlengang von Partikeln einer Lösung in einem Photonenkorrelationsspektroskop: (1) Laser, (2) einfallendes Licht, (3) Messzelle, (4) diffundierender Partikel, (5) gestreutes Licht, (6) Photodiode, (7) Computer/Ausgabeeinheit. Modifiziert nach [149].

Durchführung

Zur Ermittlung der Partikelgröße mittels Malvern Zetasizer Nano ZS wird jeweils ein Aliquot der hergestellten Miniemulsionen 1:400 mit Leitungswasser verdünnt. Die Probe wird nun in eine Einwegküvette (Polystyrol) überführt und die Küvette im Messgerät positioniert. Die Messungen erfolgen im Winkel von 173° bei Raumtemperatur und einer Wellenlänge von 445 nm.

3.2.6 Bestimmung des Strömungspotentials mittels Partikelladungsdetektor PCD-03

Die Messungen des Strömungspotentials ausgewählter Miniemulsionen wurden von Dr. Bernd-Reiner Paulke vom IAP, Golm vorgenommen. Das Messprinzip und die Durchführung sind im Folgendem kurz beschrieben.

Prinzip

Partikelladungsdetektoren ermöglichen die Bestimmung der Oberflächenladung von kolloidalen Dispersionen anhand der einfachen Messung des Strömungspotentials [152]. Im Aufbau besteht der Detektor aus einer Einheit mit einer Messzelle aus PTFE (Teflon), in der sich ein Verdrängungskolben befindet. In die Messzelle wird die zu untersuchende Probe gegeben, wobei vorhandene kolloidale Moleküle aus der Dispersion unter dem Einfluss von van-der-Waals-Kräften an der Teflon-Oberfläche des Kolbens und an der Wand der Messzelle adsorbieren [153]. Dagegen bleiben Gegenionen in der Lösung zurück. Durch Auf- und Abbewegungen des Kolbens (oszillierend) werden die Gegenionen von den an den Oberflächen befindlichen Partikeln abgeschert bzw. getrennt. Die zurückgebliebenen Partikel erzeugen ein Strömungspotential, welches von zwei in der Messzelle platzierte Goldelektroden erfasst und aufgezeichnet wird. Das Strömungspotential wird vom Gerät in mV angegeben. Die Anzeige des Vorzeichens gibt Auskunft über die Teilchenladung (positiv bzw. negativ).

Durchführung

Die Messung erfolgt am Partikelladungsdetektor PCD-03 (BTG Müttek GmbH, Deutschland). In den Messbecher aus Teflon werden jeweils 10 mL Millipore-Wasser als einheitliches Basismedium vorgelegt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 100 μL der zu untersuchenden Miniemulsion. Die mechanische Scherung der Probe durch den oszillierenden Kolben wird gestartet. Nach Einstellung eines gleichbleibenden Strömungspotentials an der digitalen Anzeige kann diese als Messergebnis notiert werden. In der experimentellen Anordnung bildet das Strömungspotential zugleich die Oberflächenladung der Öltröpfchen bzw. Partikel in den Miniemulsionen ab. Die Gegenionen werden ausgeblendet.

3.2.7 Physikochemische Charakterisierung von Lutein und Luteinestern in Ölen, Miniemulsionen und Fertigrezepturen

Prinzip

Lutein- und luteinesterhaltige Formulierungen werden unterschiedlichen physikalischen und/oder chemischen Bedingungen ausgesetzt und Veränderungen der Wirkstoffkonzentrationen erfasst. Nach Inkubation erfolgt die Extraktion des Wirkstoffes aus den jeweiligen Formulierungen (3.2.4). Die Konzentration des Wirkstoffes als Luteinäquivalent in mg/mL wird mittels RP-HPLC chromatographisch bestimmt (3.2.2). Eine Veränderung der zu untersuchenden Wirkstoffkonzentration wird prozentual dargestellt, wobei die Konzentration zum Zeitpunkt 0 min bzw. zur Kontrollprobe als 100% Wert angenommen wird.

3.2.7.1 Lagerstabilität der Wirkstoffe

Luteinester in MCT-Öl

Zur Untersuchung der Lagerstabilität von Luteinestern wird der Wirkstoffträger Oleoresin in MCT-Öl (60 mg/mL) gelöst (3.2.1.2). Aliquote der Ölphasen werden bei RT, 4°C und -20°C im Dunkeln gelagert. Die quantitative Analyse des Luteinäquivalents in mg/mL in der Ölphase erfolgt zum Zeitpunkt 0 min, 10 d, 21 d, 6 Wochen, 3 Monate sowie 6 Monate.

Lutein und Luteinester in Miniemulsionen

Nach der Herstellung (3.2.1.3, 3.2.1.4) werden die Formulierungen bei einer Temperatur von 4°C im Dunkeln gelagert. In regelmäßigen Abständen werden den Miniemulsionen Proben entnommen, die Konzentration des bzw. der Wirkstoffe als Luteinäquivalent analysiert sowie mögliche qualitative Umbauprozesse (Umbau, Hydrolyse) mittels RP-HPLC überprüft. Weiterhin erfolgt die Bestimmung des pH-Wertes der Formulierungen.

Luteinester in Fertigrezepturen

Nach der Herstellung (3.2.1.4) werden die Formulierungen bei einer Temperatur von 4°C im Dunkeln gelagert. In monatlichen Abständen werden den Fertigrezepturen Proben entnommen, die Konzentration der Luteinester als Luteinäquivalent analysiert sowie mögliche qualitative Umbauprozesse (Umesterung, Hydrolyse) mittels RP-HPLC überprüft. Weiterhin erfolgt die Bestimmung des pH-Werts der Formulierungen. Die Emulsionen 126 und 127, welche ausschließlich Biozate 1 als Emulgator enthielten, wiesen bereits nach 2 Monaten eine zähe Konsistenz auf. Eine homogene Probenentnahme sowie Analyse war nicht mehr möglich.

Lutein in einem kommerziell erwerblichen Nahrungsergänzungsmittel (Darreichungsform: Spray)

Analog zu den Fertigrezepturen 122 bis 127 wird das kommerziell erhältliche Produkt New Focus™ Spray (NFS) der Firma Good Health Naturally, USA, welches den Wirkstoff Lutein enthält, untersucht. Die Lagerung des Produktes erfolgt für 10 Monate bei einer Temperatur von 4°C im Dunkeln. Zusätzlich zur quantitativen und qualitativen Analyse des Wirkstoffes wird stets der pH-Wert der Produktlösung bestimmt.

3.2.7.2 Stabilität der Wirkstoffe gegenüber Ultraschall

Aliquote der Formulierungen werden für 5, 10 und 60 min im Ultraschallbad Sonorex RK 100 (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Deutschland) im Dunkeln bei Raumtemperatur behandelt. Im Anschluss erfolgt die Extraktion der Proben (3.2.4). Die Wirkstoffkonzentrationen werden als Luteinäquivalent in mg/mL quantitativ und qualitativ mittels RP-HPLC bestimmt (3.2.2). Für jede untersuchte Formulierung werden unbehandelte Kontrollproben mitgeführt und analysiert. Mittels der Ergebnisse kann durch prozentuale Berechnungen ein Vergleich der Wirkstoffkonzentrationen ohne und mit der Ultraschallbehandlung erfolgen.

3.2.7.3 Stabilität der Wirkstoffe gegenüber physiologischen Temperaturbedingungen

Es werden verschiedene Formulierungen für 30 min bzw. 2 h bei 37°C im Dunkeln mäßig geschwenkt. Kontrollproben werden bei Raumtemperatur mitgeführt bzw. Proben zum Zeitpunkt 0 min analysiert. Im Anschluss erfolgt die Extraktion der Proben (3.2.4). Die Wirkstoffkonzentrationen werden als Luteinäquivalent in mg/mL quantitativ und qualitativ mittels RP-HPLC bestimmt (3.2.2). Im Anschluss kann durch prozentuale Berechnungen ein Vergleich der Wirkstoffkonzentrationen ohne bzw. vor und nach der Behandlung erfolgen.

3.2.7.4 Stabilität der Wirkstoffe gegenüber unterschiedlichen pH-Bedingungen

Die pH-Wert-Stabilität des Wirkstoffes bzw. der Wirkstoffkombinationen in verschiedenen Formulierungen wird anhand der Zugabe definierter pH-Lösungen (Tabelle A 10) untersucht. Dazu werden jeweils Aliquote der Emulsionen mit gleichem Volumen einer spezifischen pH-Lösung (100 mM Salzsäure pH 1,0 ± 0,2/ Leitungswasser pH 7,0 ± 0,2/ 0,1 mM Natronlauge pH 9,0 ± 0,2) über einen Zeitraum von 30 min bzw. 2 h bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die pH-Lösungen werden stets frisch hergestellt und der pH-Wert mittels pH-Meter überprüft. Kontrollproben werden bei Raumtemperatur mitgeführt bzw. Aliquote zum Zeitpunkt 0 min analy-

siert. Nach Extraktion der jeweiligen Proben kann die Wirkstoffkonzentration als Luteinäquivalent in mg/mL mittels RP-HPLC analysiert werden. Die Ergebnisse lassen nach prozentualen Berechnungen einen Vergleich der Wirkstoffkonzentrationen zwischen behandelten und unbehandelten Proben bzw. zwischen den verschiedenen pH-Milieus zu.

3.2.8 Charakterisierung der Resorptionsverfügbarkeit von lutein- und luteinesterhaltigen Formulierungen *in vitro*

Die Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Lutein und Luteinestern *in vitro* stützen sich in dieser Arbeit auf die Simulation der Bedingungen in den Passagen des Verdauungstrakts *in vitro*. Dies macht eine Darstellung der Resorptionsverfügbarkeit von Lutein bzw. Luteinester nach Nahrungsaufnahme aus den kolloidalen Formulierungen möglich. Dazu werden ausgewählte Proben mit synthetischen Verdauungsflüssigkeiten inkubiert. Die Zusammensetzungen sowie Modifikationen hinsichtlich der Modellparameter und Enzyme erfolgen u.a. in Anlehnung an Publikationen. So wird z.B. der Verdau von eisenhaltigen Nahrungsmitteln *in vitro* bereits von Miller et al. (1981) beschrieben [154]. Darauf aufbauend wurde von Garret et al. (1999) ein Model zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit von Carotinoiden aus der Nahrung konzipiert [155]. Dieses wiederum nahmen Reboul et al. (2006) auf und modifizierten es hinsichtlich der pH-Werte und Inkubationszeiten einzelner Passagen des Verdauungstraktes [156]. In Untersuchungen von Werner et al. (2011) wurde das Model durch eine simulierte, orale Phase ergänzt [83]. Modelle zum *in vitro*-Verdau von Nahrung und seinen Inhaltsstoffen dienen grundsätzlich der Prüfung der Resorptionsverfügbarkeit von Substanzen und ihrer Umsetzung während des Durchlaufens der Passage des Verdauungstraktes sowie resultierende strukturelle Veränderungen. D.h. es wird zunächst detektiert, inwiefern die definierten Substanzen unverändert bzw. chemisch modifiziert in welchen Konzentrationen den Enterocyten erreichen. Durch Darstellung einzelner Passagen können mögliche Um-, Abbauprozesse und mögliche Matrixeffekte aufgezeigt werden sowie Stabilitäten gegenüber pH-Milieu bzw. Enzymen definiert werden. Weiterhin kann geprüft werden, ob die Stoffe in ihrer bis dahin vorliegenden chemischen und physikalischen Struktur vom Enterocyten aufgenommen werden können.

3.2.8.1 *in vitro* Verdaumodell basic

Zunächst erfolgt die Definition eines allgemeinen laborinternen Verdaumodells für Lutein und Luteinester in kolloidalen Formulierungen. Der Wirkstoff selbst bzw. integriert in die jeweilige Formulierung wird unter kontrollierten physiologischen Bedingungen (Temperatur 37°C, kompartimentspezifischer pH-Wert und Enzymspektrum) mit synthetisch hergestellten Verdauungssäften über einen definierten Zeitraum *in vitro* inkubiert. Das Modell wird in weiteren Untersuchungen hinsichtlich Konzentrationen und Art des intestinalen Enzymgemisches verändert. Ausgewählte Passagen des Verdauungstraktes werden gesondert überprüft, um mögliche Einflüsse auf Lutein bzw. Luteinester vor dem Erreichen des Duodenums darstellen zu können. Die jeweiligen Verdauungssäfte werden an jedem Versuchstag frisch hergestellt. Die Zusammensetzung und die jeweilige Bezeichnung sind dem Anhang (Tabelle A 11) zu entnehmen. Das schematische Ablaufprinzip des *in vitro* Verdaumodells basic ist in Tabelle 12 dargestellt. Die Inkubation der Proben mit den jeweiligen Verdauungssäften erfolgt stets im Dunkeln. Zur Kontrolle werden stets unbehandelte Aliquote der Formulierungen mitgeführt. Die Extraktion und Quantifizierung mittels RP-HPLC erfolgt wie im Methodenabschnitt beschrieben (3.2.2, 3.2.4). Die Zugabe des Extraktionsmittels dient gleichzeitig dem Abstoppen des simulierten Verdauvorganges. Nach Auswertung der Messergebnisse kann durch prozentuale Berechnungen ein Vergleich der Wirkstoffkonzentrationen vor und nach der Inkubation mit Verdauflüssigkeiten erfolgen. Außerdem können qualitativ die Entstehung von Lutein bzw. möglicher Artefakte und Umbauprozesse überprüft werden.

Tabelle 12 *in vitro* Verdaumodell basic.

Laborinternes Verdauungsmodell für Versuche zur Resorptionsverfügbarkeit von sekundären Pflanzenstoffen *in vitro*. Modifiziert nach [83, 155, 156]. rpm = *round per minutes*, i.D. = im Dunkeln.

Simuliertes Kompartiment Synthetischer Verdauungssaft	Leitenzym	Versuchsbedingungen
Mundhöhle synthetischer Speichel AHS= <i>artificial human saliva</i>	α -Amylase aus dem Schweinepankreas	37°C pH 6,75 5 min/30 min, 65 rpm, i.D.
Magen synthetischer Magensaft AGF = <i>artificial gastric fluid</i>	Pepsin aus der Magen- schleimhaut vom Schwein	37°C pH 1,2 (Fastenzustand) 60 min/2 h, 65 rpm, i.D.
oberer Dünndarm synthetischer Intestinalsaft AIF = <i>artificial intestine fluid</i>	Pankreatin aus dem Schweinepankreas mit Gallensäureextrakt	37°C pH 6,8 \pm 0,1 2 h, 65 rpm, i.D.

3.2.8.2 *Wirkstoffverhalten von Lutein und Luteinestern in Miniemulsionen gegenüber synthetischen Verdauungssäften – Einzelkompartimente*

Aliquote der Miniemulsionen M1, M2, M3 und M4 werden in einem Mischungsverhältnis 1:1 (v/v) mit dem jeweiligen synthetischen Verdauungssaft bei 37°C und 65 rpm im Dunkeln inkubiert. Dabei beträgt die Behandlungszeit mit:

- AHS 5 min
- AGF 30 min bzw. 2 h
- AIF 30 min bzw. 2 h.

Die Zusammensetzung der synthetischen Verdauungssäfte ist identisch mit denen im *in vitro* Verdaumodell *basic* (Tabelle A 11). Nach Beenden der Inkubation werden die Proben gemäß dem Extraktionsprotokoll (3.2.4) aufgearbeitet und mittel RP-HPLC (3.2.2) analysiert. Die Menge an Luteinäquivalent in mg/mL wird ermittelt. Umbauprozesse werden anhand der Chromatogramme qualitativ eingeordnet. Abschließend kann ein Vergleich der Proben mit der jeweiligen mitgeführten Kontrolle erfolgen und prozentuale Veränderungen angegeben werden.

3.2.8.3 *Simulation der Metabolisierung von Lutein und Luteinestern in Miniemulsionen mittels chronologischen Passierens synthetischer, physiologischer Verdauungssäfte – in vitro Verdaumodell basic*

Lutein bzw. Luteinester in reiner Ölphase und in Miniemulsionen

Aliquote der Miniemulsionen M1, M2, M3 und M4 sowie Lutein 5% und Oleoresin in MCT-Öl werden in einem Mischungsverhältnis 1:1 (v/v) mit dem jeweiligen synthetischen Verdauungssaft bei 37°C und 65 rpm im Dunkeln chronologisch inkubiert. Dabei beträgt die Behandlungszeit mit:

- AHS 20 min
- AGF 2 h
- AIF 2 h.

Die Zusammensetzung der synthetischen Verdauungssäfte ist dem Anhang zu entnehmen (Tabelle A 11). Nach Beenden der Inkubation werden die Proben gemäß dem Extraktionsprotokoll (3.2.4) aufgearbeitet und mittel RP-HPLC (3.2.2) analysiert. Die Menge an Luteinäquivalent

in mg/mL wird ermittelt. Umbauprozesse werden anhand der Chromatogramme qualitativ eingeordnet. Abschließend kann ein Vergleich der Proben mit der jeweiligen mitgeführten Kontrolle erfolgen und prozentuale Veränderungen angegeben werden.

Luteinester in den Fertigrezepturen

Die simulative Metabolisierung der Fertigrezepturen 122 bis 125 erfolgt identisch den Inkubationsbedingungen wie zuvor für Ölphase und Miniemulsionen beschrieben.

3.2.8.4 *Modifizierung synthetischer humaner Verdaulichkeiten hinsichtlich ihrer Enzymausstattung in vitro*

Um zu untersuchen, ob die in den kolloidalen Formulierungen eingesetzten Luteinester als Substrat für Lipasen in Frage kommen, wird die Hydrolysefähigkeit unterschiedlicher Lipasen gegenüber Luteinestern geprüft. Dazu wird der synthetische Intestinalsaft des *in vitro* Verdaumodells *basic* hinsichtlich seiner physiologischen Enzymausstattung modifiziert, indem das Enzymgemisch Pankreatin durch alternative Esterasen bzw. Lipasen ersetzt wird. Die gewählten Enzyme wurden teilweise bereits von Breithaupt et al. (2002) und Granado-Lorenzo et al. (2007) in Untersuchungen *in vitro* einbezogen [67, 157]. Sie sind der Tabelle 13 zu entnehmen. Es werden Aliquote der kolloidalen Formulierungen zur physiologischen Pufferlösung mit definierter Enzymkonzentration gegeben (Verhältnis 1:1 (v/v)) und bei 37°C für verschiedene Zeitabstände im Dunkeln inkubiert. Eine unbehandelte Kontrolle der Probe bzw. der synthetischen Intestinalflüssigkeit wird stets mitgeführt. Die Extraktion und Quantifizierung mittels RP-HPLC erfolgt wie oben beschrieben (3.2.2, 0). Die Zugabe des Extraktionsmittels diente gleichzeitig dem Abstoppen des simulierten Verdauvorganges. Nach Auswertung der Messergebnisse kann durch prozentuale Berechnungen ein Vergleich der Wirkstoffkonzentrationen vor und nach der Inkubation mit Verdaulichkeiten erfolgen. Außerdem können die Entstehung von Lutein bzw. Derivate der Wirkstoffe, aber auch Umbauprozesse überprüft werden.

Tabelle 13 Alternative Enzyme zum Pankreatin im synthetischen Intestinalsaft des *in vitro* Verdaumodells basis.

TG = Trockengewicht.

Cholesterolesterase (porcine Bauchspeicheldrüse)	Aktivität \geq 300 U/mg TG
rekombinante Lipase B <i>Candida Antarctica</i> (<i>Aspergillus oryzae</i>)	Aktivität \geq 1.800 U/mg TG
Lipase FE01 (<i>Aspergillus oryzae</i>)	Aktivität > 13.000 U/mL Olivenöl
Lipase L8906 (<i>Mucor javanicus</i>)	Aktivität 696 U/mg TG
Lipase L9031 (<i>Mucor miehei</i>)	Aktivität 7,060 U/mg TG

3.2.8.5 Simulierte Esterhydrolyse durch Verseifung mit ethanolischer Kaliumhydroxidlösung (Positivkontrolle)

Um zu prüfen, inwiefern eine Hydrolyse der Luteinester in den kolloidalen Formulierungen überhaupt möglich ist, wird eine Esterhydrolyse durch Verseifung ausgewählter Formulierungen (MO5, MO6) mit ethanolischer Kaliumlauge durchgeführt. Neben chemischen Grundlagen wird u.a. die Publikation Sarkar et al. (2012) sowie mündliche Hinweise aus der Dissertation von Baldermann (2007) herangezogen, um ein laborinternes Protokoll mit standardisierten Bedingungen und effektiver Ausbeute aufzustellen [158, 159].

Zur Verseifung werden 2 mL wirkstoffbeladene Miniemulsion mit 2 mL 5 M ethanolischer Kaliumlauge versetzt und mit 4 mL Diethylether aufgefüllt. Es folgt eine Inkubation unter Schutzgas im Dunkeln über 24 h bei RT. Das Gemisch wird einmal mit deionisiertem Wasser gewaschen. Nach vollständigem Entfernen der Wasserphase wird die organische Phase unter Stickstoffbegasung abgedampft. Nach Rückwaage des teilweise öligen Extraktückstandes kann dessen Reinheit durch Lösen in Ethanol photometrisch bestimmt sowie eine Quantifizierung von Lutein- und Luteinestern mittels RP-HPLC vorgenommen werden (3.2.2-0).

3.2.9 Zellkultur

3.2.9.1 Allgemeine Zellkulturarbeiten

Die Kultivierung der Zellen erfolgt in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C, einer relativen Luftfeuchte von 95% und einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5%. Alle Arbeiten werden grundsätzlich unter der Sterilwerkbank durchgeführt, um Kontaminationen durch Bakterien oder Pilze zu vermeiden. Die Zusammensetzung der verwendeten Medien, Puffer und Lösungen sind dem Anhang zu entnehmen (8.1.1.3).

Zellkultivierung Zelllinie Caco-2

Sämtliche Zellkulturversuche erfolgen mit der Zelllinie Caco-2 (*American Type Cellculture Collection*: NCI-PBCF-HTB37). Die Zelllinie wurde in den 1970er Jahren von Jorgen Fogh (Sloan-Kettering Cancer Research Institute) aus einem humanen kolorektalen Adenokarzinom (**Cancer coli-2**) isoliert und zu einer kontinuierlichen Zelllinie entwickelt/immortalisiert [160]. Die Zellen weisen morphologisch, wie auch funktionell die Eigenschaften von Enterocyten auf und sind somit dem resorbierenden Epithel des menschlichen Dünndarms ähnlich. Caco-2 Zellen bilden mit dem Wachstum einen epithelartigen Monolayer, der durch Membranproteine den Tight junctions eng verbunden ist. Weiterhin exprimieren die Zellen typische Verdauungsenzyme des Dünndarms, besitzen verdauungsrelevante Transportproteine und produzieren eine Vielzahl von Cytokinen (Tabelle 14) [161]. Die Kultivierung der Zellen erfolgt im Flüssigmedium *Minimum Essential Medium* (MEM) Eagle. Die Subkultivierung der Zellen wird alle 2 bis 4 Tage durchgeführt.

Tabelle 14 Charakteristische Merkmale der Zelllinie Caco-2 nach [161].

GLUTx = Glukosetransporter x, SGLT 1 = Natrium/Glukose Cotransporter, IL-x = Interleukin x, TNF α = Tumornekrosefaktor α , TGF- β 1 = *Transforming Growth Factor β 1*, TSLP = Thymus-Stroma-Lymphopoetin.

Wachstumsverhalten	adhärente, monomolekulare Epithelzellschicht
Zelldifferenzierung	14-21 Tage nach Konfluenz unter Standardkultivierungsbedingungen
Zellmorphologie	Polar, Tight junctions und Bürstensaummembran auf apikaler Seite
elektrische Parameter	hohe elektrische Widerstandsfähigkeit
Verdauungsenzyme	exprimieren die typischen Verdauungsenzyme, Membranpeptidasen und Disaccharidasen des Dünndarms (u.a. Lactase, Aminopeptidase N, Sucrase-Isomaltase, Dipetidylpeptidase IV)
aktiver Transport	Aminosäuren, Glukose, Vitamine, Hormone
membranständige Ionenporter	Na ⁺ /K ⁺ ATPase H ⁺ /K ⁺ ATPase, Na ⁺ /H ⁺ Austausch, Na ⁺ /K ⁺ /Cl ⁻ Cotransport, apikale Cl ⁻ Kanäle
membranständige Non- Ionenporter	<i>Multidrug-Resistance-Protein 1</i> , <i>Multidrug-Resistance-Related Protein</i> , <i>lung cancer-associated resistance Protein</i>
Rezeptoren	Vitamin B12, Vitamin D3, EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), Glukosetransporter (GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT5, SGLT1)
Cytokine	IL-6, IL-8, TNF α , TGF- β 1, TSLP, IL-15

Inkulturnahme kryokonservierter Aliquote von Caco-2

Die Zellen werden zügig aufgetaut, vorsichtig in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und mit 10 mL Kulturmedium (Tabelle A 12) gemischt, um das zytotoxische Dimethylsulfoxid (DMSO) aus dem Konservierungsmedium auf 1% zu verdünnen. Nach Abzentrifugieren des Mediums (4°C/10 min/300 rpm) wird der Überstand mit Hilfe einer sterilen Absaugvorrichtung entfernt. Die Zellen werden in 5 mL Kulturmedium (Medium) resuspendiert und die Zellzählung sowie die visuelle Überprüfung der Vitalität der Zellen mittels Trypanblau-Ausschlusstest (siehe 3.2.9.2) vorgenommen. Anschließend wird die gewünschte Anzahl von Zellen in ein Kulturgefäß (Flasche 25 cm²) überführt, in das bereits das entsprechende Mediumvolumen vorgelegt wurde. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank erfolgen die visuelle Kontrolle der Zellen unter dem Mikroskop und ein Mediumwechsel.

Passagieren von adhärennten Zellen

Für die Absorptionsuntersuchungen und Untersuchung zytotoxischer Effekte von Substanzen ist ein ungehindertes, exponentielles Wachstum der Zellen notwendig. Die Zellen werden deshalb bei einer Konfluenz von ca. 80% passagiert. Vor der Subkultivierung erfolgt die visuelle Überprüfung der Zellen unter dem Mikroskop hinsichtlich möglicher Kontaminationen oder morphologischer Veränderungen. Unter sterilen Bedingungen wird zunächst das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS Puffer) gewaschen und vorsichtig Trypsin/EDTA (Trypsin) in das Kulturgefäß gegeben. Die Zugabe des Enzyms Trypsin führt zur Lösung von Zell-Zell-Verbindungen und Entfernen der Zellen vom Gefäßboden. Nach achtminütiger Inkubation im Brutschrank wird das Ablösen der Zellen mikroskopisch untersucht und durch Zugabe von Kulturmedium die Aktivität von Trypsin gestoppt. Die Suspension wird behutsam mit einer Pipette resuspendiert, um die Zellen zu vereinzeln. Ein Aliquot der Zellsuspension dient der Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Ausschlusstest (siehe 3.2.9.2). Die restliche Zellsuspension wird zentrifugiert (4°C/10 min/300 rpm), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in Medium resuspendiert. Entsprechend der Auswertung aus der Zellzahlbestimmung kann die Aussaat der Zellen im Medium durch Vorverdünnung oder durch direkte Zugabe in ein Kulturgefäß (Flasche 75 cm²) erfolgen.

Kryokonservierung von Zellen

Mit wachsender Passagezahl sind Zellen langfristig exogenen Einflüssen ausgesetzt, die u.a. zu Mutationen und Transformationen in den Zellen führen können. Um stets unter gleichbleibenden Bedingungen Zellkulturversuche durchführen zu können und konstante Eigenschaften der

Zellen zu gewährleisten, werden deshalb stets Passagen mit annähernd gleichem Passagierstatus verwendet. Dazu ist es notwendig Zellen mit geringer Passagezahl als kryokonservierten Vorrat anzulegen. Hierzu werden Zellen geringer Passagierzahl im großen Maßstab kultiviert und mit einer Zelldichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/mL in einem speziellen Konservierungsmedium (Tabelle A 12) konserviert.

Unter sterilen Bedingungen wird zunächst das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS Puffer gewaschen und Trypsin vorsichtig in das Kulturgefäß gegeben. Nach 8 min Inkubation im Brutschrank wird das Ablösen der Zellen mikroskopisch untersucht und durch Zugabe von Medium die Wirkung von Trypsin gestoppt. Die Suspension wird behutsam mit einer Pipette resuspendiert, um die Zellen zu vereinzeln. Ein Aliquot der Zellsuspension wird zur Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Ausschlusstest entnommen (siehe 3.2.9.2). Die restliche Zellsuspension wird zentrifugiert ($4^\circ\text{C}/10 \text{ min}/300 \text{ rpm}$) und der Überstand abgesaugt. Zum Zellpellet wird das notwendige Volumen an Konservierungsmedium gegeben, um die gewünschte Zellzahl von $1-2 \times 10^6$ Zellen/mL zu erhalten. Aliquote der Zellsuspensionen werden in Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen werden zum moderaten Abkühlen der Zellen in ein Kryoeinfriergerät gefüllt mit reinem Isopropanol bei -80°C für 24 h inkubiert und danach im flüssigen Stickstoff gelagert.

Mediumwechsel

Bei unzureichender Konfluenz der Zellen erfolgt ausschließlich ein Mediumwechsel ohne Passagieren der Zellen. Dazu wird das verbrauchte Mediums mittels steriler Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen zweimal mit 10 mL PBS Puffer gewaschen. Anschließend werden vorsichtig 15 mL frisches Kulturmedium in das Kulturgefäß pipettiert und verteilt. Das Gefäß wird zur weiteren Kultivierung im Brutschrank aufbewahrt.

3.2.9.2 *Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblau-Ausschlusstest*

Prinzip

Trypanblau ist ein polyanionischer Azofarbstoff, welcher die defekten Membranen toter bzw. nicht-intakter Zellen durchdringen kann. In der Zelle kann er als Anion an zytosolische Proteine binden, wodurch das Zytoplasma blau eingefärbt wird. Lebende Zellen mit intakter Membran sind in der Lage den Farbstoff auszuschließen. Eine visuelle Differenzierung von vitalen und nicht vitalen Zellen unter dem Lichtmikroskop ist somit möglich [162]. Gleichzeitig kann durch Auftragen auf eine Neubauer-Zählkammer die Zellzahl pro mL Suspension bestimmt werden.

Durchführung

Die Neubauer-Zählkammer sowie ein Deckgläschen werden vor der Verwendung mit destilliertem Wasser und Ethanol 70% fusselfrei gereinigt. Das Deckgläschen wird auf die Trägerstegge der Zählkammer geschoben. Der korrekte Sitz des Deckgläschens auf den Trägerstegen wird durch der Entstehung Newtonscher Ringe sichtbar und verhindert, dass das Deckgläschen bei visuellen Untersuchungen verrutscht.

Unter sterilen Bedingungen werden die Zellen vom Kulturgefäß durch Zugabe von Trypsin abgelöst und in Medium vorsichtig resuspendiert. Ein Aliquot der Zellsuspension wird im Verhältnis 1:1 (v/v) mit Trypanblau gemischt und für 3 min bei 37°C inkubiert. Zügig wird ein Tropfen der angefärbten Suspension auf die Zählkammer übertragen. Die Zellzählung erfolgte unter dem Lichtmikroskop und wird dokumentiert.

Auswertung

Nach Dokumentation der Zellzahl kann die Anzahl vitaler Zellen pro mL, die Gesamtzahl der Zellen in der Suspension sowie die Vitalität der Zellen ermittelt werden.

3.2.9.3 Bestimmung der zytotoxischen Wirkung von Substanzen: Herstellung Inkubationsmedium für Zytotoxizitätstests

Die Herstellung der Inkubationsmedien erfolgt in Abhängigkeit der zu untersuchenden Substanz und Formulierung nach zwei verschiedenen Methoden. Methode 1 (antimikrob) beinhaltet eine Vorverdünnung der zu untersuchenden Proben in DMSO oder Ethanol außerhalb der Sterilbank. Im zweiten Schritt werden diese Lösungen unter der Sterilbank mit einem Faktor von 1.000 und sterilem Kulturmedium weiterverdünnt. Somit wird das Arbeiten mit sterilen Substanzen gewährleistet. Durch den weiteren Verdünnungsschritt wird die toxische Wirkung von DMSO bzw. Ethanol herabgesetzt ($\leq 0,1\%$). In einer Methode 2 (direkt) werden die Substanzen unmittelbar unter der Sterilbank in das Kulturmedium eingebracht. Eine Vorverdünnung findet nicht statt. Das unsterile Arbeiten wird toleriert, um Instabilitäten in den kolloidalen Formulierungen durch Zugabe von DMSO bzw. Ethanol zu vermeiden. Die jeweilige Herstellungsmethode für die zu untersuchende Substanz bzw. Formulierung ist dem Anhang der Tabelle A 23 zu entnehmen.

3.2.9.4 Resazurinassay

Prinzip

Grundlage des Assays bildet der Nachweis der irreversiblen enzymatischen Reduktion von Resazurin zu Resorufin durch die mitochondrialen Oxidoreduktase in vitalen Zellen mit metabolischer Aktivität. Tote bzw. defekte Zellen dagegen weisen keine oder eine eingeschränkte Stoffwechsel- und damit Enzymaktivität auf. Die Umsetzung von Resazurin findet somit nicht oder nur eingeschränkt statt. Die Menge des generierten fluoreszierenden Resorufins ist direkt proportional zur Zellviabilität und kann mittels photometrischer Messung bei einer Wellenlänge von 590 nm detektiert werden [163, 164].

Durchführung

In 24-Well Platten werden je Well 5×10^4 Zellen ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Das alte Medium wird mittels Absaugvorrichtung behutsam, aber zügig entfernt und zu den Zellen 500 μ L Behandlungsmedium pro Well hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24 h im Brutschrank erfolgt ein Absaugen des Mediums, Waschen der Zellen mit PBS Puffer (200 μ l je Well) und die Zugabe von 500 μ L der sterilen Farbstofflösung (5% Resazurin in Medium je Well). Nach dreistündiger Behandlung im Brutschrank wird die Fluoreszenz im Plattenreader bei einer Anregungswellenlänge von 540 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm gemessen.

Eine Ausnahme hinsichtlich der Behandlungsdauer erfolgt bei der Bestimmung der Zytotoxizität der Fertigrezepturen 122-125. Hier wird die Behandlung auf 72 h verlängert. Jeweils nach 24 h wird das Medium abgesaugt und durch frisches Inkubationsmedium ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgt das Waschen und Behandeln mit Farbstofflösung analog zur Behandlung für 24 h.

3.2.9.5 Neutralrotassay

Prinzip

Das 3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazin-hydrochlorid (Neutralrot) liegt unter physiologischen Bedingungen als lipophiler, schwach kationischer Farbstoff vor und kann durch Diffusion und Endozytose von vitalen Zellen aufgenommen werden. In Zellen akkumuliert der Farbstoff in die Lysosomen durch Bindung an Carboxyl- und Phosphatgruppen der lysosomalen Membran. Im Lysosom herrscht ein saurer pH-Wert von 5. Dieser pH-Wert wird durch den

aktiven Protonentransport dort vorhandener H⁺-ATPasen hervorgerufen. In den Lysosomen erfolgt der Einschluß relevanter intrazellulärer Verdauungsenzyme wie Proteasen, Nukleasen und Lipasen [165].

Im sauren Milieu der Lysosomen erfolgt eine Ionisierung des Neutralrots, wodurch der Farbstoff nicht mehr aus den Lysosomen herausdiffundieren kann (Ionenfalle). Zellen ohne intaktes Lysosom bzw. Zellen mit fehlender Membranintegrität können den Farbstoff nicht aufnehmen bzw. zeigen eine verminderte Aufnahme- und Bindungsfähigkeit, wodurch die Akkumulation des Farbstoffs unterbleibt. Die Menge des gebundenen Neutralrots ist direkt proportional zur Zellviabilität und kann mittels Absorptionsmessung im Photometer gemessen werden [166].

Durchführung

Die Aussaat und Behandlung der Zellen erfolgt analog zum Resazurinassay (siehe 3.2.9.4). Nach Inkubation der Zellen mit dem sterilen Farbstoff (5% Neutralrot im Medium) von 3 h im Brutschrank wird das Medium mittels Absaugvorrichtung entfernt und die Zellen mit PBS Puffer gewaschen. Außerhalb der Sterilbank erfolgt die Zugabe von 500 µL eiskalter ethanolischer Essigsäure pro Well. Dies bewirkt eine Rücklösung des Farbstoffs aus den Lysosomen der Zellen in einem definierten Volumen. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT im Dunkeln kann die Absorption im Plattenreader bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen werden.

3.2.9.6 Zelluläre Aufnahme von Lutein und Luteinestern aus kolloidalen Formulierungen

Prinzip

Die Charakterisierung der zellulären Aufnahme von Lutein und Luteinestern erfolgte anhand von Absorptionsstudien. Hierbei wurden Caco-2 Zellen für einen definierten Zeitraum mit Wirkstoffen aus Miniemulsionen und Fertigrezepturen inkubiert (Tabelle 15). Eine Besonderheit stellten die Formulierungen MO4 und MO6 dar. Hier wurden u.a. Formulierungsansätze vor Einsatz in den Absorptionsstudien dem *in vitro* Verdaumodell *basic* (Tabelle 12, mit AHS 5 min, AGF 2 h, AIF 2 h) unterzogen. Die metabolisierten Proben wurden dann für das Inkubationsmedium eingesetzt.

Im Anschluss an die jeweilige Inkubation wurden die Zellen geerntet, gewaschen und die Wirkstoffmenge von Lutein und Luteinestern in den Zellpellets als Luteinäquivalent ermittelt. Die durch zelluläre Aufnahme detektierten Wirkstoffmengen sollten eine Bewertung des Absorptionsverhaltens ermöglichen und limitierende Effekte aufzeigen.

Tabelle 15 Zelluläre Aufnahme von Lutein und Luteinestern aus kolloidalen Formulierungen *in vitro*.

Tabellarisch dargestellt sind die für die Charakterisierung der zellulären Aufnahme *in vitro* verwendeten Formulierungen mit der jeweiligen Konzentration an Luteinäquivalent in μM im Kulturmedium und der Inkubationsdauer. Oleoresin = Oleoresin 60 mg/mL in MCT-Öl, Lutein = Lutein 5% 10 mg/mL in MCT-Öl, M5 Lutein/Luteinester/Tween 80, M6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1, M22 Lutein/Tween 80/Biozate 1, MO4 Luteinester/Tween 80/Biozate 1, MO6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1, 122 Tween 80/MCT-Öl, 123 Tween 80/Rapsöl, 124 Tween 80/Biozate 1/MCT-Öl, 125 Tween 80/Biozate 1/Rapsöl. c (LÄ) = Konzentration Luteinäquivalent, c = Konzentration, n.d. = nicht detektierbar.

	Wirkstoffmenge im Inkubationsmedium		Inkubationszeitraum [h]
	c (LÄ) [μM]	c _{Lutein} [μM]	
Oleoresin	0,28	n.d.	72
Lutein	0,44	0,44	72
M6	10,90	1,6	72
M22	1,6	1,5	72
MO4 _{direkt}	0,4	n.d.	48
MO4 _{verdaut}	0,5	n.d.	72
MO6 _{direkt}	0,4	0,1	48
MO6 _{verdaut}	0,6	0,2	72
122	0,5	n.d.	72
123	0,6	n.d.	72
124	0,7	n.d.	72
125	0,6	n.d.	72
M5	4,5	0,8	72
M6	5,7	0,9	72

Durchführung

Aussaat

Für jeden Inkubationsansatz werden drei 10 mm-Schalen mit jeweils einer Zellzahl von 1×10^5 Zellen/mL ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert.

Herstellung und Behandlung mit Inkubationsmedium

Die Herstellung der Inkubationsmedien erfolgt in zwei Schritten (Methode antimikrob). Zunächst wird außerhalb der Sterilbank die zu untersuchende Substanz bzw. Formulierung in Ethanol oder DMSO gelöst. Im zweiten Schritt wird diese Lösung unter der Sterilbank mit einem Faktor von 1.000 in sterilem Kulturmedium weiterverdünnt. Damit wird gewährleistet, dass die Konzentration des Lösungsmittels selbst im Inkubationsmedium nicht zytotoxisch wirkt ($\leq 0,1\%$). Zur Behandlung wird das verbrauchte Medium von den 24 h zuvor ausgesäten Zellen abgesaugt und in jede Petrischale 15 mL des jeweiligen Inkubationsmediums gegeben und verteilt. Die Schalen werden zur Inkubation für 48 h bzw. 72 h zurück in den Brutschrank

gestellt. Jeweils nach 24 h wird das Inkubationsmedium (frischer Ansatz) erneuert. Dazu wird das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit je 5 mL PBS Puffer gewaschen. Im Anschluß wird frisches Inkubationsmedium vorsichtig auf die Zellen pipettiert, verteilt und die Schalen zur weiteren Inkubation in den Brutschrank gestellt.

Extraktion nach Ablauf des Inkubationszeitraumes

Das Inkubationsmedium wird mittels steriler Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen zweimal mit 5 ml kaltem PBS Puffer gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit der Zugabe von Trypsin (3 mL) vom Schalenboden gelöst. Die geernteten, in Medium resuspendierten Zellen eines Inkubationsansatzes (3 x 10 mm-Schalen) werden in einem 50 mL Falcon vereint, invertiert und ein Aliquot von 100 μ L zur Zellzahlbestimmung (siehe 3.2.9.2) verwendet. Zur Zellsuspension im Falcon wird jeweils kalter PBS Puffer hinzugegeben und die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 300 rpm und 4°C sedimentiert. Der Überstand wird abgesaugt und der Waschvorgang zweimal wiederholt.

Analytik von Lutein und Luteinestern in den Zellpellets mittels RP-HPLC

Zur qualitativen und quantitativen Analyse der aufgenommenen Mengen Wirkstoff in die Zellen werden die gewonnenen Zellpellets mit 1 mL destillierten Wasser vermischt und in ein neues 15 mL Falcon überführt. Anschließend erfolgen die Extraktion von Lutein und Luteinestern nach dem Protokoll wie in 0 beschrieben sowie die Analyse mittels RP-HPLC (siehe 3.2.2).

3.2.10 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten der vorliegenden Arbeit erfolgt unter Anwendung des t-Testes in Microsoft Excel. Es liegen unabhängige, normalverteilte Stichproben vor, welche hinsichtlich ihrer Homogenität der Varianz geprüft werden. Entsprechend der vorliegenden Varianz erfolgt die Auswertung unter Verwendung „heteroskedatisch“ (inhomogene Varianz) bzw. „homoskedatisch“ (homogene Varianz). Berechnete p-Werte unter 0,05 werden als signifikant bewertet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

4 ERGEBNISSE

4.1 QUALITATIVE UND QUANTITATIVE ANALYTIK VON LUTEIN UND LUTEINESTERN MITTELS RP-HPLC

Für die Untersuchungen dieser Arbeit mittels HPLC kam reines Lutein als externer Standard zur Anwendung. Dieses wurde vom Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau e.V. (IGZ) zur Verfügung gestellt. Die qualitative Identifizierung der einzelnen Luteinester erfolgte durch Vergleich mit der chromatographischen Darstellung nach Piccaglia et al. (1998) [147]. Eine reproduzierbare, adäquate Zuordnung von Esterformen in einem Gemisch aus Luteinestern ist bis heute technisch und analytisch nicht erschöpfend beschrieben worden. Luteinester stellen stets ein Gemisch aus Mono- und Diesterformen dar. Bekannteste und reichhaltige Quelle an Luteinestern sind die Blütenblätter der Pflanze *Tagetes erecta*, auch als Studentenblume oder Marigold bekannt. Nachweisdaten zeigen hier als Hauptkomponente des Estergemisches Luteindipalmitat (Helenien) [167], weshalb in der Literatur häufig für Luteinester das Molekulargewicht von Helenien angegeben wird. Eine korrekte Abbildung aller Luteinesterformen ist damit nicht gegeben, analytisch ist eine Differenzierung zwischen Mono- und Diestern in bestimmten Versuchsanordnungen jedoch notwendig (Absorptionsversuche). Ebenso besteht die allgemeine Verbreitung Luteinester unter Verwendung eines theoretischen Faktors von 0,5 in Lutein anzugeben. Jedoch ist dieser bis heute nicht evidenzbasiert gesichert. Aufgrund dieser Gegebenheiten wurde in dieser Arbeit sowohl für Lutein als auch Luteinester der externe Standard Lutein mit entsprechendem Molekulargewicht angewendet. Die quantitative Angabe der Konzentrationen von Lutein und Luteinestern erfolgte grundsätzlich als Gesamtheit in Luteinäquivalent mg/mL. Die qualitative Beschreibung der vorliegenden Formen von Lutein in einem Probengemisch erfolgte im Vergleich mit den von Piccaglia et al. (1998) publizierten Retentionszeiten für Lutein, -mono- bzw. -diester aus Oleoresin Marigold (*food grade*) [147]. Charakteristisch für Oleoresin ist das Vorliegen von Lutein als fast ausschließlich Mono- und Diester. Lutein selbst ist nur marginal im Gemisch enthalten. Konform mit der chromatographischen Abbildung von Oleoresin von Piccaglia et al. (1998) konnten Luteinmonomyristat, -monopalmitat, -monostearat sowie Luteindimyristate, -myristat-palmitat, -dipalmitat, -palmitat-stearat und -distearat im verwendeten Oleoresin zugeordnet werden [147].

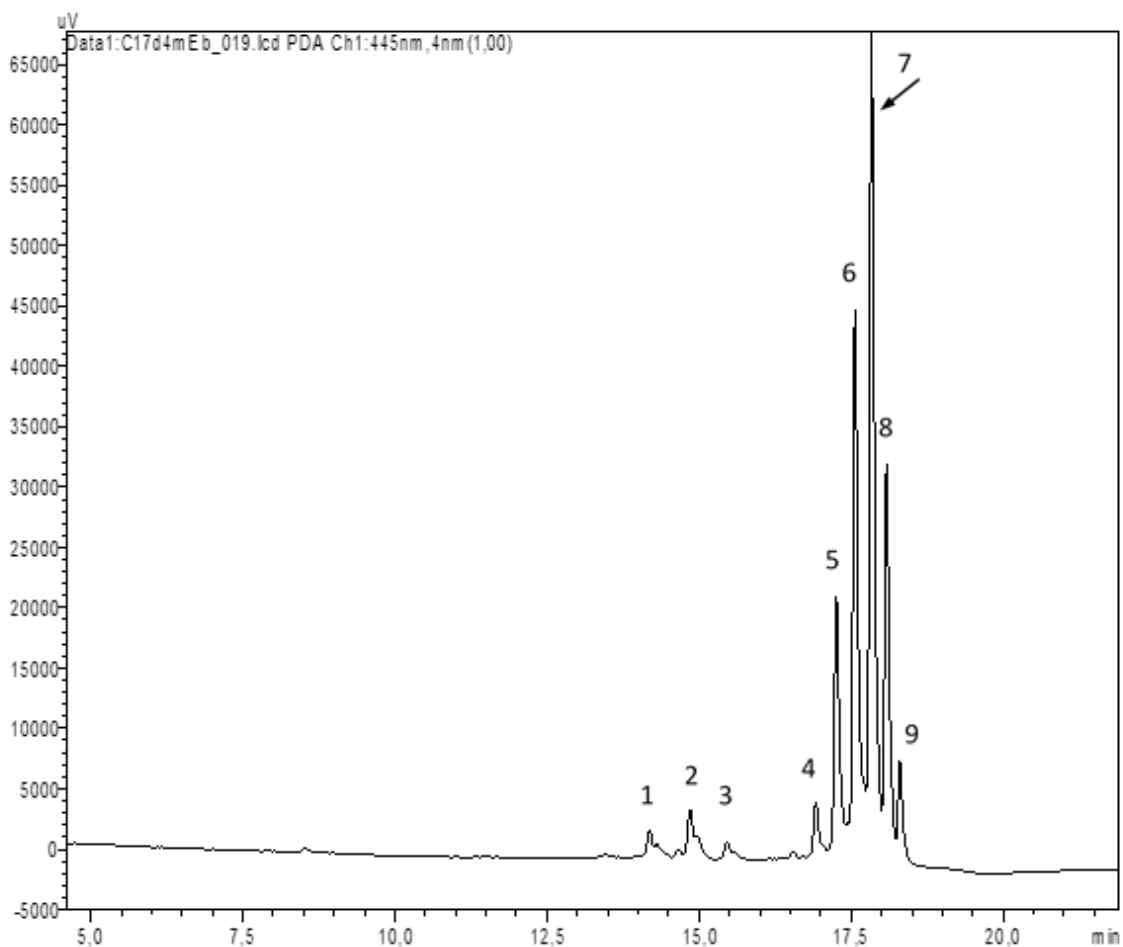


Abbildung 9 Chromatographische Darstellung des Luteinesterspektrums einer Oleoresinprobe (30 mg Oleoresin/mL MCT-Öl).

Die qualitative Zuordnung erfolgte mittels Datenvergleich nach [147]: 1 Luteinmonomyristat, 2-monopalmitat, 3-monostearat, 4 unbekannt, 5 Luteindimyristat, 6-myristat-palmitat, 7-dipalmitat, 8-palmitat-stearat, 9-distearat. Bei einer Retentionszeit von 8,5 min wird ein minimaler Peak detektiert, welcher Lutein in einer Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze vermuten lässt. RP-HPLC-Bedingungen: Säule C18 mit Vorsäule, Lösungsmittelgradient mit Acetonitril/ Methanol (9/1, v/v) als Eluent A und Ethylacetat als Eluent B, Flussrate von 0,6 ml/min, Detektion bei 445 nm.

Eine qualitative Beschreibung von Lutein konnte durch Verwendung des vorhandenen externen Standards reinen Luteins gewährleistet werden. Betrachtet man das Chromatogramm des externen Standards Luteins, eluiert dieses bei einer Retentionszeit von 8,5 min (Abbildung 10). Der detektierte Peak weist leichtes Tailing auf. Dies lässt sich mit dem möglichen Auftreten von (Z)-Isomeren des Luteins erklären. Eine genaue Identifizierung der Isomere erfolgte nicht. Aufgrund der Summendarstellung als Luteinäquivalent wurde eine Spezifizierung zurückgestellt.

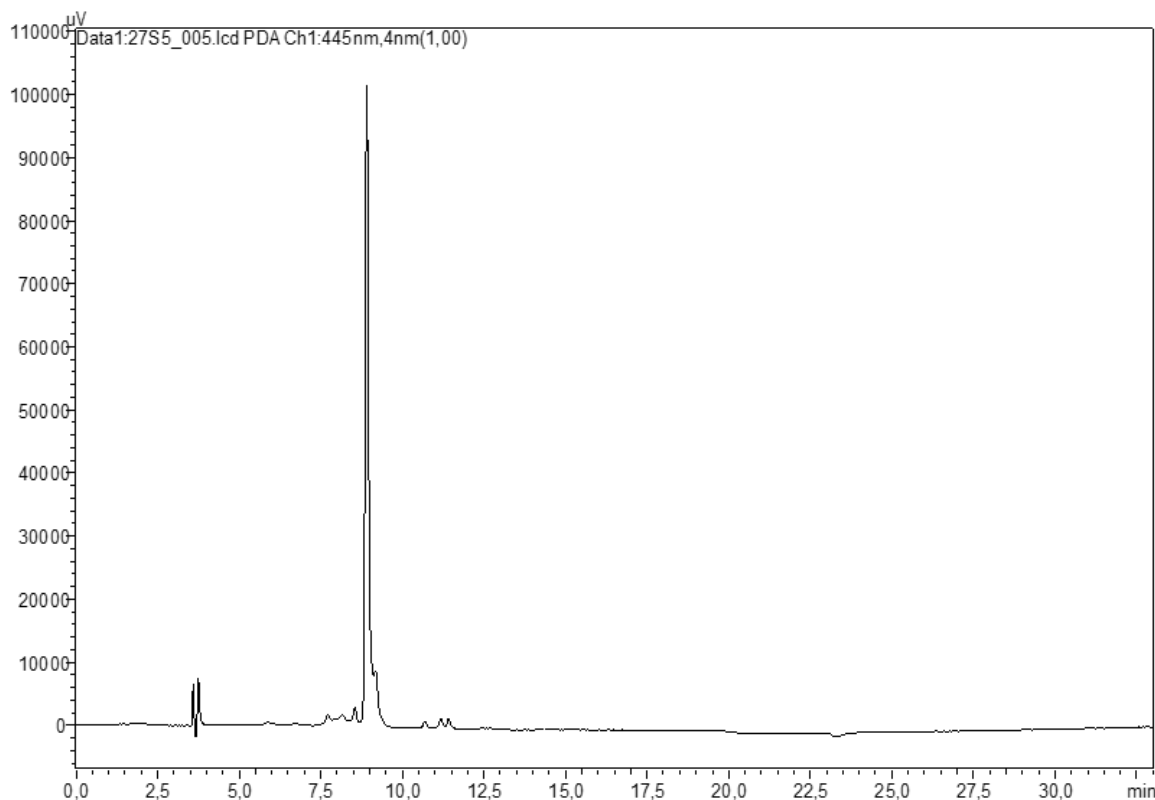


Abbildung 10 Chromatographische Darstellung des externen Standards Lutein vom Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau e.V..

Lutein wurde mit einer Retentionszeit von 8,5 min detektiert. RP-HPLC-Bedingungen: Säule C18 mit Vorsäule, Lösungsmittelgradient mit Acetonitril/Methanol (9/1, v/v) als Eluent A und Ethylacetat als Eluent B, Flussrate von 0,6 ml/min, Detektion bei 445 nm.

4.1.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Methode

Die Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze zur quantitativen Analytik von Lutein und Luteinestern wurden sechs Luteinstandards eingewogen, photometrisch deren Reinheit bestimmt und Konzentrationsreihen hergestellt (3.2.3). Die Konzentrationsreihen wurden an verschiedenen Tagen unter gleichen Bedingungen mittels HPLC analysiert und ausgewertet (3.2.2).

Die Nachweisgrenze einer Methode stellt die kleinste Konzentration einer Substanz bzw. eines Analyten in einer Probe dar, die qualitativ erfasst werden kann. Das sogenannte *Limit of detection* (LOD) ist ein Element in der Validierung bzw. zur Qualifizierung einer Methode. Ein zweiter wichtiger Parameter ist die Bestimmungsgrenze - *Limit of quantitation* (LOQ). Die Bestimmungsgrenze beschreibt die Konzentration eines Analyten in einer Probe, welche mit der angewendeten Analysemethode gerade noch quantitativ detektierbar ist [168].

Nachfolgend wird exemplarisch die Berechnung von LOD und LOQ beschrieben. Es wurden Mittelwerte der konzentrationsbezogenen Peakflächen und der sich aus der Reinheit ergebenden

analogen Konzentrationen von sechs unabhängigen Standardkonzentrationsreihen ermittelt und in ein Streudiagramm aufgetragen (siehe Anhang Tabelle A 14, Abbildung A 1). Die Geradengleichung der linearen Regression und das Bestimmtheitsmaß wurden angegeben. Der Anstieg m der Gerade betrug dabei 169.285,35 (R^2 0,9991). Unter Verwendung der Standardabweichung für die Peakflächen der kleinsten Luteinkonzentration ($SD_{Peakfläche\ kleinste\ Konzentration}$) konnten mit folgenden Formeln Nachweisgrenze LOD und Bestimmungsgrenze LOQ berechnet werden.

$$LOD_{Lutein} \left[\frac{\mu g}{mL} \right] = \frac{3 \cdot SD_{Peakfläche\ kleinste\ Konzentration}}{\text{Anstieg } m} \quad (4-1)$$

$$LOD_{Lutein} \left[\frac{\mu g}{mL} \right] = \frac{3 \cdot 11.413}{169.285,35} \quad (4-2)$$

$$LOD_{Lutein} \left[\frac{\mu g}{mL} \right] = 0,2022488 \quad (4-3)$$

$$LOQ_{Lutein} \left[\frac{\mu g}{mL} \right] = \frac{10 \cdot SD_{Peakfläche\ kleinste\ Konzentration}}{\text{Anstieg } m} \quad (4-4)$$

$$LOQ_{Lutein} \left[\frac{\mu g}{mL} \right] = \frac{10 \cdot 11.413}{169.285,35} \quad (4-5)$$

$$LOQ_{Lutein} \left[\frac{\mu g}{mL} \right] = 0,6741627 \quad (4-6)$$

Für die angewendete quantitative Analysenmethode mittels RP-HPLC beträgt die Nachweisgrenze LOD von Lutein 0,20 $\mu\text{g/mL}$. Analog liegt die Bestimmungsgrenze LOQ bei 0,67 $\mu\text{g/mL}$.

4.2 KONZEPTION DES NEMs IN FORM EINER MINIEMULSION MIT DEM WIRKSTOFFTRÄGER LUTEIN BZW. LUTEINESTERN

4.2.1 Wahl des Wirkstoffträgers

Als Quelle des Wirkstoffträgers kamen die Präparate Oleoresin, Biolut und Lutein 5% zur Anwendung. Das Präparat Lutein 5% beinhaltet bis zu 5% reines Lutein vermischt mit Maltodextrin und liegt in Pulverform mit unbekannter Verkapselung vor. In den Präparaten Oleoresin und Biolut findet sich Lutein in seinen fettlöslichen Esterformen. Dabei ist Oleoresin ein zähflüssiger, orangefarbener Extrakt, der durch Lösemittlextraktion und Aufreinigung aus den Blüten und Blättern von Marigold gewonnen wird. Das Produkt Biolut liegt pulverförmig vor. Der Wirkstoff ist ebenso mit einer unbekanntem Verkapselung geschützt. Beide Präparate waren als kostenlose Musterproben vorhanden. Lutein musste käuflich erworben werden. Es stand aufgrund von Exportbeschränkungen nur in geringen Mengen zur Verfügung. Die Tabelle 16 zeigt die ursprünglich zur Verfügung stehenden Luteinquellen bzw. Präparate mit den jeweiligen theoretischen und analytischen Konzentrationen Luteinäquivalent in g/100 g Präparat zum Zeitpunkt der Konzeption des NEMs. Bei dem Präparat Oleoresin handelt es sich um ein Naturprodukt, welches natürlichen Schwankungen in der Verteilung unterlegen ist. Diese Inhomogenitäten kommen z.B. durch den unvollständigen Aufschluss von pflanzlichen Artefakten zu stande. In Biolut und auch Lutein 5% ist der Wirkstoff durch Verkapselungen geschützt, welche teilweise nur durch mechanische und chemische Behandlung entfernt werden kann. Im Rahmen der Bereitsstellung als Wirkstoff in einem NEM sind diese Aufbereitungen nicht unbedingt lebensmittelkonform umsetzbar. Wie bei Lutein 5% ersichtlich, führt dieses zur unvollständigen Extraktion bzw. Freisetzung und Analyse des Wirkstoffes. Dieser Verlust wird zu Gunsten des Einsetzens eines unveränderten Wirkstoffträgers im Rahmen der Untersuchungen zur Produktentwicklung akzeptiert.

Tabelle 16 Relevante Wirkstoffträger für Lutein und Luteinester.

Pflanzliche Produkte als Wirkstoffquelle für die Entwicklung einer Miniemulsion als Nahrungsergänzungsmittel zur Supplementierung von Lutein. c (LÄ) = Konzentration Luteinäquivalent, * = quantitative Analyse zu Versuchsbeginn.

	c (LÄ) _{theoretisch} [g/100g]	Wirkstoff	c (LÄ) _{analytisch} [g/100 g]*
Oleoresin	30	Luteinester	18,74 ± 0,50
Biolut™	90	Luteinester	87,67 ± 9,00
Lutein 5%	5	Lutein	2,16 ± 0,16

4.2.2 Wahl der Trägerphase und der Emulgatoren unter Berücksichtigung der physikalischen Stabilität

Es wurden relevante Öle gewählt und in erste wirkstofffreie Miniemulsionen eingebracht. Zur Überprüfung der Eignung eines Öles für die Verwendung in der Ölphase der Miniemulsion wurden, neben der Löslichkeit und ernährungsphysiologischer Aspekte, die Partikelgrößenverteilung der dazu konzipierten Ölphasen und die Stabilität des dispersen Systems über einen bestimmten Zeitraum gemessen und überprüft. Die Herstellung der jeweiligen wirkstofffreien Miniemulsionen erfolgte ebenso wie die Partikelgrößenmessungen vom IAP. Bei den gewählten Ölen handelte es sich um MCT-Öl, Rapsöl, Mandelöl, Sonnenblumenöl und Olivenöl. Weiterhin wurden ebenso verschiedene Emulgatoren wie auch Peptisatoren in Betracht gezogen und untersucht. Sie können als Löslichkeitsvermittler auftreten sowie Aufrahmen und Koagulation konzipierter Miniemulsionen verhindern bzw. eingrenzen. Aufgrund der Ausrichtung auf die Herstellung einer Öl-in-Wasser Emulsion (O/W-Emulsion) fiel die Emulgatorwahl zunächst auf Tween 80. Dieses Polyethylenglykol-sorbitanmonooleat wird z.B. in der pharmazeutischen Forschung für die Umhüllung von polymeren Nanopartikeln genutzt, die im Säugetierhirn die Blut-Hirn-Schranke überqueren sollen [169]. Im Weiteren wurde der Einsatz von Biozate 1 geprüft. Dabei sollte nicht vollständig auf Tween 80 verzichtet werden, sondern dieses teilweise durch das Molkenproteingemisch Biozate 1 ersetzt werden.

Wirkstofffreie Miniemulsionen mit verschiedenen Ölen bei Verwendung des Emulgators Tween 80

Erste Musteremulsionen beinhalteten in der Wasserphase Reinstwasser, den Emulgator Tween 80 und Natriumcitrat. Die Ölphase bestand ausschließlich aus dem spezifisch gewählten Öl (Tabelle A 1). Die Herstellung der wirkstofffreien Miniemulsionen wurde durch Mischung der Wasser- und Ölphase und Einbringen von Ultraschall (200 Watt, 5 min) unter Wasserkühlung erreicht. Die Lagerung erfolgte zunächst bei Raumtemperatur im Dunkeln. Später wurde die Lagerung bei 4°C vorgenommen. Die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung in den Miniemulsionen erfolgte am Mastersizer X. Nach Analyse mittels Laserbeugung konnten die ermittelten Partikelgrößen dem volumetrischen Durchmesser $D(v)$ zugeordnet und über einen spezifischen Zeitraum geprüft und verglichen werden. Wobei $D(v)$ jeweils die volumetrische Prozentzahl der Partikel angibt, die kleiner als die angegebene Partikelgröße sind. Zum Beispiel bedeutet die Angabe $D(v, 0,9)$ oder auch $D90$ (volumetrisch) mit 1,1 μm , dass im Probenvolumen 90% aller Partikel eine kleinere Größe als 1,1 μm aufweisen. Die gewonnenen Parameter

lassen eine Aussage über die Charakteristik der Emulsion zu. In der Tabelle 17 sind die mittleren Partikelgrößen im Bereich des volumetrischen Durchmessers D90 in den ersten wirkstofffreien Musteremulsionen über einen Zeitraum von 6 Monaten dargestellt. Alle Miniemulsionen erwiesen sich über den gewählten Messzeitraum als stabil. Insbesondere bei den Emulsionen mit MCT- und Rapsöl konnte sogar eine Verkleinerung der Tröpfchengrößen beobachtet werden. Während bei Verwendung des MCT-Öles in der Grundformulierung nach Herstellung 90% der Partikel einen volumetrischen Durchmesser unter 0,88 μm aufwiesen, betrug dieser Wert in gleicher Miniemulsion nach 6 Monaten unter 0,67 μm . Analog lag der volumetrische Durchmesser bei 90% der Partikel in der Grundformulierung mit Rapsöl zu Beginn bei unter 0,93 μm und fiel im Laufe der Lagerung nach 6 Monaten auf 0,80 μm . Auftretende visuell beobachtete Wandablagerungen in den Formulierungen konnten durch leichtes Invertieren vor den Messungen gelöst werden. In den Miniemulsionen mit Mandelöl, Sonnenblumenöl und Olivenöl konnten von Beginn an höhere volumetrische Partikeldurchmesser detektiert werden. Nach 6 Monaten Lagerung lagen die Partikelgrößen im Bereich D90 (volumetrisch) bei 0,96 μm (Sonnenblumenöl), 0,99 μm (Mandelöl) und 1,11 μm (Olivenöl). Dies bedeutet 90% der Partikel entsprachen noch annähernd der Tropfengröße einer Miniemulsion ($\leq 1,0 \mu\text{m}$).

Tabelle 17 Veränderung der mittleren Partikelgrößen in wirkstofffreien Miniemulsionen mit verschiedenen Ölen über einen Zeitraum von 6 Monaten.

Die Tabelle zeigt die mittlere Partikelgröße in μm im Bereich des volumetrischen Durchmessers D(v) 90% in wirkstofffreien Miniemulsionen mit der Grundformulierung 20 mL Reinstwasser, 10 mL Öl, 1,0 g Tween 80, 0,2 g Natriumcitrat. Die Messung erfolgte am Mastersizer X (Malvern Panalytical B.V., Niederlande) zu den Messzeitpunkten direkt nach Herstellung (t_0), 30 Tagen ($t_{30 \text{ Tage}}$), 60 Tagen ($t_{60 \text{ Tage}}$) und 6 Monaten ($t_{6 \text{ Monate}}$). Vor der Messung wurde das Probengefäß einmal invertiert. Die Probenahme erfolgte per Einwegtropfer aus der Mitte der Miniemulsion. MCT = *medium chain triglycerids*-mittelkettige Fettsäuren, D90 (volumetrisch) = Durchmesser von 90% der Partikel der Emulsion ist kleiner als der angegebene Partikeldurchmesser.

Grundformulierung	Partikeldurchmesser [μm] D90 (volumetrisch)			
	t_0	$t_{30 \text{ Tage}}$	$t_{60 \text{ Tage}}$	$t_{6 \text{ Monate}}$
<i>MCT-Öl</i>	0,88	1,18	1,48	0,67
<i>Rapsöl</i>	0,93	0,92	0,17	0,8
<i>Mandelöl</i>	1,01	0,97	1,16	0,99
<i>Sonnenblumenöl</i>	0,96	0,97	1,22	0,96
<i>Olivenöl</i>	1,05	1,02	1,23	1,11

Wirkstofffreie Miniemulsionen mit verschiedenen Ölen, Tween 80, Biozate 1 und Natriumcitrat

In weiteren Vorexperimenten sollte nun geprüft werden, inwiefern der Emulgator Tween 80 durch die Verwendung des modifizierten Molkenproteins Biozate 1 ersetzt werden kann. Dazu wurden zunächst Miniemulsionen konzipiert, die ausschließlich Biozate 1 als Emulgator enthielten. Es zeigte sich, dass Biozate 1 allein nicht in der Lage ist die Miniemulsionen stabil zu halten. Bereits nach wenigen Tagen konnte eine Phasentrennung beobachtet werden. Biozate 1 wurde deshalb ausschließlich als Co-Emulgator eingesetzt. Die Herstellung der Biozate 1 beinhaltenden Miniemulsionen erfolgte analog den ersten Versuchen mit verschiedenen Ölen. Tween 80 wurde in unterschiedlichen Mengenverhältnissen durch zusätzliche Zugabe von Biozate 1 ersetzt. Die Partikelgrößenanalyse erfolgte mittels Mastersizer X zum Zeitpunkt der Herstellung und nach 30 Tagen. Bei Verwendung der Emulgatoren im Mengenverhältnis 3:7 (Tabelle A 2) konnte direkt nach Herstellung in allen Formulierungen ein Anstieg der Partikelgrößen detektiert werden. Dabei traten Partikel in den Emulsionen auf, die größer als 1,0 µm waren. Der höchste mittlere Partikeldurchmesser mit 1,57 µm konnte dabei in der Formulierung mit Olivenöl nachgewiesen werden (Tabelle 18). Auch in den Lösungen mit Raps-, Mandel- und Sonnenblumenöl lag dieser Wert zwischen 1,30 und 1,51 µm. Der mittlere Partikeldurchmesser bei D90 (volumetrisch) in der Emulsion mit MCT-Öl betrug nur 1,21 µm. Nach 30 Tagen Lagerung konnte in den Formulierungen mit Mandel-, Sonnenblumen- und Olivenöl ein Aufbruch der Emulsionen festgestellt werden. Diese Phasentrennung ließ sich nicht mehr durch einfaches Invertieren rückgängig machen. Eine reproduzierbare Partikelgrößenanalyse für diese Miniemulsionen war nicht mehr möglich. Nur die Formulierungen mit MCT-Öl und Rapsöl ließen eine Messung der Partikelgrößen zu. Dabei betragen die mittleren Partikeldurchmesser bei D90 (volumetrisch) jeweils 1,37 µm.

Tabelle 18 Veränderung der mittleren Partikelgrößen in wirkstofffreien Miniemulsionen mit Überschuss an Biozate 1 über einen Zeitraum von 30 Tagen.

Die Tabelle zeigt die mittlere Partikelgröße in μM im Bereich des volumetrischen Durchmessers $D(v) 90\%$ in wirkstofffreien Miniemulsionen mit der Grundformulierung 20 mL Reinstwasser, 10 mL Öl, 0,3 g Tween 80, 0,7 g Biozate 1, 0,2 g Natriumcitrat. Die Messung erfolgte am Mastersizer X (Malvern Panalytical B.V., Niederlande) zu den Messzeitpunkten direkt nach Herstellung (t_0) und 30 Tagen ($t_{30 \text{ Tage}}$). Vor der Messung wurde das Probengefäß einmal invertiert. Die Probenahme erfolgte per Einwegtropfer aus der Mitte der Miniemulsion. Bei Phasentrennung war eine reproduzierbare Bestimmung der Partikelgrößen in dieser Miniemulsion nicht mehr möglich. MCT = *medium chain triglycerids*-mittelkettige Fettsäuren, D90 (volumetrisch) = Durchmesser von 90% der Partikel der Emulsion ist kleiner als der angegebene Partikeldurchmesser.

Grundformulierung	Partikeldurchmesser [μm] D90 (volumetrisch)	
	t_0	$t_{30 \text{ Tage}}$
<i>MCT-Öl</i>	1,21	1,37
<i>Rapsöl</i>	1,30	1,37
<i>Mandelöl</i>	1,51	Phasentrennung
<i>Sonnenblumenöl</i>	1,35	Phasentrennung
<i>Olivenöl</i>	1,57	Phasentrennung

Im Weiteren wurde das Mengenverhältnis der Emulgatoren auf 1:1 verändert (Tabelle A 3). Nach Herstellung konnten auch hier mittlere Partikelgrößen für die Fraktion D90 (volumetrisch) über $1,0 \mu\text{m}$ nachgewiesen werden (Tabelle 19). Unerwartet hoch war dieser Wert für die Emulsion mit MCT-Öl ($1,49 \mu\text{m}$). Während die rapsöhlhaltige Formulierung mit einer Partikelgröße von $1,11 \mu\text{m}$ nur leicht über $1,0 \mu\text{m}$ lag. In den Emulsionen mit Mandel-, Sonnenblumen- und Olivenöl konnte ein Partikeldurchmesser von $1,27$ bis $1,32 \mu\text{m}$ bestimmt werden. Wie auch bei der zuvor gewählten Kombination der Emulgatoren trennten sich die Miniemulsionen mit Mandel- und Olivenöl nach 30 Tagen Lagerung in ein Zwei-Phasensystem. Eine starke Zunahme der mittleren Partikelgröße im volumetrischen Bereich D90 wies die Emulsion mit Rapsöl auf. Hier stieg dieser Wert auf $2,72 \mu\text{m}$. Eine Phasentrennung war nicht zu beobachten. In der Emulsion mit Sonnenblumenöl konnte ein annähernd gleicher Partikeldurchmesser wie nach Herstellung festgestellt werden ($1,32 \mu\text{m}$). In der Formulierung mit MCT-Öl sank der Partikeldurchmesser auf $0,93 \mu\text{m}$. Damit konnten hier nach 30 Tagen eine Verringerung der Partikelgröße beobachtet werden. Die Partikel in der Emulsion wiesen nun zu 90% einen mittleren Partikeldurchmesser von weniger als $1,0 \mu\text{m}$ auf.

Tabelle 19 Veränderung der mittleren Partikelgröße in wirkstofffreien Miniemulsionen mit Tween 80 und Biozate 1 (1:1) über einen Zeitraum von 30 Tagen.

Die Tabelle zeigt die mittlere Partikelgröße in μM im Bereich des volumetrischen Durchmessers $D(v)_{90\%}$ in wirkstofffreien Miniemulsionen mit der Grundformulierung 20 mL Reinstwasser, 10 mL Öl, 0,5 g Tween 80, 0,5 g Biozate 1 und 0,2 g Natriumcitrat. Die Messung erfolgte am Mastersizer X (Malvern Panalytical B.V., Niederlande) zu den Messzeitpunkten direkt nach Herstellung (t_0) und 30 Tagen ($t_{30 \text{ Tage}}$). Vor der Messung wurde das Probengefäß einmal invertiert. Die Probenahme erfolgte per Einwegtropfer aus der Mitte der Miniemulsion. Bei Phasentrennung war eine reproduzierbare Bestimmung der Partikelgrößen in dieser Miniemulsion nicht mehr möglich. MCT = *medium chain triglycerids*-mittelkettige Fettsäuren, D_{90} (volumetrisch) = Durchmesser von 90% der Partikel der Emulsion ist kleiner als der angegebene Partikeldurchmesser.

Grundformulierung	Partikeldurchmesser [μm] D_{90} (volumetrisch)	
	t_0	$t_{30 \text{ Tage}}$
MCT-Öl	1,49	0,93
Rapsöl	1,11	2,72
Mandelöl	1,30	Phasentrennung
Sonnenblumenöl	1,27	1,32
Olivenöl	1,32	Phasentrennung

Relevanz Zugabe eines Peptisators versus Verwendung von Leitungswasser in der Wasserphase

Grundlegend war zu prüfen, inwiefern die Notwendigkeit einer Zugabe von Peptisatoren bei der Herstellung von zu konzipierenden Fertigrezepturen bestand. Dazu wurde untersucht, inwiefern Leitungswasser vergleichbare stabilisierende Effekte in den Miniemulsionen hervorgerufen würde, wie eine Zugabe von Reinstwasser und Peptisatoren (Natriumcitrat bzw. -phosphat). Hintergrund der Verwendung dieser Substituenten war es festzustellen, ob mit bewährten Standardsubstanzen in den Miniemulsionen eine gewünschte Tröpfchengrößenverteilung und Lagerstabilität bei der Verwendung verschiedener Öle grundsätzlich erreicht werden kann. Bei der Wahl der Inhaltsstoffe für eine NEM-Rezeptur standen wiederum Naturbelassenheit, sowie ernährungsphysiologische und mögliche gesundheitliche Aspekte im Vordergrund. Zur Einschätzung der alternativen Verwendung von Leitungswasser in den Rezepturen wurde neben der Partikelgrößenanalyse das Strömungspotential mittels Partikelladungsdetektor (PCD-03 von Müttek) von ausgewählten Miniemulsionen nach 30 bzw. 90 Tagen Lagerung bei 4°C im Dunkeln untersucht. In der experimentellen Anordnung konnte durch das Strömungspotential die Oberflächenladung der Partikel in den Miniemulsionen aufgezeigt werden. Anwesende Gegenionen und ihr Verhalten blieben unberücksichtigt. Zu einer Emulsion zugefügte, geladene Peptisatoren lagern sich an den Oberflächen von Partikeln ab und erhöhen damit deren Oberflächenladung. Dies wiederum führt zur Erhöhung der Abstoßung zwischen den Partikeln und Stabilisierung der Emulsion. Detektierte hohe Strömungspotentiale sind ein Hinweis hoher

Oberflächenladung und Abstoßungskräfte der Partikel. Für den experimentellen Vergleich der Effekte von Peptisatoren wurden die rapsöhlhaltigen Miniemulsionen 37, 38 und 39 ausgewählt. Während in der Formulierung 37 Leitungswasser verwendet wurde, enthielten die Emulsionen 38 und 39 Reinstwasser mit jeweils einem Peptisator (Natriumcitrat bzw. -phosphat). Weitere Kontrollmessungen wurden mit den Miniemulsionen 115 und 120, welche MCT-Öl statt Rapsöl enthielten, durchgeführt. Der Emulgator in allen verwendeten Miniemulsionen war ausschließlich Tween 80 (Tabelle A 4). Die Ergebnisse zur Bestimmung der volumetrischen, mittleren Partikeldurchmesser D_{90} in μm und der Messung des Strömungspotentials in mV sind der Tabelle 20 zu entnehmen. Ebenso dort dargestellt sind die Zusammensetzungen der spezifischen Miniemulsionen. Betrachtet man zunächst den mittleren Durchmesser von 90% der Partikel in den Emulsionen nach Herstellung schwankt dieser um den Wert von $1,0 \mu\text{m}$. In den rapsöhlhaltigen Miniemulsionen wird dabei in der Formulierung 38 die größte mittlere Partikelgröße erreicht ($1,29 \mu\text{m}$). Miniemulsion 115 mit MCT-Öl ohne Zugabe von Peptisatoren weist einen ähnlichen Wert für 90% der Partikel auf ($1,23 \mu\text{m}$). Eine Tendenz des Anstiegs des mittleren Partikeldurchmessers in Hinblick auf die Zugabe von Leitungswasser wird nicht sichtbar. Zum Messzeitpunkt des Strömungspotentials nach 30 bzw. 90 Tagen Lagerung stiegen die mittleren Partikeldurchmesser in allen Miniemulsionen an. Am stärksten war dabei der Anstieg in der Miniemulsion 120 (mit dem Peptisator Natriumcitrat). Hier wiesen 90% der Partikel in der Lösung einen mittleren Durchmesser von $2,06 \mu\text{m}$ auf. In der analogen Formulierung 115 mit Leitungswasser und ohne Peptisator betrug der mittlere Partikeldurchmesser D_{90} (volumetrisch) $1,57 \mu\text{m}$. Trotz der starken Schwankung hinsichtlich ihrer Partikelgrößen war das Strömungspotential in beiden Emulsionen fast ähnlich. So lag das Strömungspotential in der Formulierung 115 bei einem Wert von -645 mV . Die Emulsion 120 wies einen Wert von -625 mV auf. In den Miniemulsionen mit Rapsöl waren die mittleren Partikelgrößen D_{90} (volumetrisch) zum Messzeitpunkt vergleichbar mit Formulierung 115. Sie betragen $1,51 \mu\text{m}$ (37), $1,46 \mu\text{m}$ (38) und $1,55 \mu\text{m}$ (39). Zu beachten ist die bei diesen Dispersionen längere Lagerungszeit. Das detektierte Strömungspotential in der Formulierung 37 (Leitungswasser, ohne Peptisator) war mit -625 mV vergleichbar mit den Emulsionen 115 und 120. In der Miniemulsion 38, welche den Peptisator Natriumcitrat enthielt wurde mit -765 mV eine leichte Erhöhung des Potentials nachgewiesen. Mehr als verdoppelt wurde das Strömungspotential durch Zugabe von Natriumphosphat (Miniemulsion 39.) Hier betrug die Oberflächenladung -1.403 mV . Die positiven Auswirkungen der Zugabe eines Peptisators auf die Oberflächenspannung der Teilchen in einer Emulsion konnten somit gezeigt werden. Einen entscheidenden Einfluß auf die

mittleren Partikeldurchmesser der Formulierungen hatte die Verwendung von Reinstwasser mit Peptisatoren jedoch nicht.

Tabelle 20 Mittlere Partikelgrößen und Strömungspotentiale in Miniemulsionen in Abhängigkeit der Zugabe eines Peptisators.

Die Tabelle zeigt die mittlere Partikelgröße in μM im Bereich des volumetrischen Durchmessers $D(v)_{90\%}$ in den Miniemulsionen direkt nach Herstellung (t_0) und am Tag der Messung des Strömungspotentials (t_M). Die Bestimmung der Partikelgrößen erfolgte am Mastersizer X (Malvern Panalytical B.V., Niederlande). Die Messung des Strömungspotentials erfolgte am Partikelladungsdetektor PCD-03 (Mütek GmbH, Deutschland). D_{90} = Durchmesser von 90% der Partikel der Emulsion ist kleiner als der angegebene Partikeldurchmesser, RT = Raumtemperatur, MCT = *medium chain triglycerids*-mittelkettige Fettsäuren a = 30 Tage nach Herstellung, b = 90 Tage nach Herstellung.

Miniemulsion	Partikeldurchmesser [μm] D90 (volumetrisch)		Strömungspotential [mV] bei RT
	t_0	t_M	
37 - Leitungswasser/Rapsöl	1,03	1,51 ^b	-625
38 - Reinstwasser/Natriumcitrat/Rapsöl	1,29	1,46 ^b	-765
39 - Reinstwasser/Natriumphosphat/Rapsöl	0,99	1,55 ^b	-1.403
115 - Leitungswasser/MCT-Öl	1,23	1,57 ^a	-645
120 - Reinstwasser/Natriumcitrat/MCT-Öl	1,05	2,06 ^a	-625

4.2.3 Wahl des Emulgierverfahrens zur Herstellung von stabilen, wirkstoffhaltigen Miniemulsionen

Es ist bekannt, dass die Stabilität einer Emulsion nicht nur von den vorhandenen Stoffgrößen abhängig ist, sondern auch maßgeblich von Herstellungs- und Verarbeitungsverfahren beeinflusst wird [132]. Durch den Einsatz spezifischer mechanischer Emulgierverfahren können definierte Zerkleinerungskräfte auf die vorhandenen Partikel/Tropfen in den Emulsionen wirken und zu bestimmten Partikelgrößen führen. Weiterhin muss bei der Wahl der Emulgiertechnik die Schersensibilität der Emulsionsbestandteile ebenso berücksichtigt werden, wie die Koaleszenzneigung des dispersen Systems. Ein möglicher Ab- und Umbau der Wirkstoffe in den Miniemulsionen muss dabei abgeschätzt bzw. vermieden werden. Im Rahmen einer Produktion von NEMs im großen Umfang sind ebenso firmenspezifische Kapazitäten, wie entsprechende Räumlichkeiten und Kosten nicht außer Acht zu lassen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die physikalische Stabilität mit denen für eine Miniemulsion erforderlichen Partikelgrößen durch Behandlung mit Ultraschall und anschließender Hochdruckhomogenisierung erzeugt werden. In Folge wurde geprüft, inwiefern durch ausschließliches Behandeln der Emulsionen mit Ultraschall ebenso stabile Miniemulsionen mit der gewünschten Partikelgröße generiert werden

könnten. Eine weitere Versuchsreihe sollte durch das verwendete Emulgierverfahren bedingte mögliche Abbau- bzw. Umbauprozesse des Wirkstoffes beschreiben.

4.2.3.1 Partikelgrößenbestimmung mittels Laserdiffraktometrie

Die Untersuchungen zur Prüfung der Effektivität angewendeter Emulgierverfahren erfolgten durch den Vergleich der mittleren Partikelgrößen in wirkstoffbeladenen Ölen mit dem Emulgator Tween 80 bei Herstellung und nach einer Lagerung von 163 bzw. 167 Tagen. Die Zusammensetzung und Codierung der verwendeten Formulierungen ist im Anhang in der Tabelle A 5 und Tabelle A 6 aufgezeigt. Das Emulgieren der Formulierungen erfolgte durch alleiniges Anwenden von Ultraschallhomogenisierung oder durch zusätzliches Behandeln mit einem Hochdruckhomogenisator. Nach Herstellung wurden mittels Partikelgrößenanalyse der Formulierungen die Emulgierverfahren hinsichtlich der Entstehung von Partikeln im Bereich $\leq 1,0 \mu\text{m}$ verglichen. Weiterhin wurden die Proben nach Lagerung vermessen und anhand der vorliegenden Partikelgrößenverteilung die physikalische Stabilität der Emulsionen geprüft. Die jeweiligen Messdaten können der Tabelle 21 entnommen werden. Es konnte gezeigt werden, dass nach Behandlung mit Ultraschall und anschließender Hochdruckhomogenisierung in den Miniemulsionen kleinere mittlere Partikeldurchmesser detektiert wurden als bei den Miniemulsionen, die nur einer Ultraschallbehandlung unterzogen wurden. So wies die Miniemulsion mit MCT-Öl, welche lediglich mit Ultraschall behandelt wurde eine volumetrische Partikelgrößenverteilung zwischen $0,20 \mu\text{m}$ (D10) und $1,04 \mu\text{m}$ (D90) auf. Dagegen konnten in gleicher Formulierung durch anschließende Weiterbehandlung mit Hochdruckhomogenisierung Partikelgrößen zwischen $0,17 \mu\text{m}$ (D10) und $0,60 \mu\text{m}$ (D90) erzielt werden. Gleiche Korrelationen konnten für alle anderen untersuchten Miniemulsionen festgestellt werden. Es können demnach durch die Weiterbehandlung mit Hochdruckhomogenisator signifikant kleinere Partikel bzw. Tropfengrößen in den Emulsionen generiert werden. Unabhängig von der eingesetzten Emulgiertechnik wurden Partikel im Größenbereich einer Miniemulsion ($\leq 1,0 \mu\text{m}$) erzeugt. Nach mehr als 5 Monaten Lagerung bei 4°C im Dunkeln wurde die Partikelgrößenanalyse der Proben mittels Mastersizer X wiederholt. Die Analyseergebnisse zeigten, dass beide angewandten Emulgiertechniken Bedingungen für die Entstehung physikalisch stabiler disperser Systeme mit annähernd gleichbleibenden Partikelgrößen schaffen. Auch nach Lagerung konnte in den Miniemulsionen mit MCT-Öl eine volumetrische Partikelgrößenverteilung von $0,20 \mu\text{m}$ (D10) bis $0,99 \mu\text{m}$ (D90) für die ultraschallbehandelte Probe bzw. $0,17 \mu\text{m}$ (D10) bis $0,56 \mu\text{m}$ (D90) für die analoge Miniemulsion, welche mit Ultraschall- und Hochdruckhomogenisierung erzeugt

wurde, detektiert werden. Dies entspricht eher einer Verkleinerung der Tropfenrößen nach Lagerung. Ähnlich verhielten sich auch die Partikelgrößenverteilungen in den rapsöhlhaltigen Miniemulsionen. Hier lag die mittlere Partikelgrößenverteilung (volumetrisch) zum letzten Messzeitpunkt zwischen $0,21\ \mu\text{m}$ und $1,13\ \mu\text{m}$ (ultraschallbehandelt) bzw. $0,17\ \mu\text{m}$ und $0,58\ \mu\text{m}$ (ultraschallbehandelt + hochdruckhomogenisiert). Abweichend von den anderen Miniemulsionen konnte nur in der Formulierung mit Mandelöl (ultraschallbehandelt + hochdruckhomogenisiert) nach Lagerung eine Verdoppelung der mittleren Partikelgröße im Bereich D90 (volumetrisch) nachgewiesen werden. Eine Signifikanz dieser Veränderung konnte nicht nachgewiesen werden. Grundlegend konnte gezeigt werden, dass durch Anwendung beider gewählter Emulgierverfahren Partikelgrößen im gewünschten Bereich einer Miniemulsion erzeugt werden können. Dies erfolgt unabhängig vom verwendeten Öl. Alle Miniemulsionen (Ausnahme Mandelöl) wiesen nach Lagerung von mehr als 5 Monaten ähnliche Partikelgrößenverteilungen wie bei Herstellung auf. Beide Emulgiertechniken stellen somit langfristig stabile Miniemulsionen bereit. Die zusätzliche Anwendung von Hochdruckhomogenisierung führte dabei signifikant zur Entstehung kleinerer Partikel in den Formulierungen ($p \leq 0,01$, ausgenommen Mandelöl).

Tabelle 21 Partikeldurchmesser in Miniemulsionen mit Leitungswasser, wirkstoffbeladenen Ölen und 0,03 g Tween 80/mL in Abhängigkeit der verwendeten Emulgiertechnik.

Die Tabelle zeigt die Partikeldurchmesser in μM im Bereich des volumetrischen Durchmessers D10, D50 und D90. Die Messung erfolgte am Mastersizer X (Malvern Panalytical B.V., Niederlande) zu den Messzeitpunkten t direkt nach Herstellung (t_0) und nach 163 bzw. 167 Tagen. Vor der Messung wurde das Probengefäß einmal invertiert. Die Probenahme erfolgte per Einwegtropfer aus der Mitte der Miniemulsion. MCT = *medium chain triglycerids*-mittelkettige Fettsäuren, D90 = volumetrischer Durchmesser von 90% der Partikel in der Miniemulsion ist kleiner als der angegebene Partikeldurchmesser, analog D10 = 10%, D50 = 50%.

Emulgiertechnik	Messzeitpunkt	Partikeldurchmesser D (volumetrisch) [μm]		
		D10	D50	D90
<i>Ultraschall</i>				
<i>MCT-Öl</i>	t_0	0,20	0,46	1,04
	$t_{167 \text{ Tage}}$	0,20	0,44	0,99
<i>Rapsöl</i>	t_0	0,21	0,49	1,10
	$t_{167 \text{ Tage}}$	0,21	0,50	1,13
<i>Mandelöl</i>	t_0	0,20	0,45	1,01
	$t_{167 \text{ Tage}}$	0,21	0,50	1,14
<i>Sonnenblumenöl</i>	t_0	0,18	0,38	0,93
	$t_{167 \text{ Tage}}$	0,18	0,38	0,98
<i>Olivenöl</i>	t_0	0,19	0,42	0,94
	$t_{167 \text{ Tage}}$	0,19	0,43	0,98
<i>Ultraschall und Hochdruck</i>				
<i>MCT-Öl</i>	t_0	0,17	0,31	0,60
	$t_{163 \text{ Tage}}$	0,17	0,30	0,56
<i>Rapsöl</i>	t_0	0,17	0,30	0,62
	$t_{163 \text{ Tage}}$	0,17	0,30	0,58
<i>Mandelöl</i>	t_0	0,17	0,32	0,65
	$t_{163 \text{ Tage}}$	0,18	0,35	1,29
<i>Sonnenblumenöl</i>	t_0	0,17	0,31	0,62
	$t_{163 \text{ Tage}}$	0,16	0,29	0,55
<i>Olivenöl</i>	t_0	0,17	0,31	0,59
	$t_{163 \text{ Tage}}$	0,17	0,30	0,61

Einfluß des Emulgierverfahrens auf die Wiederfindung des Wirkstoffes in Miniemulsionen

Die Anwendung von Ultraschall- und Hochdruckhomogenisatoren bei der Herstellung von Miniemulsionen könnte möglicherweise eine Veränderung des Wirkstoffes im NEM hervorrufen. Eine mögliche Minderung des Wirkstoffbestandteiles in den Formulierungen musste demnach geprüft werden. Dazu wurden die Wirkstoffkonzentrationen als Luteinäquivalent in mg/mL in den jeweiligen Ölphasen und in den Formulierungen M1 bis M6 nach deren Herstellung chromatographisch bestimmt. Die Zusammensetzung der Präemulsionen M1 bis M6 sind dem Anhang zu entnehmen (Tabelle A 7). Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors bei Herstellung wurden die Ergebnisse mit den detektierten Wirkstoffkonzentrationen der reinen un- behandelten Ölphasen (Kontrolle) verglichen. Die Tabelle 22 zeigt die Wirkstoffveränderung in den Miniemulsionen nach Anwendung des Emulgierverfahrens im Vergleich zur jeweiligen Ölphase sowie die theoretisch zu erwartende Wirkstoffkonzentration gemäß Einwaage und Herstellerangabe.

Tabelle 22 Wirkstoffveränderungen in den Miniemulsionen nach Behandlung mit Ultraschall- und Hochdruckhomogenisierung.

Dargestellt ist die prozentuale Veränderung der Wirkstoffkonzentration des Luteinäquivalents in den Miniemulsionen M1 bis M6 im Vergleich zur wirkstoffbeladenen Ölphase (Kontrolle) sowie die analytisch nachgewiesenen Mengen an Luteinäquivalent in mg/mL vor und nach Anwendung des Emulgierverfahrens. Aliquote der Miniemulsionen und Kontrollen wurden extrahiert und mittels RP-HPLC analysiert. Die Bestimmung der Wirkstoffkonzentrationen erfolgte als Luteinäquivalent in mg/mL. Anschließend konnten prozentuale Veränderungen der Konzentration an Luteinäquivalent im Vergleich zur jeweiligen Ölphase berechnet werden. Vergleichend ist die aus der Einwaage der Wirkstoffträger zu erwartende (theoretische) Menge an Luteinäquivalent aufgezeigt. c (LÄ) = Konzentration Luteinäquivalent, SD = Standardabweichung, M1 Lutein/Tween 80, M2 Lutein/Tween 80/Biozate 1, M3 Luteinester/Tween 80, M4 Luteinester/Tween 80/Biozate 1, M5 Lutein/Luteinester/Tween 80, M6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1. Statistik: t-Test, *signifikant ($p < 0,05$), **hoch signifikant ($p < 0,01$) zur Kontrolle.

Präemulsionen	Veränderung von c (LÄ) [%]	c (LÄ) [mg/mL]		
		nach Anwendung des Emulgierverfahrens	nach Lösen in der Ölphase	theoretisch
M1	49,0 ± 5,1**	6,60 ± 0,23	4,43 ± 0,32	10,00
M2	67,7 ± 6,0**	7,43 ± 0,26		
M3	8,3 ± 1,6*	12,35 ± 0,18	11,40 ± 0,31	12,00
M4	-4,1 ± 1,9	10,69 ± 0,47		
M5	-13,9 ± 20,5	14,75 ± 3,50	17,12 ± 1,87	22,00
M6	-4,7 ± 8,9	16,31 ± 1,53		

Grundsätzlich zeigte sich hier klar die unzureichende Extraktion von Lutein aus dem verkapselten Wirkstoffträger Lutein 5% in der Ölphase unter Anwendung von milden Bedingungen bei der Probenaufbereitung. Wie bereits in der vorangegangenen Grundanalyse der Wirkstoffträger (4.2.1) wurde nicht die theoretische zu erwartende Menge an Luteinäquivalent nach ausschließlichem Lösen in Öl- und Wasserphase nachgewiesen. Dagegen zeigte sich, dass die Anwendung des Emulgiervfahrens von Ultraschall mit Hochdruckhomogenisierung eine Freisetzung des Luteins aus der Verkapselung hervorrief. Dies führte zu einem starken Anstieg der Menge an Luteinäquivalent in den Miniemulsionen mit Lutein 5% (M1, M2) nach dem Emulgiervorgang. Demnach konnte eine höhere Extrahierbarkeit des frei zugänglichen Luteins hervorgerufen werden. In Anhängigkeit davon konnte Lutein als stabile Substanz gegenüber dem angewendeten Emulgiervfahren (ultraschallbehandelt + hochdruckhomogenisiert) definiert werden, wobei ein Schutz möglicherweise durch die unbekanntete Verkapselung hervorgerufen wurde. In den luteinhaltigen Miniemulsionen konnte für M1 ein Anstieg der Luteinkonzentration um $49,0 \pm 5,1\%$ sowie in M2 ein Anstieg von $67,7 \pm 6,0\%$ ermittelt werden. Auch für Luteinester aus Oleoresin war eine inhomogene Verteilung des Wirkstoffes zu erwarten. Hier wurde jedoch durch Anwendung des Emulgiervfahrens keine so markante weitere Freisetzung von Luteinäquivalentmengen hervorgerufen. Vielmehr betrafen die Schwankungen den Rahmen der zu erwartenden inhomogenen Verteilung des Wirkstoffes im Oleoresin. Während in der Miniemulsion M3 (Wirkstoff Luteinester) nach dem Emulgieren eine Zunahme der Konzentration an Luteinäquivalent festgestellt wurde ($8,3 \pm 1,6\%$), nahm in der Emulsion M4 mit gleichem Wirkstoff die Konzentration um $4,1 \pm 1,9\%$ ab. Eine Reduzierung der Wirkstoffmengen konnten auch für die Miniemulsionen M5 und M6, welche jeweils beide Wirkstoffformen enthielten, ermittelt werden. Interessanterweise fiel die Freisetzung des integrierten Lutein 5% hier nicht in dem hohen Maße aus, wie bei M1 und M2. Schwankungen bzw. Abnahmen betrafen hier wahrscheinlich die Schwankungen des Wirkstoffes aus dem Oleoresin. Die Abnahme in der Miniemulsion M5 mit dem Emulgator Tween 80 war dabei sehr viel höher ($13,9 \pm 20,5\%$) als in der wirkstoffidentischen Formulierung M6 mit beiden Emulgatoren ($4,7 \pm 8,9\%$). Möglicherweise bot Biozate 1 einen minimalen Schutz der eingebrachten Wirkstoffe in den Formulierungen gegenüber den angewendeten Emulgiervfahren. Der Unterschied in den Wirkstoffveränderungen zwischen den beiden Miniemulsionen ohne und mit Biozate 1 war stets signifikant ($p < 0,05$). In den Formulierungen M3 und M4 (Wirkstoff Luteinester) konnte diese mögliche Schutzfunktion durch Biozate 1 jedoch nicht gezeigt werden. Obwohl es in der Formulierung M2 zu einer höheren Zunahme des Wirkstoffes Lutein nach

Emulgieren kam, kann nicht eindeutig geklärt werden, inwiefern hier ebenso Biozate 1 eine Rolle spielte. Die gewonnenen Resultate geben keinen eindeutigen Beleg für den wirkstoffschützenden Effekt des Molkenproteinhydrolysat bei Anwendung der Emulgiertechniken Ultraschall und Hochdruckhomogenisierung. Sie zeigen aber, dass das Emulgierverfahren keine massive mechanische Belastung für den Wirkstoffträger mit folgender Reduzierung darstellt. Vielmehr kann dadurch ein Aufbrechen von Verkapselungen des Wirkstoffträgers ein Freisetzen von Luteinäquivalent erreicht werden. Das Bereitstellen erforderlicher Mindestwirkstoffmengen in den Miniemulsionen kann durch die Verwendung entsprechend hoher Mengen an Substanz in der Basisölphase modifiziert werden.

4.2.3.2 *Partikelgrößenbestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung*

In weiterführenden Untersuchungen über das Kooperationsprojekt hinaus wurden wirkstoffhaltige Emulsionen ausschließlich mit Ultraschall behandelt, um eine Zerkleinerung der Öltröpfchen in dem Maße zu bewirken, dass Miniemulsionen mit einer Öltröpfchengröße unter $1,0\ \mu\text{m}$ entstehen. Eine Anwendung des Hochdruckhomogenisators war nicht gegeben. Die alleinige Behandlung mit Ultraschall sollte erfahrungsgemäß ebenso dazuführen, dass die mittleren Partikeldurchmesser in den Emulsionen in den Größenordnungen einer Miniemulsion anzufinden waren. Zusätzlich sollte eine gleichmäßige Verteilung der Partikel in der kontinuierlichen Phase die physikalische Stabilität der Emulsion verbessern.

Die Ergebnisse der Partikelgrößenanalyse der Öltröpfchen mit dem Zetasizer Nano ZS (Tabelle 23) zeigten, dass ein durchschnittlicher Partikeldurchmesser von $0,23\ \mu\text{m}$ bis $0,31\ \mu\text{m}$ in den Präemulsionen MO3, MO4, MO5 und MO6 erreicht werden konnte. Eine Einordnung als Miniemulsionen mit Partikelgrößen $\leq 1,0\ \mu\text{m}$ war somit gegeben. Weiterhin war daher eine höhere Stabilität der Partikel bzw. Öltröpfchen gegenüber Sedimentation im Gegensatz zu grobdispersen Emulsionen (Partikelgrößen $\geq 1,0\ \mu\text{m}$) zu erwarten. Das ausschließliche Behandeln mit Ultraschall könnte daher in diesem Fall als geeignetes Verfahren zur Herstellung von Miniemulsionen bewertet werden. Die Fragestellung, ob die Zugabe des Molkenproteinisolates Biozate 1 als Co-Emulgator in den Miniemulsionen MO4 und MO6 zu einer Bildung von Partikeln mit kleinerem Durchmesser und somit stabileren Emulsionen führt, wie es bei ersten Stabilitätsuntersuchungen gezeigt werden konnte, bleibt offen [53]. Vergleicht man die Partikelgrößen zwischen den jeweiligen Miniemulsionen mit Tween 80 und Biozate 1 mit denen die ausschließlich Tween 80 enthalten, zeigt sich, dass die Miniemulsion MO4 einen signifikant ($p < 0,01$) kleineren Partikeldurchmesser im Vergleich zur Miniemulsion MO3 ohne Biozate 1 aufweist. Dies

wird beim Vergleich der Miniemulsion MO6 mit MO5 nicht festgestellt. In MO6 (Tween 80 und Biozate 1) wurden nach Herstellung signifikant ($p < 0,05$) größere Partikeldurchmesser detektiert als in der Miniemulsion MO5 (Tween 80).

Tabelle 23 Durchschnittliche Partikelgrößen in Miniemulsionen mit Leitungswasser, wirkstoffbeladenen Ölen und Emulgatoren nach Behandlung mit Ultraschallhomogenisierung.

Die Ermittlung der Partikelgröße erfolgte mit dem Zetasizer Nano ZS mit Titrator (Malvern Panalytical B.V., Niederlande) direkt nach Herstellung der Miniemulsionen. Aliquote der Miniemulsionen wurden 1:400 (v/v) mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Partikelgrößenbestimmung erfolgte bei 445 nm als Dreifachbestimmung. SD = Standardabweichung. MO3 Luteinester/Tween 80, MO4 Luteinester/Tween 80/Biozate 1, MO5 Lutein/Luteinester/Tween 80, MO6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1.

Probenbezeichnung	durchschnittliche Partikelgröße [μm]	SD [μm]
MO3	0,31	0,0036
MO4	0,26	0,0020
MO5	0,23	0,0019
MO6	0,25	0,0040

4.3 PHYSIKOCHEMISCHE CHARAKTERISTIK VON LUTEIN UND LUTEINESTERN IN ÖLEN, MI-NIEMULSIONEN UND FERTIGREZEPTUREN

Um Nahrungsergänzungsmittel zu konzipieren, sind Untersuchungen der Wirkstoffe in deren Formulierungen hinsichtlich Stabilität gegenüber unterschiedlichen Behandlungsmethoden oder verschiedener Lagerung grundlegend erforderlich. Die Charakterisierung des Wirkstoffverhaltens in den jeweiligen Formulierungen gegenüber bestimmten physikalischen und chemischen Bedingungen ermöglicht weiterführend spezifische Studien wie z.B. zur Resorptions- und Bioverfügbarkeit.

4.3.1 Stabilität der Wirkstoffe gegenüber Lagerung

4.3.1.1 Stabilität von Luteinestern in MCT-Öl

Für die Untersuchung der Lagerstabilität wurden die Wirkstoffkonzentrationen (Luteinäquivalent) in Proben mit dem Wirkstoffträger Oleoresin gelöst in MCT-ÖL (60 mg/mL) über einem Zeitraum von 6 Monaten geprüft. Den Proben wurden zu definierten Zeiten Aliquote entnommen, diese extrahiert und mittels RP-HPLC analysiert. Die Lagerung erfolgte jeweils bei Raumtemperatur, 4°C und -20°C im Dunkeln. Die zu den spezifischen Zeitpunkten detektierten Mengen an Luteinäquivalent sind der Tabelle 24 zu entnehmen.

Tabelle 24 Lagerstabilität von Luteinestern aus Oleoresin in MCT-Öl bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen.

Dargestellt sind die mittels RP-HPLC ermittelten Konzentrationen von Luteinestern über einen Lagerzeitraum von 6 Monaten als Luteinäquivalent in mg/ mL. 60 mg Oleoresin wurden in 1 mL MCT-Öl gelöst (Dreifachbestimmung). Aliquote der Öllösungen wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur, 4°C und -20°C gelagert und zu spezifischen Zeitpunkten t extrahiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Proben mittels RP-HPLC. c (LÄ) = Konzentration Luteinäquivalent.

Lagerbedingungen	c (LÄ) [mg/mL]			
	t_0	$t_{10 \text{ Tage}}$	$t_{3 \text{ Monate}}$	$t_{6 \text{ Monate}}$
Raumtemperatur	$10,39 \pm 1,25$	$11,32 \pm 0,87$	$11,73 \pm 0,67$	$11,22 \pm 0,34$
4°C	$10,39 \pm 1,25$	$13,60 \pm 1,36$	$12,91 \pm 0,44$	$13,61 \pm 0,58$
-20°C	$10,39 \pm 1,25$	$10,88 \pm 1,15$	$12,76 \pm 1,21$	$13,57 \pm 0,75$

Bei keiner der drei gewählten Lagerbedingungen war eine Abnahme der Wirkstoffkonzentrationen festzustellen. Zu Beginn lag in allen Proben eine Menge an Luteinäquivalent von $10,39 \pm 1,25$ mg/mL vor. In den Proben, welche bei Raumtemperatur gelagert wurden kam es nach 10 d bereits zu einem geringfügigen Anstieg der Luteinäquivalentmenge auf $11,32 \pm 0,87$ mg/mL. Diese Menge war bis zum Ende des Untersuchungszeitraums annähernd konstant und lag nach 6 Monaten bei $11,22 \pm 0,34$ mg/mL. Ebenso war ein Anstieg der Menge an Luteinäquivalent in den bei 4°C gelagerten Proben zu beobachten. Dieser fiel hier jedoch stärker aus. Nach 10 d betrug die LÄ-Konzentration $13,60 \pm 1,36$ mg/mL. Nach 3 Monaten konnte eine leichte Abnahme auf $12,91 \pm 0,44$ mg/mL verzeichnet werden. Die Luteinäquivalentmenge nach 6 Monaten betrug wiederum $13,61 \pm 0,58$ mg/mL. Auch die Lagerung bei -20°C führte über den Lagerzeitraum stetig zur Zunahme der Luteinäquivalentmenge. Nach 6 Monaten lag die LÄ-Konzentration bei $13,57 \pm 0,75$ mg/mL und war fast identisch mit der Menge der Proben, welche bei 4°C gelagert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass Luteinester in MCT-Öl über einem Zeitraum von 6 Monaten stabil sind. Dabei hat die Art der Lagerung keinen signifikanten Einfluss auf die Stabilität. Aufgrund der höheren Zunahme der Wirkstoffmenge im Vergleich zur Lagerung bei RT ist eine Aufbewahrung bei 4°C oder -20°C sinnvoll. Wobei die Lagerung bei 4°C empfohlen wird, um praktikabel Auftau- und Gefrierprozesse zu umgehen. Die beobachtete leichte Zunahme der Menge an Luteinäquivalent in den Proben ist möglicherweise auf die Schwankungen des Wirkstoffträgers Oleoresin zurückzuführen. Als Naturprodukt sind hier Abweichungen durch die inhomogene Verteilung der Luteinester im Oleoresin möglich. Dies kann wiederum zu minimalen Differenzen hinsichtlich der Extrahierbarkeit und Analyse führen.

4.3.1.2 Stabilität von Lutein und Luteinestern in Miniemulsionen

Ebenso erfolgte die Bestimmung der Wirkstoffstabilität in verschiedenen Miniemulsionen (Präemulsionen) bei Herstellung und nach 6 Monaten. Die Emulsionen erfüllten die Anforderung hinsichtlich der Partikelgrößenverteilung einer Miniemulsion. Sie enthielten in der Ölphase den Wirkstoff in Form von Lutein und/oder Luteinestern ohne weitere Zusätze. In die Wasserphase wurden die jeweiligen Emulgatoren Tween 80 und/oder Biozate 1 eingebracht. Die Untersuchungen erfolgten an den Miniemulsionen M1 bis M6 (Tabelle A 7). Die Tabelle 25 zeigt u.a. die prozentuale Veränderung der Menge an Luteinäquivalent in den verschiedenen Miniemulsionen nach Lagerung für 6 Monate bei 4°C im Dunkeln.

Tabelle 25 Stabilität von Lutein und Luteinestern in Miniemulsionen bei Lagerung.

Dargestellt sind die ermittelten Konzentrationen an Luteinäquivalent in den Miniemulsionen M1 bis M6 zum Zeitpunkt der Herstellung (t_0) und nach 6 Monaten ($t_{6 \text{ Monate}}$) Lagerung bei 4°C im Dunkeln. Zum Messzeitpunkt wurden Aliquote der Miniemulsionen extrahiert und mittels RP-HPLC analysiert. Die Bestimmung der Wirkstoffkonzentrationen erfolgte als Luteinäquivalent in mg/mL. Anschließend konnte der jeweilige prozentuale Anteil der Konzentration im Vergleich zum Zeitpunkt t_0 (100%) berechnet und die jeweilige Differenz angegeben werden (- Abnahme, + Zunahme). c (LÄ) = Konzentration Luteinäquivalent, M1 Lutein/Tween 80, M2 Lutein/Tween 80/Biozate 1, M3 Luteinester/Tween 80, M4 Luteinester/Tween 80/Biozate 1, M5 Lutein/Luteinester/Tween 80, M6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1. Statistik: t-Test; * $p < 0,05$ signifikant, ** $p < 0,01$ hoch signifikant zu t_0 .

	c (LÄ) [mg/mL]		Differenz c (LÄ) [%]
	t_0	$t_{6 \text{ Monate}}$	
M1	6,60 ± 0,23	2,91 ± 0,09**	-56,0
M2	7,43 ± 0,26	4,73 ± 0,26**	-36,3
M3	12,35 ± 0,18	9,75 ± 0,47**	-21,1
M4	10,69 ± 0,47	11,17 ± 0,55**	+4,5
M5	14,75 ± 3,50	8,00 ± 0,90*	-45,8
M6	16,31 ± 1,53	9,09 ± 0,72*	-44,3

Die Miniemulsionen M1 und M2 enthielten ausschließlich den Wirkstoff Lutein. Hier konnte bei den gewählten Lagerbedingungen eine hochsignifikante Abnahme der Luteinäquivalentmengen nachgewiesen werden. Für die Formulierung M1 betrug die Senkung 56,0%. Dagegen fiel die Abnahme mit 36,3% in der Miniemulsion M2 sehr viel geringer aus. Die Formulierung M2 enthielt zusätzlich den Emulgator Biozate 1. Hier könnte somit ein Nachweis für die wirkstoffeschützende Funktion des natürlichen Emulgators gegeben sein. Grundsätzlich erklärt sich die markante Abnahme der Wirkstoffmenge in M1 und M2 mit der hohen Instabilität von freiem Lutein.

In den Miniemulsionen M3 und M4 waren ausschließlich Luteinester aus Oleoresin als Wirkstoff vorliegend. Diesbezüglich konnte in der Formulierung M3 eine Senkung der Wirkstoffkonzentration von 21,1% nachgewiesen werden. Die Abnahme war zwar unerwartet hoch, fiel aber geringer aus als die Abnahme der Wirkstoffmengen in M1 und M2. Im Gegensatz dazu kam es in der Formulierung M4 zum leichten Anstieg der Menge an Luteinäquivalent um 4,5%. Demnach könnte die Zugabe des Emulgators Biozate 1 in M4 die Luteinester vor Abbau während der Lagerung schützen.

In den Formulierungen M5 und M6 mit der Kombination Lutein und Luteinester wurden ebenso Wirkstoffabnahmen detektiert. Nach 6 Monaten Lagerung betrug die Menge an Luteinäquivalent in der Miniemulsion M5 nur noch $8,0 \pm 0,9$ mg/mL (Abnahme 45,8%). Analog konnte in der Formulierung M6 eine Konzentration an Luteinäquivalent von $9,1 \pm 0,7$ mg/mL ermittelt werden (Abnahme 44,27%). Wiederholt war der Abbau des Wirkstoffes in der Emulsion mit Biozate 1 (M6) minimal geringer als in der Formulierung, welche nur Tween 80 enthält. Untersucht man diese Formulierungen qualitativ im Hinblick auf den definierten Abbau der einzelnen Wirkstoffe im kombinierten Gemisch lag die prozentuale Abnahme von Lutein höher als die der Luteinester. Unerwartet war jedoch die sehr viel hohe Minderung der Luteinester auch im Vergleich zu den Miniemulsionen M3 und M4. Möglicherweise finden bei Vorliegen von Wirkstoffkombinationen nicht nur Abbau-, sondern auch Umbauprozesse statt. In diesem Fall könnte eine Hydrolyse der Ester zu freiem Lutein vermutet werden. Ohne Anwesenheit von Luteinestern hätte vermeintlich eine sehr viel stärkere Herabsetzung der Menge an Lutein stattgefunden. Demnach könnte die Verwendung einer Wirkstoffkombination ebenso einen stabilisierenden Effekt auf die Menge an freiem Lutein haben. Grundsätzlich bestätigen die gewonnenen Daten eine höhere Stabilität des Wirkstoffes in luteinesterhaltigen Formulierungen im Vergleich zu Formulierungen mit reinem Lutein oder Wirkstoffkombinationen über einen Lagerzeitraum von 6 Monaten. Eine protektive Wirkung von Biozate 1 gegenüber dem jeweiligen Wirkstoff konnte für die Miniemulsionen M1 und M2 bzw. M3 und M4 aufgezeigt werden. In den Formulierungen M5 und M6 mit den Wirkstoffkombinationen war dieser Effekt weniger eindeutig.

4.3.1.3 Stabilität von Luteinestern in Fertigrezepturen

Nach Konzeption und Herstellung der Miniemulsionen 122 bis 125 (Fertigrezepturen) wurden diese zunächst bei 4°C im Dunkeln gelagert. In regelmäßigen Abständen wurden Aliquote entnommen und die Konzentration des Wirkstoffes als Luteinäquivalent bestimmt. Weiterhin wurde qualitativ das Auftreten von möglichen Umbauprozesse z.B. die Hydrolyse zu Lutein geprüft. Zu jedem Messzeitpunkt erfolgte die Bestimmung des pH-Wertes der Formulierungen. Die Zusammensetzung der Fertigrezepturen ist dem Anhang (Tabelle A 9) zu entnehmen. Als Wirkstoffträger wurde Oleoresin (Wirkstoff Luteinester) in die Formulierungen eingebracht. Die Herstellung wird im Methodenteil (3.2.1.4) beschrieben. Zu spezifischen Messzeitpunkten wurden Proben entnommen, extrahiert und mittels RP-HPLC analysiert. Der Tabelle A 22 des Anhangs sind die analytischen Wirkstoffmengen als Luteinäquivalent sowie die jeweiligen pH-Werte der Formulierungen aller Messzeitpunkte zu entnehmen. Weiterhin im Anhang finden sich die Resultate der physikalischen Stabilität in Bezug auf die Partikelgrößenverteilung (Tabelle A 20). Analog zu den Fertigrezepturen wurde die Wirkstoffstabilität in dem kommerziell erwerblichen Produkt NFS (New Focus™-Spray) über einem Zeitraum von 10 Monaten untersucht. Das Produkt enthielt laut Deklaration den Wirkstoffträger Lutein mit einer Konzentration von 10 mg/mL. Die ermittelten prozentualen Mengen an Luteinäquivalent in den jeweiligen Formulierungen relativ zur Menge bei Herstellung (122-125) bzw. Öffnung (NFS) nach einer Lagerung von 6 und 10 bzw. 12 Monaten sind in der Abbildung 11 graphisch dargestellt.

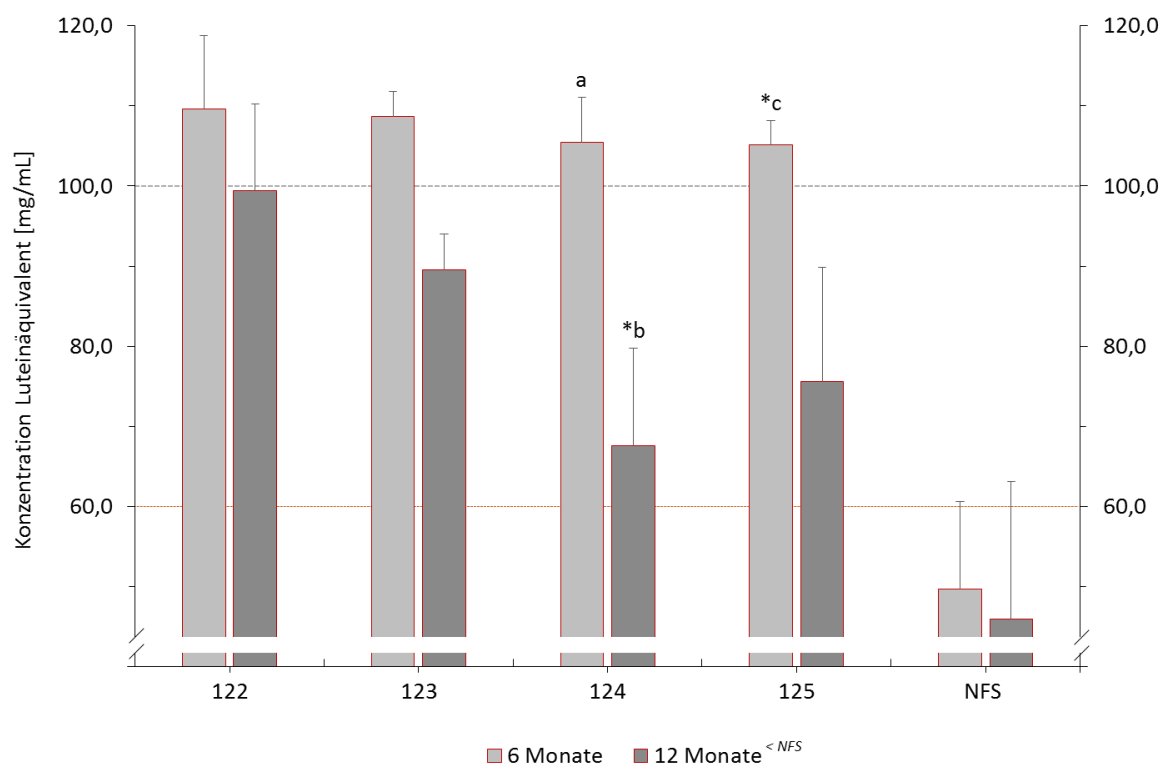


Abbildung 11 Lagerstabilität der Wirkstoffe in den Fertigrezepturen und dem kommerziellen Produkt New Focus™.

Graphisch dargestellt sind die Wirkstoffkonzentrationen als Luteinäquivalent [%] relativ zur Konzentration bei Herstellung in den Fertigrezepturen 122 bis 125 bzw. bei Öffnung im Vergleichsprodukt New Focus™ zu verschiedenen Zeitpunkten nach Lagerung bei 4°C im Dunkeln. Zu spezifischen Zeitpunkten (6 Monate, 10 bzw. 12 Monate) wurden Aliquote der Proben extrahiert und anschließend mittels RP-HPLC analysiert. Die Bestimmung der Wirkstoffkonzentrationen erfolgte als Luteinäquivalent in mg/mL. Anschließend konnte der jeweilige prozentuale Anteil der Konzentration im Vergleich zum Zeitpunkt bei Herstellung/ Öffnung (Kontrolle 100%) berechnet werden. 122 Tween 80/MCT-Öl, 123 Tween 80/Rapsöl, 124 Tween 80/Biozate 1/MCT-Öl, 125 Tween 80/Biozate 1/Rapsöl, NFS New Focus™-Spray Wirkstoff: Lutein, < NFS verkürzter Lagerzeitraum von 10 Monate für New Focus™-Spray. Statistik: t-Test; *p<0,05 signifikant zur Kontrolle; ^ap<0,01 hoch signifikant zu 122; ^bp<0,05 signifikant zu 122; ^cp<0,01 hoch signifikant zu 123.

Bereits nach Herstellung konnte ein markanter Unterschied in den Wirkstoffmengen zwischen den Fertigrezepturen 122 und 124 bzw. 123 und 125 festgestellt werden. Der Unterschied in der Wirkstoffmenge war im Fall der Formulierung 122 zu 124 überdies signifikant. So betrug die Menge an Luteinäquivalent in der Fertigrezeptur 124 mit $7,76 \pm 0,55$ mg/mL fast das Doppelte, wie in der Formulierung 122 mit $4,38 \pm 0,23$ mg/mL. In der Miniemulsion 123 wurde nach Herstellung eine Menge an LÄ von $5,48 \pm 0,20$ mg/mL nachgewiesen. In der Formulierung 125 betrug die Menge an LÄ dagegen $6,86 \pm 0,04$ mg/mL. Im Fall der Formulierungen 123 zu 125 war demnach der Unterschied in der Wirkstoffmenge weniger groß und blieb über dem gesamten Lagerzeitraum stets konstant. Es ist zu vermuten, dass die Differenzen in

der Wirkstoffmenge zwischen den jeweiligen Formulierungen auf Unterschiede beim Einbringen des Oleoresins während des Herstellungsprozess bzw. beim zyklischen Behandeln im Homogenisator zurückzuführen sind. Unabhängig davon wurden die Formulierungen im Weiteren für Untersuchungen genutzt. Gleichwohl war im Zusammenhang mit dem Lagerprozess keine Einordnung des protektiven Einflusses des Emulgators Biozate 1 gegenüber dem eingebrachten Wirkstoff möglich. Vielmehr wurde eine vergleichsweise höhere prozentuale Abnahme an Wirkstoffmenge nach 12 Monaten Lagerung in den jeweiligen Formulierungen mit Biozate 1 beobachtet. Eine stabilisierende Wirkung durch den Emulgator wurde nicht festgestellt. Die pH-Werte der Fertigrezepturen lagen nach Herstellung im Bereich zwischen 4,80 und 5,09. Die Formulierungen wiesen demnach ein saures Milieu auf. Im NFS konnte nach Öffnung des Produktes eine Menge an LÄ von nur $0,53 \pm 0,08$ mg/mL und ein pH-Wert von 3,74 erfasst werden. Dabei handelte es sich bei dem Wirkstoff qualitativ ausschließlich um Lutein. Luteinester wurden nicht detektiert. Die Wiederfindungsrate von Lutein als LÄ war demnach sehr gering und betrug annähernd 5%. Inwiefern eine fehlerhafte Deklaration auf dem Produkt erfolgt ist oder Abbauprozesse vor Öffnung des Produktes zur Senkung der Luteinkonzentration beigetragen haben, bleibt ungeklärt.

Im weiteren Lagerungsverlauf waren in allen Fertigrezepturen nach 6 Monaten Aufbewahrung bei 4°C Wirkstoffzunahmen zu verzeichnen. Dabei war diese Zunahme mit 9,6% in der Formulierung 122 als am höchsten einzuordnen. Im NFS wurde dagegen eine weitere Abnahme der Wirkstoffmenge um 50,3% nachgewiesen. Die Konzentration sank hier auf $0,23 \pm 0,02$ mg/mL. Die pH-Werte aller Formulierungen blieben über den Zeitraum von 6 Monate stabil.

Eine reduzierte Wirkstoffmenge im Vergleich zum LÄ nach Herstellung konnte in den Fertigrezepturen nach 12 Monaten Lagerung nachgewiesen werden. Eine geringfügige Abnahme von weniger als 1% wurde dabei in der Fertigrezeptur 122 ermittelt. Hier betrug die prozentuale Menge an LÄ nach 12 Monaten noch $99,4 \pm 10,8\%$. Dagegen war in der analogen Formulierung 124 mit Biozate 1 die höchste Abnahme an Wirkstoffmenge zu dokumentieren. Die Menge an LÄ reduzierte sich in dieser Formulierung um 32,4%. In den rapsöhlhaltigen Fertigrezepturen 123 und 125 sank die Menge an LÄ auf $89,5 \pm 4,7\%$ (123) bzw. $75,6 \pm 14,3\%$ (125). Einen Hinweis auf den Vorteil der Verwendung eines spezifischen Öles oder der Zugabe von Biozate 1 gaben die Resultate nicht. Für die Fertigrezepturen konnte jedoch die Prämisse eines Wirkstoffgehalts von mindestens 60% nach 12 Monaten Lagerung als gegeben gezeigt werden.

Die pH-Werte der Formulierungen blieben weiter konstant. Im Gegensatz zu den Fertigrezepturen wurde das Präparat NFS abschließend bereits nach 10 Monaten Lagerung untersucht. Da das Produkt erst versetzt zwei Monate nach Herstellung der Fertigrezepturen erworben und geöffnet wurde, ergab sich diese abweichende maximale Lagerzeit. Eine weitere Senkung der Wirkstoffmenge LÄ konnte hier nicht nachgewiesen werden. Die Menge an LÄ von $0,24 \pm 0,04$ mg/mL war nahezu identisch mit der Wirkstoffmenge nach 6 Monaten Lagerung. Eine signifikante Zunahme von Luteinestern war nicht zu beobachten. Der pH-Wert blieb konstant. Die vorliegenden Daten für das NFS zeigen eine hohe Instabilität und Empfindlichkeit von reinem Lutein in diesem Produkt bei Lagerung über einen kurzen Zeitraum. Ferner lässt die mangelnde Wiederfindung des Wirkstoffes bei Öffnung des Produktes die Frage offen, ob ausreichend Wirkstoff in das Produkt eingebracht wurde bzw. wie es zu der markanten Wirkstoffreduzierung gekommen sein kann. Eine Erklärung hierzu wäre der fortlaufende Abbau des Luteins mit dem Zeitpunkt der Herstellung des NFS. Dies würde bedeuten, dass der Wirkstoff unzureichend in der Applikation geschützt bzw. stabilisiert war. Dementgegen scheinen die Luteinester in den gewählten Rezepturen stabilisiert und höchst effektiv vor Verlust geschützt zu sein.

4.3.2 Stabilität der Wirkstoffe gegenüber Ultraschallbehandlung

Neben dem Einsatz von Ultraschall bei der Herstellung der Miniemulsionen wurde dieses mechanische Verfahren auch bei der Probenvorbereitung und Extraktion der zu analysierenden Präparate eingesetzt. Aufgrund dessen wurde die Empfindlichkeit bzw. Stabilität von Lutein und Luteinestern gegenüber dieser physikalischen Größe untersucht. Voruntersuchungen dazu konnten eine Stabilität von Luteinestern aus Oleoresin gegenüber Ultraschallbehandlungen zeigen [140]. Diese Ergebnisse sollten mittels der Untersuchungen des Wirkstoffverhaltens von Lutein bzw. Luteinestern nach Ultraschallbehandlung für 5, 10 und 60 min erweitert dargestellt werden. Der Einfluss der Formulierungszusammensetzung auf die Stabilität wurde ebenso berücksichtigt. Die Untersuchungen erfolgten entsprechend mit Oleoresin 60 mg/mL (60 mg Oleoresin in 1 mL MCT-Öl) sowie den Miniemulsionen M1, M2, M3 und M4. Aliquote der Proben wurden vor (Kontrolle) und nach Behandlung mit Ultraschall extrahiert (3.2.4) und mittels RP-HPLC analysiert (3.2.2). Die Wirkstoffmengen in den Proben wurden als Luteinäquivalent in mg/mL ermittelt. Anschließend konnte der jeweilige prozentuale Anteil der Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (100%) berechnet werden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 26 dargestellt. Der Wirkstoff in Form von Luteinestern gelöst im reinen MCT-ÖL zeigte sich

dabei als relativ stabil. Nach 5 min Ultraschallbehandlung konnte eine Wirkstoffzunahme von 4,4% detektiert werden. Nach 10 min nahm die Wirkstoffmenge dagegen um 8,3% ab. Betrachtet man die prozentuale Menge an Luteinäquivalent in der Probe nach 60-minütiger Ultraschallbehandlung konnten hier $99,58 \pm 4,40\%$ der Luteinester im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Die Veränderungen des Wirkstoffes Luteinester in MCT-ÖL waren in keinem Fall signifikant. Die Erweiterung der Ölphase zu Miniemulsionen mit Wasserphase und Variation des Wirkstoffes sollte nun hinsichtlich einer höheren Stabilität der verwendeten Wirkstoffformen gegenüber physikalischen Einflüssen geprüft werden. In den Miniemulsionen M1 und M2 mit dem Wirkstoffträger Lutein konnte nach 5 min Ultraschallbehandlung ebenso eine Wirkstoffzunahme aufgezeigt werden. Die Zunahme betrug für M1 8,5% und war signifikant zur unbehandelten Probe. Eine nicht signifikante Zunahme von 14,8% konnte für M2 verzeichnet werden. Mit Erhöhung der Behandlungsdauer auf 10 min wurde ebenso eine Zunahme des Wirkstoffes detektiert. Dabei stieg in M2 die Wirkstoffmenge auf $17,1 \pm 2,8\%$ und war signifikant zur Kontrolle. Weniger stark fiel die Zunahme bei M2 aus. Hier betrug die prozentuale Menge an Luteinäquivalent im Vergleich zur unbehandelten Probe $106,4 \pm 5,5\%$. Nach 60-minütiger Behandlung mit Ultraschall konnte für die Formulierungen eine Wirkstoffkonzentration von $94,3 \pm 8,1\%$ (M1) bzw. $100,4 \pm 2,7\%$ (M2) im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Probe nachgewiesen werden. Es zeigt sich, dass der Wirkstoff in der Miniemulsion mit Biozate 1 stabiler gegenüber langer mechanischer Belastung durch Ultraschall ist. Während hier die eingesetzte Wirkstoffmenge nach 60 min erhalten blieb, wurde in der Formulierung M1 eine Abnahme des Wirkstoffes um 5,7% ermittelt. Trotz fehlender Signifikanz im statistischen Vergleich der Daten von M1 zu M2 könnte hier die Biozate 1-Zugabe in M2 als wirkstoffschützende Substanz von Bedeutung sein. Die Miniemulsionen M3 und M4 mit dem Wirkstoff Luteinester wurden gleichermaßen mit Ultraschall behandelt. Während in M3 nach 5 und 10 min die Wirkstoffmenge annähernd konstant blieb, wurde in M4 jeweils eine nicht-signifikante Abnahme des prozentualen Luteinäquivalents (5 min 8,3%, 10 min 6,2%) nachgewiesen. Nach einer Behandlung mit Ultraschall für 60 min betrug die prozentuale Menge des Wirkstoffes im Vergleich zur Kontrolle $98,5 \pm 4,9\%$ in M3 und $98,6 \pm 2,6\%$ in M4. Die Abnahme der Wirkstoffmenge war in diesem Fall mit 1,5 bzw. 1,4% jeweils höher als bei der analogen Behandlung von Luteinestern in reiner Ölphase (Abnahme 0,4%). Der Unterschied war jedoch in keinem Fall signifikant.

Tabelle 26 Einfluss von Ultraschall auf die Stabilität von Lutein und Luteinestern in reiner Ölphase und in Miniemulsionen.

Dargestellt sind die mittels RP-HPLC-Analyse ermittelten prozentualen Konzentrationen Luteinäquivalent nach 5 min, 10 min und 60 min Behandlung mit Ultraschall im Ultraschallbad Sonorex RK 100 im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Proben (Kontrolle). Vor und nach der Behandlung wurden Aliquote der Proben extrahiert und mittels RP-HPLC analysiert. Die Bestimmung der Wirkstoffkonzentrationen erfolgte als Luteinäquivalent in mg/mL. Anschließend konnte der jeweilige prozentuale Anteil der Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (100%) berechnet werden. c (LÄ) = Konzentration Luteinäquivalent, M1 Lutein/Tween 80, M2 Lutein/Tween 80/Biozate 1, M3 Luteinester/Tween 80, M4 Luteinester/Tween 80/Biozate 1, Oleoresin 60 mg/mL = 60 mg Oleoresin in 1 mL MCT-Öl. Statistik: t-Test; * $p < 0,05$ signifikant zur Kontrolle; ^{##} $p < 0,01$ hoch signifikant zu 60 min.

	c (LÄ) [%]		
	5 min	10 min	60 min
M1	108,5 ± 3,1*	106,4 ± 5,5	94,3 ± 8,1
M2	114,8 ± 1,9 ^{##}	117,1 ± 2,8 ^{##}	100,4 ± 2,7
M3	100,4 ± 7,2	100,4 ± 7,2	98,5 ± 4,9
M4	91,7 ± 9,5	93,8 ± 6,7	98,6 ± 2,6
Oleoresin 60 mg/mL	104,4 ± 9,9	91,7 ± 4,1	99,6 ± 4,4

4.3.3 Stabilität der Wirkstoffe gegenüber physiologischer Körpertemperatur

Zur Simulation der Aufnahme und Verstoffwechslung der wirkstoffhaltigen Formulierungen *in vitro* wurden die Präparate mit spezifischen synthetischen Verdauungssäften unter physiologischen Bedingungen inkubiert. Dies erfolgte bei einer Temperatur von 37°C. Um mögliche wirkstoffverändernde Effekte durch diese Temperaturerhöhung im Vergleich zur Raumtemperatur und in Abhängigkeit relevanter Zusatzstoffe in der Emulsion einschätzen zu können, wurden Oleoresin 60 mg/mL sowie die Präemulsionen M1 bis M4 hinsichtlich ihrer thermischen Stabilität untersucht. Aliquote der Formulierungen wurden für 30 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Zu Versuchsbeginn (Kontrolle) und nach Inkubation wurden die jeweiligen Proben extrahiert und die Wirkstoffgehalte als Luteinäquivalent in mg/mL mittels RP-HPLC detektiert. Anschließend konnte eine prozentuale Differenzprüfung im Vergleich zur Kontrolle vorgenommen werden. Die ermittelten Daten sind der Tabelle 27 zu entnehmen. Beginnend mit der Stabilität von Luteinestern aus Oleoresin gelöst in MCT-Öl konnte nach 30-minütiger Behandlung ein minimaler, nicht signifikanter Anstieg der Wirkstoffmenge um 1,3% im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Demnach können die Luteinester als kurzfristig stabil gegenüber einer Temperatur von 37°C beurteilt werden. Auch die Ergebnisse der analogen Untersuchungen mit den Präemulsionen M1 bis M4 zeigten mit Ausnahme für die Formulierung M1 eine Zunahme der Wirkstoffmengen bei Inkubation mit einer Temperatur von 37°C für 30 min.

In M1 betrug die detektierte Abnahme der Luteinmenge als Luteinäquivalent hochsignifikante 11,6%. Dagegen war eine signifikante Zunahme der Wirkstoffmenge von 13,8% im analogen Präparat M2 mit Zusatz von Biozate 1 nachweisbar. Ein unerwarteter hoher Anstieg der Wirkstoffmenge von 33,8% konnte in der Miniemulsion M3 (ohne Biozate 1) detektiert werden. Der Anstieg in der analogen Miniemulsion M4 betrug dagegen nur 0,8% und war nicht signifikant. Grundsätzlich erscheinen Lutein bzw. Luteinester in den Emulsionen stabil gegenüber physiologischen Temperaturbedingungen. Die teilweise unerwartete prägnante Zunahme der Wirkstoffmenge könnte möglicherweise auf die inhomogene Verteilung von Lutein bzw. Luteinestern in der jeweiligen Trägerphase zurückzuführen sein. Mit Erwärmen der Formulierungen könnten hier Veränderungen in der Viskosität der Dispersionen oder auch die Freigabe der Wirkstoffe aus der Verkapselung bzw. pflanzlichen Zellartefakten hervorgerufen worden sein, was eine bessere Extrahierbarkeit während der Probenaufbereitung mit sich gebracht hat. Die markante Abweichung der Miniemulsion M1 ist zunächst nicht erklärbar. Könnte aber Indiz für die Empfindlichkeit von Lutein gegenüber Temperaturveränderungen sein. Das in der gleichartigen Formulierung M2 eine Zunahme der Wirkstoffmenge Lutein festzustellen war, kann möglicherweise auch auf stabilisierende Effekte durch den vorhandenen Emulgator Biozate 1 zurückzuführen sein. Da in M4 die Zunahme der Wirkstoffmenge sehr viel geringer war als in M3 kann eine positive Wirkung durch die Zugabe von Biozate 1 in dieser Konstellation nicht eindeutig aufgezeigt werden.

Tabelle 27 Kurzfristige Effekte physiologischer Körpertemperatur auf die Stabilität von Lutein und Luteinestern in reiner Ölphase und in Miniemulsionen.

Dargestellt sind die mittels RP-HPLC ermittelten Konzentrationen an Luteinäquivalent in den Formulierungen ohne Behandlung (Kontrolle) und mit Inkubation bei 37°C für 30 min im Dunkeln. Aliquote der Proben wurden extrahiert und mittels RP-HPLC analysiert. Die Bestimmung der Wirkstoffkonzentrationen erfolgte als Luteinäquivalent in mg/mL. Anschließend konnte der jeweilige prozentuale Anteil der Konzentration im Vergleich zur Kontrolle berechnet und die jeweilige Differenz angegeben werden (- Abnahme, + Zunahme). c (LÄ) = Konzentration Luteinäquivalent, M1 Lutein/Tween 80, M2 Lutein/Tween 80/Biozate 1, M3 Luteinester/Tween 80, M4 Luteinester/Tween 80/Biozate 1, Oleoresin 60 mg/mL = 60 mg Oleoresin in 1 mL MCT-Öl. Statistik: t-Test; *p<0,05 signifikant, **p<0,01 hoch signifikant zur Kontrolle.

	c (LÄ) [mg/mL]		
	Kontrolle	30 min	Differenz c (LÄ) [%]
M1	2,9 ± 0,1	2,6 ± 0,1**	-11,6
M2	4,7 ± 0,3	5,4 ± 0,1*	+13,8
M3	9,8 ± 0,5	13,0 ± 0,0**	+33,5
M4	11,2 ± 0,5	11,3 ± 0,1	+0,8
Oleoresin 60 mg/mL	10,4 ± 0,1	10,5 ± 0,1	+1,3

Die Untersuchungen zum Einfluss der physiologischen Körpertemperatur von 37°C wurden präzisiert und für ausgewählte Formulierungen erweitert. Individuell wurde dazu die Wirkstoffstabilität der Ölphase Oleoresin 60 mg/mL sowie die der Miniemulsionen MO3, MO4, MO5 und MO6 bei einer langfristigen Temperaturbehandlung von 2 h überprüft. Wie bereits nach kurzfristiger Behandlung nahm auch bei einer zweistündigen Inkubation bei 37°C die Menge an Luteinäquivalent in der Oleoresinöllösung zu. Es konnte eine Erhöhung der Wirkstoffkonzentration um 2,7% im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Damit wird auch eine sehr gute langfristige Stabilität der Luteinester in MCT-Öl gegenüber einer Temperatur von 37°C bestätigt. Die analog untersuchten Miniemulsionen mit Luteinestern (MO3, MO4) und der Wirkstoffkombination Lutein und Luteinester (MO5, MO6) wurden ausschließlich hinsichtlich der langfristigen Temperaturstabilität der Wirkstoffe überprüft. Nach der Behandlung der Formulierungen MO3 bis MO6 für 2 h bei 37°C im Dunkeln konnte keine signifikante Abnahme der Wirkstoffkonzentrationen detektiert werden. Unabhängig von der Emulsionszusammensetzung sanken die Luteinäquivalentmengen in den Proben geringfügig, eine Wirkstoffzunahme wurde nicht detektiert. Die finalen prozentualen Luteinäquivalente betragen für MO3 97,5 ± 2,3%, MO4 97,3 ± 2,7%, MO5 97,6 ± 4,3% und MO6 96,6 ± 5,7% (Abbildung 12). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Veränderungen in den Emulsionen mit Lutein und Luteinestern (MO5, MO6) für beide Wirkstoffe gleich waren. Ein vermehrter Abbau von Lutein erfolgte nicht. Bei Vergleich der Wirkstoffstabilitäten hinsichtlich der Anwesenheit

von Biozate 1 in den Formulierungen konnten keine prägnanten Unterschiede aufgezeigt werden. Eine stabilisierende bzw. wirkstoffschützende Funktion des Emulgators ist hier nicht nachweisbar. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Stabilität der Wirkstoffe insbesondere von Luteinestern gegenüber Temperaturen im physiologischen Bereich gegeben ist.

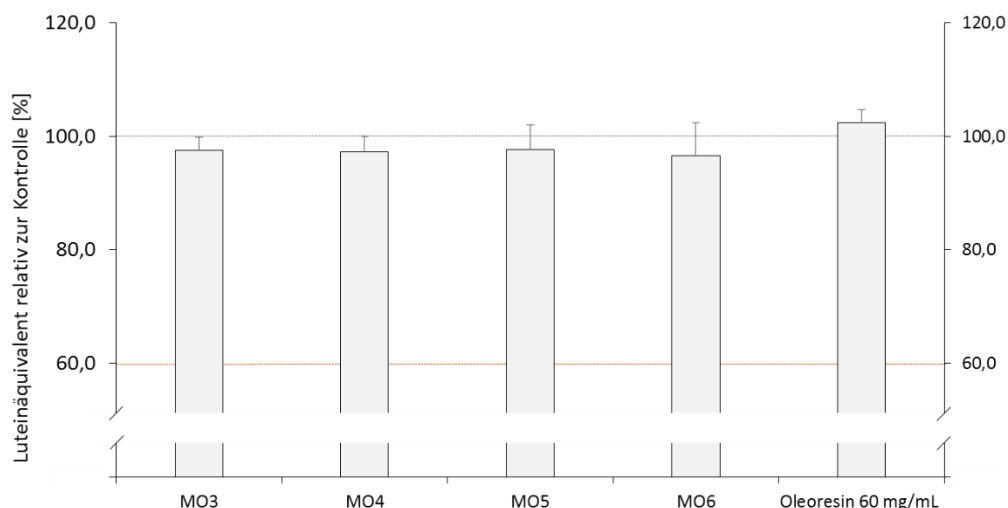


Abbildung 12 Langfristige Effekte physiologischer Körpertemperatur auf die Stabilität von Lutein und Luteinestern in reiner Ölphase und in Miniemulsionen.

Dargestellt ist die prozentuale Wirkstoffmenge des Luteinäquivalents in den inkubierten Proben im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Probe (Kontrolle). Aliquote der Formulierungen wurden bei 37°C im Dunkeln für 2 h inkubiert, danach extrahiert und mittels RP-HPLC die Menge an Luteinäquivalent in mg/mL detektiert. Analog wurde die Wirkstoffmenge in den entsprechenden Kontrollen ermittelt und die prozentuale Menge an Luteinäquivalent relativ zur Kontrolle berechnet. Oleoresin 60 mg/mL = 60 mg Oleoresin in 1 mL MCT-Öl, MO3 Luteinester/Tween 80, MO4 Luteinester/Tween 80/Biozate 1, MO5 Lutein/Luteinester/Tween 80, MO6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1.

4.3.4 Stabilität der Wirkstoffe gegenüber unterschiedlichen pH-Bedingungen

Von hoher Relevanz für die physikochemische Bewertung des zu konzipierenden NEMs, ebenso wie für weitere Resorptionsverfügbarkeitsstudien war das Wirkstoffverhalten gegenüber ausgewählten sauren und basischen Lösungen und somit gegenüber bestimmten pH-Bedingungen. Auch hier wurden anfänglich mögliche Veränderungen in der Luteinesterkonzentration von in MCT-Öl gelösten Oleoresin untersucht. Dazu wurde die luteinesterbeladene reine Ölphase (Oleoresin 60 mg/mL) für 30 min bei 37°C unter den Bedingungen von pH 1,0 ± 0,2, pH 7,0 ± 0,2 und pH 9,0 ± 0,2 inkubiert. Nach Extraktion und Analyse mittels RP-HPLC wurden die Konzentrationen in Luteinäquivalent mg/mL ermittelt. Als Kontrollprobe diente die Probe, welche im neutralem Milieu (pH 7,0 ± 0,2) inkubiert wurde. Es konnte so die prozentuale Luteinäquivalentmenge relativ zur Kontrolle angegeben werden. Die Beurteilung kurzfris-

tiger Effekte des jeweiligen pH-Milieus auf die Wirkstoffstabilität und -form sollte so ermöglicht werden. In der Abbildung 13 a sind u.a. die jeweiligen ermittelten prozentualen Konzentrationen des LÄs für Oleoresin 60 mg/mL graphisch dargestellt. Bei einem pH-Wert von 1,0 nimmt die Menge an LÄ um 6,2% ($106,2 \pm 1,9\%$) zu. Eine Erklärung für den Anstieg könnte eine möglicherweise erhöhte Extrahierbarkeit hervorgerufen aus säurebedingt aufgelösten pflanzlichen Artefakten sein. Dagegen wurde bei dem pH-Wert von 9,0 eine Senkung der Wirkstoffmenge um 7,2% ($92,8 \pm 5,7\%$) ermittelt. Die statistische Analyse der jeweils erhobenen Werte konnte keine Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle feststellen. Kurzfristig sind Luteinester gegenüber einem sauren Milieu als stabil zu bewerten. Dagegen scheint ein degradierender Effekt gegenüber dem pH-Wert von $9,0 \pm 0,2$ aufzutreten. Möglicherweise wurde durch das basische Milieu und die vermehrte Anwesenheit von Hydroxiden eine Esterhydrolyse hervorgerufen, die eine Senkung der Luteinestermenge begründen würde. Die Entstehung von freiem Lutein konnte aber nicht nachgewiesen werden.

Eine weitere Aufklärung des Verhaltens und der Stabilität von Lutein und Luteinester gegenüber verschiedenen pH-Bedingungen sollten die analogen Untersuchungen der Präemulsionen M1 bis M4 aufzeigen (Abbildung 13 a). Auch hier konnte in allen Miniemulsionen eine Zunahme des Luteinäquivalents bei Inkubation unter sauren Bedingungen gezeigt werden. Der prozentuale Anstieg war unabhängig von der Wirkstoffform und entsprach annähernd dem Konzentrationsanstieg der reinen Oleoresinöllösung mit Luteinestern. So betrug die prozentuale Menge an Luteinäquivalent nach Inkubation in der Miniemulsion M1 $106,3 \pm 4,9\%$, bei der wirkstoffidentischen Formulierung M2 sogar $117,3 \pm 6,9\%$. Möglicherweise konnte durch das saure Milieu ein weiterer Aufschluß der Verkapselung des Wirkstoffträgers Lutein 5% erreicht werden, was zur Detektion einer höheren Menge an Lutein beitragen würde. Die Miniemulsionen M3 und M4 mit dem Wirkstoff Luteinester wiesen im Vergleich zur unbehandelten Probe eine prozentuale Luteinäquivalentmenge von $105,6 \pm 2,2\%$ (M3) bzw. $108,4 \pm 1,6\%$ (M4) auf. Die Zunahme war ausschließlich im Fall der Formulierung M4 signifikant. Auffällig waren die leicht höheren Zunahmen der Wirkstoffmengen in den Miniemulsionen mit der Emulgatorzugabe Biozate 1 (M2, M4). Demnach könnte hier eine Stabilitätsverbesserung des Wirkstoffes durch Biozate 1 dokumentiert werden. Nach Inkubation der Miniemulsionen unter basischen Bedingungen war abweichend von Oleoresin 60 mg/mL in allen Formulierungen eine geringfügige Zunahme der Menge an Luteinäquivalent nachweisbar. Der Wirkstoffanstieg betrug in M1 1,0% bzw. in M2 4,3%. Eine höhere Zunahme des Wirkstoffes konnte in den luteinester-

haltigen Formulierungen detektiert werden (M3 8,6%, M4 5,3%). Der Anstieg der Luteinäquivalentkonzentration in der Miniemulsion M4 war signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Die Ergebnisse zu den jeweiligen Formulierungen ließen in diesem Fall jedoch keinen eindeutigen Rückschluss auf eine mögliche schützende Wirkung der Zugabe von Biozate 1 zu. Vielmehr erscheinen Lutein und Luteinester in den jeweiligen Emulsionen kurzfristig stabil gegenüber sauren und basischen pH-Bedingungen.

In weiterführenden Untersuchungen wurden das Wirkstoffverhalten gegenüber verschiedenen pH-Bedingungen in den Miniemulsionen MO3 bis MO6 sowie Oleoresin 60 mg/ml überprüft. Mittels der Verlängerung der Inkubationszeit auf 2 h konnte ein langfristiger Effekt der verschiedenen pH-Bedingungen auf die jeweilige Wirkstoffform beschrieben werden. Alle eingesetzten Formulierungen wurden für 2 h bei 37°C und den Bedingungen pH $1,0 \pm 0,2$, pH $7,0 \pm 0,2$ bzw. pH $9,0 \pm 0,2$ im Dunkeln inkubiert. Als Kontrolle wurde stets eine unbehandelte Probe mitgeführt. Nach Extraktion und Analyse mittels RP-HPLC wurden die prozentualen Luteinäquivalentmengen im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Proben berechnet und sind graphisch in dem Diagramm b der Abbildung 13 aufgezeigt. Mit Interpretation der Ergebnisse zeigt sich zunächst eine langfristige, sehr gute Stabilität von Luteinestern in Oleoresin 60 mg/mL gegenüber sauren, neutralen und basischen pH-Bedingungen. Hier konnte bei allen Inkubationsbedingungen eine Zunahme der Luteinestermengen detektiert werden, wobei keine Signifikanzen zur Kontrolle bestanden. Ein Abbau unter basischem Milieu konnte hier nicht gezeigt werden. Langfristig scheinen sich Luteinester in der Öllösung zu stabilisieren. Die Formulierungen MO3 und MO4 (Wirkstoff Luteinester) verhielten sich unter sauren Versuchsbedingungen verschieden. Während in MO3 eine signifikante Zunahme der Luteinäquivalentmenge um 17,2% zu beobachten war, war diese Menge in MO4 annähernd konstant im Vergleich zur Kontrolle (MO4 $99,8 \pm 1,9\%$). Sehr verschieden zu den Ergebnissen der kurzfristigen Behandlung von luteinesterhaltigen Formulierungen unter basischen Bedingungen konnte in den analogen langfristigen Untersuchungen in den Formulierungen MO3 und MO4 Abnahmen der Wirkstoffmenge detektiert werden. Dabei war die Wirkstoffminderung in der Formulierung MO3 mit 5,7% weniger hoch als in MO4 mit 7,8%. Es konnte gezeigt werden, dass Luteinester in Miniemulsionen gegenüber sauren und neutralen Bedingungen langfristig stabil sind. Dagegen treten bei Inkubation unter basischen Bedingungen über einen längeren Zeitraum degradierende Prozesse auf und die Luteinestermenge nimmt ab. Eine Entstehung von Lutein konnte nicht detektiert werden. Eine Zugabe von Biozate 1 in MO4 zeigte keinen fördernden Effekt hinsichtlich der Wirkstoffstabilität. In den Miniemulsionen MO5 und MO6 mit der

Wirkstoffkombination Lutein und Luteinester konnten gegenüber sauren Bedingungen langfristig keine degradierenden Effekte auf die Wirkstoffe nachgewiesen. Während in der Formulierung MO5 eine geringfügige Zunahme der Wirkstoffmenge auf $101,6 \pm 2,5\%$ detektiert wurde, nahm die Menge an Luteinäquivalent in MO6 um minimale 1,4% ab. Ähnlich wie bei den luteinesterhaltigen Formulierungen (MO3, MO4) war eine Abnahme an LÄ unter basischen Bedingungen zu beobachten. Hier betrug die Senkung der Wirkstoffmenge für MO5 signifikante 11,0% und für MO6 7,1%. In allen Proben blieb das Lutein-Luteinesterverhältnis stets gleich. Keine der beiden Substanzen wurde im stärkeren Maße abgebaut. Inwiefern langfristig ein Umbau der Luteinester zu Lutein oder umgekehrt stattgefunden haben könnte, konnte nicht eindeutig belegt werden. Auch eine klare wirkstoffstabilisierende Funktion von Biozate 1 konnte hier nicht gezeigt werden.

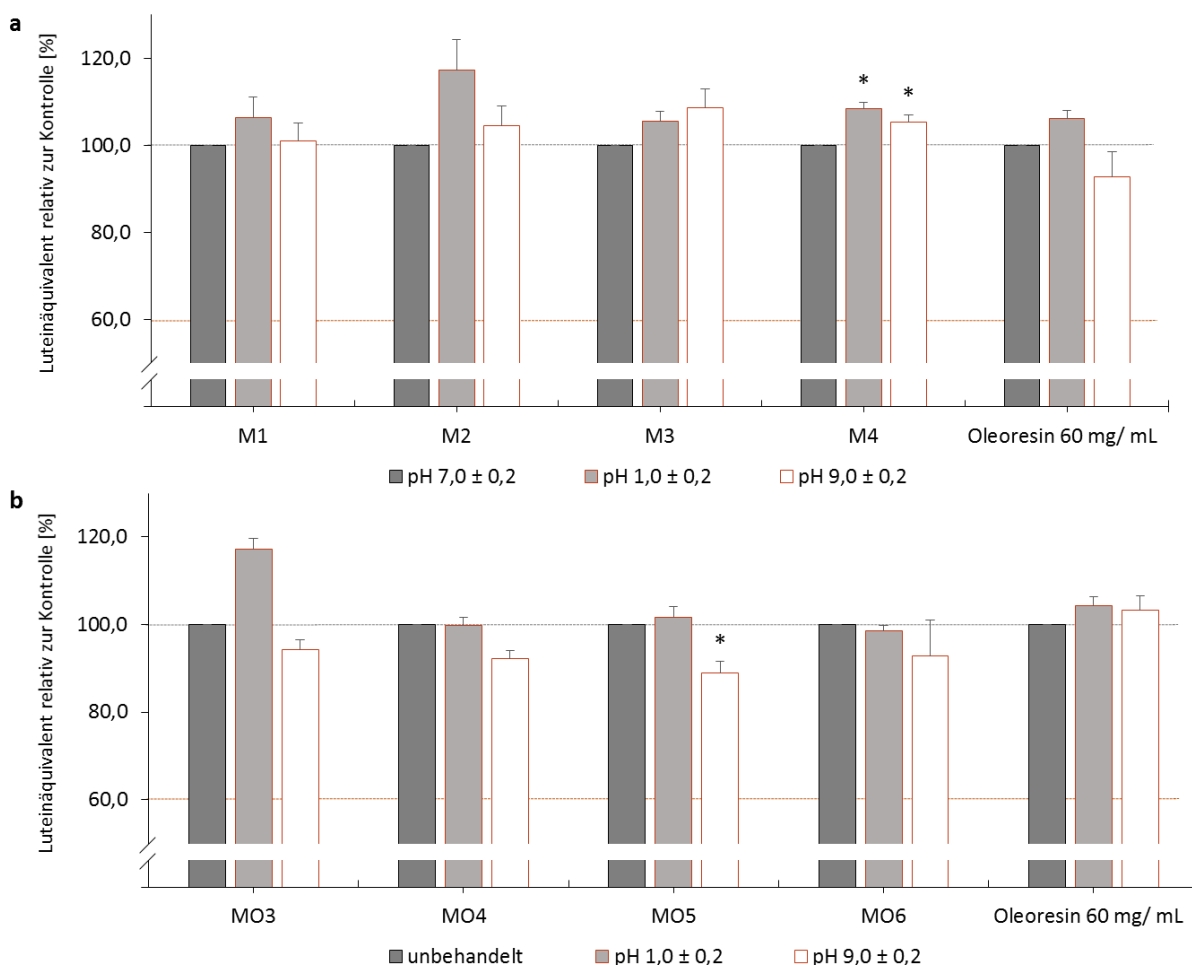


Abbildung 13 Einfluss von sauren und basischen Bedingungen auf die Stabilität von Lutein und Luteinestern in reiner Ölphase und in Miniemulsionen.

Graphisch dargestellt sind die ermittelten prozentualen Konzentrationen von Lutein bzw. Luteinestern als Luteinäquivalent [%] a) in den Miniemulsionen M1 bis M4 sowie Oleoresin in MCT-Öl nach Inkubation gegenüber saurem und basischem Milieu bei 37°C für 30 min im Dunkeln, b) in den Miniemulsionen MO3 bis MO6 sowie Oleoresin in MCT-Öl nach Inkubation gegenüber verschiedenen relevanten pH-Bedingungen bei 37°C für 2 h im Dunkeln. Nach der Behandlung wurden Aliquote der Proben extrahiert und mittels RP-HPLC analysiert. Die Bestimmung der Wirkstoffkonzentrationen erfolgte als Luteinäquivalent in mg/mL. Anschließend konnte der jeweilige prozentuale Anteil der Konzentration Luteinäquivalent im Vergleich zur Probe a) unter neutralen Bedingungen bzw. b) zur unbehandelten Probe (100%) berechnet werden. M1 Lutein/Tween 80, M2 Lutein/Tween 80/Biozate 1, M3 Luteinester/Tween 80, M4 Luteinester/Tween 80/Biozate 1, Oleoresin 60 mg/mL = 60 mg Oleoresin in 1 mL MCT-Öl, MO3 Luteinester/Tween 80, MO4 Luteinester/Tween 80/Biozate 1, MO5 Lutein/Luteinester/Tween 80, MO6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1. Statistik: t-Test; *p<0,05 signifikant zur Kontrolle.

4.4 CHARAKTERISIERUNG DER RESORPTIONSVERFÜGBARKEIT VON LUTEIN- UND LUTEINESTERHALTIGEN FORMULIERUNGEN *IN VITRO*

4.4.1 Wirkstoffverhalten von Lutein und Luteinestern in Miniemulsionen gegenüber synthetischen Verdauungssäften – Einzelkompartimente

Die lutein- (M1, M2) und luteinesterhaltigen Miniemulsionen (M3, M4) wurden separat mit dem jeweils spezifischen synthetischen Verdauungssaft der oralen Phase, der Magenpassage und des oberen Dünndarms für einen Zeitraum von 5, 30 min bzw. 2 h inkubiert. In der Abbildung 14 sind die prozentualen Luteinäquivalentmengen in den Proben nach Inkubation mit den einzelnen synthetischen Flüssigkeiten graphisch dargestellt. Der Vergleich erfolgte zur unbehandelten Probe (Kontrolle, 100%).

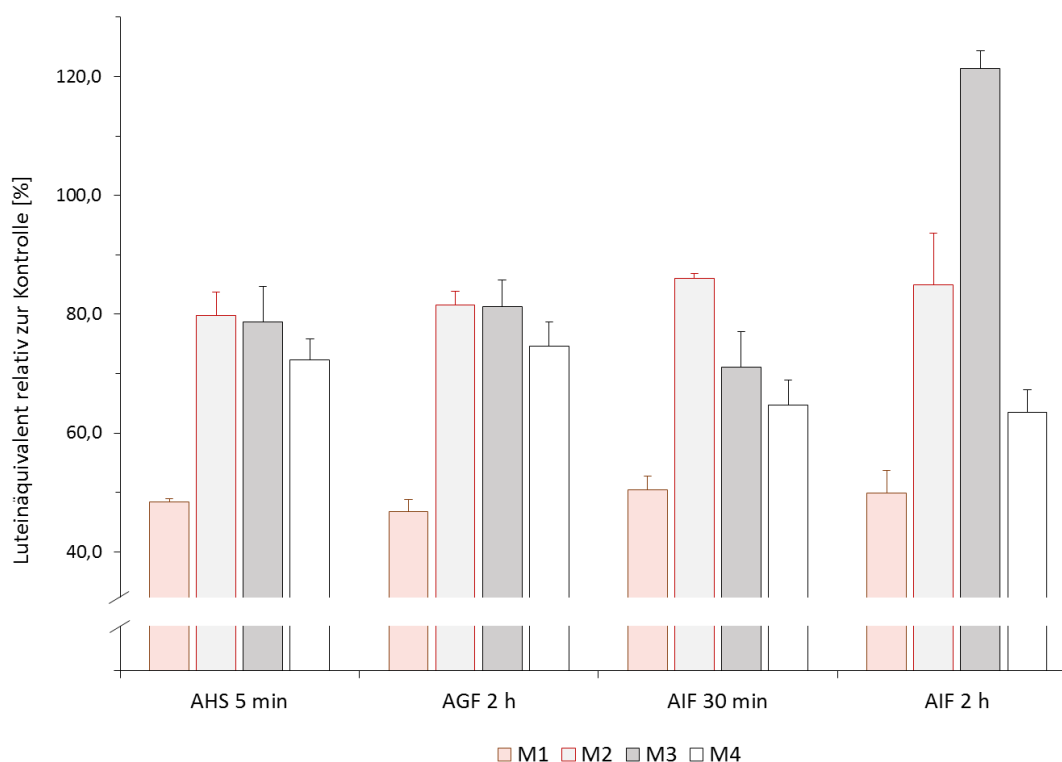


Abbildung 14 Effekte synthetischer Verdauungssäfte auf die Stabilität von Lutein und Luteinestern in Miniemulsionen.

Graphisch dargestellt ist die prozentuale Wirkstoffmenge in den jeweiligen Miniemulsionen relativ zur unbehandelten Probe (100%). Aliquote der Formulierungen wurden 1:1 (v/v) mit dem spezifischen Verdauungssaft bei 37°C im Dunkeln über einem bestimmten Behandlungszeitraum inkubiert, danach extrahiert und mittels RP-HPLC die Menge an Luteinäquivalent mg/mL detektiert. Analog wurde die Menge des Wirkstoffes in den jeweiligen unbehandelten Proben ermittelt und Veränderungen verglichen. AHS = synthetischer Speichel, AGF = synthetischer Magensaft, AIF = synthetischer Intestinalsaft. M1 Lutein/Tween 80, M2 Lutein/Tween 80/Biozate 1, M3 Luteinester/Tween 80, M4 Luteinester/Tween 80/Biozate 1. Statistik: t-Test. Die inkubierten Proben wiesen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zur Kontrolle auf. *Ausnahme*: M2 AIF 30 min.

synthetischer Speichel (AHS)

Alle Miniemulsionen wiesen eine signifikante Abnahme der Wirkstoffkonzentrationen nach fünfminütiger Behandlung mit AHS auf. Diese war mit 51,6% am höchsten in der luteinhaltigen Formulierung M1. In der analogen Miniemulsion mit einer Emulgatorkombination von Tween 80 und Biozate 1 betrug die Wirkstoffkonzentration nach Behandlung mit AHS noch $79,7 \pm 5,0\%$ (Abnahme 20,3%). In den luteinesterhaltigen Rezepturen konnten nach Inkubation eine prozentuale Konzentration an Luteinäquivalent von $78,7 \pm 7,6\%$ (M3) bzw. $72,3 \pm 4,8\%$ (M4) belegt werden. Hier war die Abnahme in der Miniemulsion mit einer Emulgatorkombination höher als in der analogen Formulierung mit ausschließlich Tween 80.

synthetischer Magensaft (AGF)

Die Behandlungsdauer wurde annähernd an physiologische Gegebenheiten angepasst und betrug 2 h. Auch hier konnte in allen Versuchsansätzen eine signifikante Reduzierung der Menge an Luteinäquivalent im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Gleichermäßen war auch hier die stärkste Abnahme an Lutein als Luteinäquivalent in der Miniemulsion M1 festzustellen. Die prozentuale Luteinäquivalentmenge in M1 betrug nach Inkubation mit AGF für 2 h nur noch $46,8 \pm 5,0\%$. Dagegen konnte in der wirkstoffanalogen Formulierung M2 nach 2 h eine Menge an LÄ von $81,6 \pm 1,0\%$ detektiert werden. In der Miniemulsion M3 war nach 2 h Inkubationszeit eine Wirkstoffmenge LÄ von $81,3 \pm 6,0\%$ zu ermitteln. Die analoge Behandlung von M4 führte zu einer höheren Senkung des Luteinäquivalents. Die Probe enthielt im Vergleich zur Kontrolle nach 2 h eine prozentuale Menge an LÄ von $74,6 \pm 4,2\%$ (2 h).

synthetischer Intestinalsaft (AIF)

Nach Behandlung der Miniemulsionen mit AIF über einen Zeitraum von 30 min bzw. 2 h konnte in allen Proben eine Abnahme der Luteinäquivalentmenge dokumentiert werden. Wie auch bei den vorhergehenden Untersuchungen zu den Inkubationen mit AHS und AGF wurde der höchste Verlust an Luteinäquivalent in der Miniemulsion M1 detektiert. Die Abnahme an Luteinäquivalent betrug nach 30 min 49,5% bzw. nach 2 h sogar 50,1%. In den behandelten Aliquoten von M2 konnten geringere Wirkstoffverluste nachgewiesen werden. Die ermittelten Luteinäquivalentmengen betragen $86,1 \pm 10,2\%$ (30 min) und $84,9 \pm 7,9\%$ (2 h). Die luteinesterhaltige Formulierung M3 wies nach 30 min Inkubation mit AIF eine Wirkstoffmenge von $71,1 \pm 4,3\%$ im Vergleich zur unbehandelten Probe auf. Dagegen war nach 2 h eine Zunahme an Luteinäquivalent von mehr als 20% zu beobachten. Eine Erklärung dafür könnte eine gesteigerte Micellarisierung und damit erhöhte Extrahierbarkeit des Wirkstoffes aus der Probe

sein. Weiterhin könnte die Kombination der Anwesenheit von Enzymen und Tween 80 förderlich auf das Emulgieren der Luteinester im synthetischen Micellarisierungsprozess gewirkt haben. Die wirkstoffgleiche Formulierung mit Emulgatorkombination bestätigte die hohe Wirkstoffzunahme nach Inkubation jedoch nicht. Die Analysen zeigten eine prozentuale Luteinäquivalentmenge nach 30 min von $64,7 \pm 5,9\%$ bzw. nach 2 h von $63,4 \pm 4,4\%$.

4.4.2 Resorptionsverfügbarkeit von Lutein und Luteinestern nach chronologischer Passage im *in vitro* Verdaumodell *basic*

Die zuvor verwendeten synthetischen Verdauungssäfte wurden in ihrer Zusammensetzung für das *in vitro* Verdaumodell *basic* übernommen. Die Behandlungszeiten für die einzelnen simulierten Magen-Darm-Passagen wurden definiert (AHS 5 min, AGF 2 h, AIF 2 h) und die Proben bei 37°C im Dunkeln mit den synthetischen Verdauungsfluiden inkubiert. Die Zugabe der jeweiligen Verdauungssekrete erfolgte, wie zuvor im Verhältnis 1:1 (v/v).

Lutein bzw. Luteinester in reiner Ölphase und in Miniemulsionen

Die reinen Ölphasen mit Lutein 5% (10 mg/mL) bzw. Oleoresin (60 mg/mL) sowie die Miniemulsionen M1, M2, M3 und M4 wurden nach dem *in vitro* Verdaumodell *basic* behandelt. Die aus den anschließend extrahierten Proben ermittelten Wirkstoffmengen an Luteinäquivalent in mg/mL wurden mit den parallel ermittelten Daten der unbehandelten Proben verglichen. In keinem der Versuchsansätze kam es zu einem Abbau bzw. Verlust von Wirkstoffen. Die Formulierungen wiesen höhere Mengen an Luteinäquivalent im Gegensatz zu den unbehandelten Proben auf (Tabelle 28). Dies kann als Indiz für eine Micellarisierung gedeutet werden. Diese würde wiederum eine verbesserte Extrahierbarkeit bzw. den gesteigerten Übergang des Wirkstoffes in die organische Phase bewirken. Ein Verlust über die wässrige Extraktionsphase wird so gemindert. Anzumerken ist jedoch, dass die Zunahme der Wirkstoffmenge nur im Falle der Präemulsion M2 signifikant zur Kontrolle, jedoch mit $24,3 \pm 4,3\%$ geringfügig höher als in der Formulierung mit Lutein in der reinen Ölphase (Lutein 10 mg/mL: $23,5 \pm 12,6\%$) war. In der Präemulsion M1 ohne Biozate 1 konnte ein Anstieg der Luteinäquivalentmenge von nur $6,8 \pm 3,3\%$ erfasst werden. In den luteinesterhaltigen Formulierungen schwankten die Wirkstoffzunahmen weniger stark. Luteinester in der reinen Ölphase (Oleoresin 60 mg/mL) unterlagen hier einem Konzentrationsanstieg von $17,8 \pm 2,0\%$. Auch in der Formulierung M3 konnte eine Zunahme der Wirkstoffmenge um $13,2 \pm 6,6\%$ beobachtet werden. Der Anstieg der Menge an LÄ in M4 mit Biozate 1 betrug dagegen nur $7,8 \pm 3,2\%$. In den Formulierungen mit

Luteinestern konnte entgegen den Erwartungen keine Zunahme bzw. die Entstehung von Lutein nachgewiesen werden. Minimale detektierte Luteinkonzentrationen lagen demnach unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ) von 0,67 µg/mL, teilweise sogar unterhalb der Nachweisgrenze (LOD 0,20 µg/mL).

Tabelle 28 Wirkstoffstabilität von Lutein und Luteinestern in reinen Ölphasen bzw. in Miniemulsionen nach simulativer Metabolisierung mittels *in vitro* Verdaumodell *basic*.

Dargestellt ist die prozentuale Wirkstoffzunahme in den behandelten Proben im Vergleich zur jeweils unbehandelten Kontrolle (100%). Aliquote der Miniemulsionen wurden 1:1 (v/v) chronologisch mit den synthetischen Verdauungssäften des Magen-Darm-Traktes bei 37°C im Dunkeln über einem bestimmten Zeitraum inkubiert, danach extrahiert und mittels RP-HPLC die Menge an Luteinäquivalent mg/mL detektiert. Analog wurde die Menge des Wirkstoffes in den entsprechenden unbehandelten Proben ermittelt und zum Vergleich genutzt. Lutein 5% 10 mg/mL = 10 mg Lutein 5% in 1 mL MCT-Öl, Oleoresin 60 mg/mL = 60 mg Oleoresin in 1 mL MCT-Öl, M1 Lutein/Tween 80, M2 Lutein/Tween 80/Biozate 1, M3 Luteinester/Tween 80, M4 Luteinester/Tween 80/Biozate 1. LÄ = Luteinäquivalent.

	Lutein 5% 10 mg/mL	Oleoresin 60 mg/mL	M1	M2	M3	M4
Zunahme LÄ [%]	23,5 ± 12,6	17,8 ± 2,0	6,8 ± 3,3	24,3 ± 4,3	13,2 ± 6,6	7,8 ± 3,2

Luteinester in den Fertigrezepturen

Das simulierte Durchlaufen der Magen-Darm-Passage unter Anwendung des etablierten *in vitro* Verdaumodells *basic* wurde ebenso für die Fertigrezepturen 122 bis 125 durchgeführt. Der Wirkstoff lag hier in Form von Luteinestern vor. Unterschiede ergaben sich in der Zusammensetzung hinsichtlich des verwendeten Öles und der Emulgatorzugabe (Tabelle A 9). Nach *in vitro* Verdau *basic* wurde eine signifikante Abnahme der Luteinäquivalentmengen um mehr als 30% in allen Ansätzen detektiert (Abbildung 15). Die dabei auftretende Abnahme der Luteinesterkonzentration in den Proben führte jeweils zu einem geringfügigen Anstieg der Menge an freiem Lutein (<65 µg/mL). Eine eingeschränkte hydrolytische Aktivität anwesender Enzyme konnte nachgewiesen werden. In den Fertigrezepturen 122 und 124, welche in der Ölphase MCT-Öl enthielten, war im Anschluß an die *in vitro* Metabolisierung eine prozentuale Luteinäquivalentmenge von 70,2 ± 1,8% (122) bzw. 65,3 ± 3,4% (124) im Vergleich zur Kontrolle ermittelt worden. Dabei betrug die Zunahme der Menge an freiem Lutein 53,9 ± 6,5 µg/mL (122) bzw. 61,0 ± 4,2 µg/mL. In den Formulierungen 123 und 125, welche eine Ölphase mit Rapsöl aufwiesen, konnten analog Luteinäquivalentmengen von 75,9 ± 0,6% (123) und 71,8 ± 2,5% (125) detektiert werden. Hier betrug die Zunahme des

Luteins $57,7 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$ (123) und $63,1 \pm 5,5 \mu\text{g/mL}$ (125). In beiden Fällen zeigten die Formulierungen mit Emulgatorkombination eine höhere Abnahme der Luteinäquivalentmenge und dabei eine höhere Zunahme der Luteinmenge als die Rezepturen mit dem Emulgator Tween 80 allein. Die hohe Abnahme der Konzentration an Luteinester bzw. LÄ mit fehlender analoger Zunahme des freien Luteins könnte zweierlei begründet sein. Zum einem führte die Umsetzung von Luteinestern zur Entstehung von freiem Lutein, welches durch seine Instabilität gegenüber oxidativen Abbau gemindert und so ein Nachweis der unmittelbar generierten Luteinmenge verhindert wurde. Denkbar wäre auch, dass ein Abbau von Luteinestern im Zusammenhang mit der weiteren Zugabe von Inhaltsstoffen in den Fertigrezepturen begründet war. Veränderungen im pH-Milieu oder auch Wechselwirkungen zwischen den Bestandteilen könnten Enzymaktivitäten und die Micellarisierung negativ beeinflusst haben.

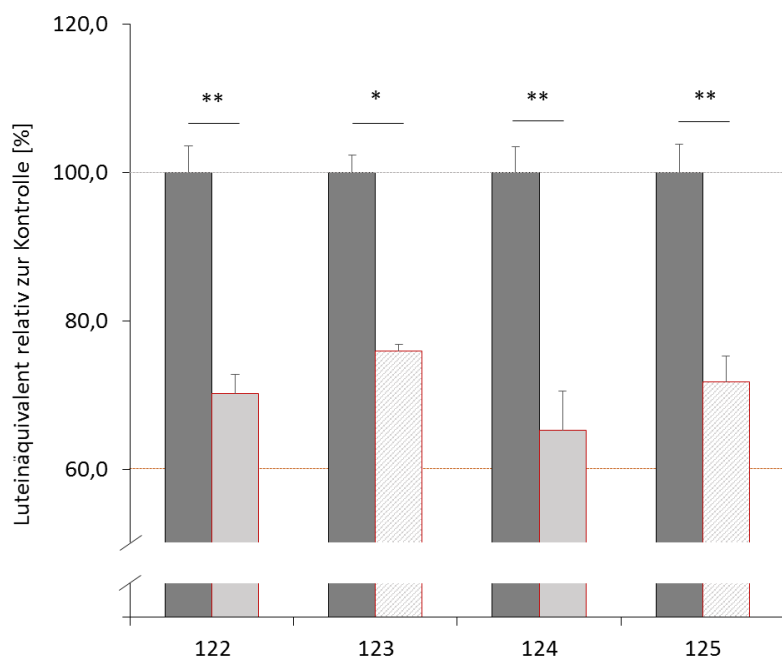


Abbildung 15 Wirkstoffstabilität von Luteinestern in den Fertigrezepturen nach simulativer Metabolisierung mittels *in vitro* Verdaumodell basic.

Graphisch dargestellt ist die ermittelte prozentuale Menge an Luteinäquivalent in den Fertigrezepturen 122 bis 125 (hellgraue bzw. hellgrau-schraffierte Balken) nach *in vitro* Verdauung *basic* im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (dunkelgraue Balken). Aliquote der Miniemulsionen wurden 1:1 (v/v) chronologisch mit den synthetischen Verdauungssäften des Magen-Darm-Traktes bei 37°C im Dunkeln über einem bestimmten Zeitraum inkubiert, danach extrahiert und mittels RP-HPLC die Menge an Luteinäquivalent mg/mL detektiert. Analog wurde die Menge des Wirkstoffes in den entsprechenden unbehandelten Proben (Kontrolle) ermittelt und zum Vergleich genutzt. 122 = Luteinester/Tween 80/MCT-Öl, 123 = Luteinester/Tween 80/Rapsöl, 124 = Luteinester/Tween 80/Biozate 1/MCT-Öl, 125 = Luteinester/Tween 80/Biozate 1/Rapsöl. Statistik: t-Test mit * $p < 0,05$ signifikant, ** $p < 0,01$ hoch signifikant zur Kontrolle.

4.4.3 Wirkstoffverhalten von Lutein und Luteinester in kolloidalen Formulierungen gegenüber verschiedenen industriellen Enzymen

Einhergehend mit der Entwicklung eines wirkstoffhaltigen NEMs mit hoher Bioverfügbarkeit besteht der Anspruch an die Rezeptur eine effiziente Aufnahme durch geeignete Partikelgrößen zu gewährleisten und durch chemische Modifikationen den Ab- oder Umbau des Wirkstoffes vor Erreichen des Dünndarms zu verhindern. Ein weiterer Ansatz stellt die Frage, inwiefern die Applikation des Wirkstoffes so gestaltet werden könnte, dass die Resorptionsverfügbarkeit verbessert wird. Überlegungen betrafen dabei die Ausführung des NEMs in einem Zwei-Phasen-System. Dabei würde eine Phase die Miniemulsion mit dem Wirkstoff Luteinester beinhalten. In die zweite Phase könnte wiederum ein geeignetes Enzym in lyophilisierter Form eingebracht werden, welches erst vor Gebrauch aktiviert wird und die Hydrolyse von Luteinestern in freies Lutein katalysiert. Publikationsbasierend wurden relevante Enzyme (spezifische Lipasen und Esterasen) ausgewählt und hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Luteinester aus verschiedenen Formulierungen in die freie Form Lutein umzuwandeln *in vitro* geprüft.

Cholesterolesterase

Verschiedene Studien zeigten, dass Cholesterolesterasen (ChE) die hydrolytische Spaltung von Xanthophylestern bewirken können [67, 157]. Breithaupt et al. (2002) konnten u.a. zeigen, dass die ChE in der Lage ist Carotinoide in deren freie Formen zu überführen [67]. In darauf aufbauenden Versuchen von Granado-Lorencio et al. (2007) wurden Modelle angenommen, bei denen höhere Enzymkonzentrationen im nicht physiologischen Bereich zum Einsatz kamen [157]. Nach Behandlung von Xanthophylestern konnte ein Anstieg von Xanthophyllen in freier Form nachgewiesen werden [157]. Auf der Basis dieser Publikationen sollte nun geklärt werden, inwiefern die ChE ein potentielles Enzym für die Hydrolyse von Luteinestern sein kann und damit eine verbesserte Resorptionsverfügbarkeit dieser Xanthophylester hervorgerufen werden kann. Die Untersuchungen erfolgten an luteinesterhaltigen Miniemulsionen. Zunächst wurde der direkte Effekt der ChE auf die Luteinester untersucht. Hierzu wurde der synthetische Intestinalsaft AIF hinsichtlich der Enzymausstattung modifiziert (mAIF). Das Enzymgemisch Pankreatin wurde durch die identische Menge an ChE ersetzt. Weiterführend wurde dann die Menge an ChE sowie an Gallensäureextrakt verdoppelt und erneut eine mögliche Freisetzung von Lutein aus Luteinestern geprüft. Die Zugabe von Gallensalzen ist essentiell für die Resorptionsverfügbarkeit von lipophilen Substanzen. Gallensalze begünstigen deren Einlagerung in Micellen und somit die Aufnahme in den Enterocyten über die sogenannte „*unstirred water layer*“ der Bürstensaummembran [170]. Garret et al. (1999) zeigten, dass die Aufnahme von

Carotinoiden in Micellen bei Abwesenheit von Gallensalzen unterbunden wird [155]. Eine Erhöhung der Gallensalzkonzentration zeigte keinen negativen Effekt hinsichtlich der Resorptionsverfügbarkeit von Carotinoiden [155].

Die ermittelten Daten zur Luteinäquivalentmenge in den Miniemulsionen MO5 und MO6 nach Behandlung mit ChE sind in der Tabelle 29 aufgezeigt. Es wurde kein signifikanter Abbau des Wirkstoffes Luteinester detektiert. Bei Behandlung der Formulierungen mit 2 mg/mL ChE für 2 h lagen keine Veränderungen der Mengen an Luteinäquivalent im Vergleich zur unbehandelten Probe vor. Auch nach 24 h wurde nur eine geringe Abnahme des Wirkstoffes nachgewiesen. So betrug nach Inkubation die Menge an Luteinäquivalent in MO5 (ohne Biozate 1) noch $99,0 \pm 2,5\%$ und in MO6 (mit Biozate 1) $97,9 \pm 3,7\%$. Nach Verdopplung der Enzymkonzentration konnte eine identische Abnahmerate, wie bei Behandlung mit 2 mg/mL ChE für 24 h gezeigt werden. Diese Veränderung der Wirkstoffmenge wurde mit einer Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 h weiter gesteigert. Dabei betrug die Abnahme der Luteinäquivalentmenge in der Formulierung MO5 3,6% bzw. in MO6 5,7%. In keinem Ansatz wurde eine Entstehung von freiem Lutein detektiert. Vielmehr lag die nachgewiesene Menge des freien Xanthophylls vor und nach Behandlung stets in einem Bereich unterhalb der Bestimmungsgrenze LOQ. Auffallend war, dass in allen Untersuchungsansätzen die Proben der Formulierung MO6 (mit Biozate 1) immer eine leicht höhere Abnahme der Wirkstoffmenge aufwiesen als die Proben der Präemulsion MO5 (ohne Biozate 1).

Tabelle 29 Hydrolyse von Luteinestern in Miniemulsionen bei Behandlung mit modifiziertem, synthetischem Intestinalsaft (Enzym: Cholesterolesterase).

Dargestellt sind die ermittelten prozentualen Mengen an Luteinäquivalent in den Proben nach *in vitro* Behandlung im Vergleich zur Kontrolle (100%). Aliquote der Miniemulsionen wurden 1:1 (v/v) mit dem jeweiligen modifizierten, synthetischen Intestinalsaft bei 37°C im Dunkeln über einem Zeitraum von 2 h bzw. 24 h inkubiert, danach extrahiert und mittels RP-HPLC die Menge an Luteinäquivalent in mg/mL detektiert. Analog wurde die Menge des Wirkstoffes in den entsprechenden unbehandelten Proben (Kontrolle) ermittelt und zum Vergleich genutzt. MO5 Lutein/Luteinester/Tween 80, MO6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1. mAIF = modifizierter, synthetischer Intestinalsaft (d = doppelte Konzentration des Enzyms).

	Luteinäquivalent [%] relativ zur Kontrolle			
	mAIF mit			
	2 mg/mL Cholesterolesterase		4 mg/mL Cholesterolesterase	
	2 h	24 h	2 h	24 h
MO5	$101,8 \pm 4,4$	$99,0 \pm 2,5$	$99,2 \pm 5,3$	$96,4 \pm 11,0$
MO6	$100,9 \pm 6,2$	$97,9 \pm 3,1$	$97,6 \pm 3,7$	$94,3 \pm 3,9$

Industrielle Lipasen von Pilzen

Es ist bekannt, dass verschiedene synthetisch gewonnene Lipasen von Schimmelpilzen und Hefen, die Hydrolyse von Fetten bzw. Estern katalysieren [171, 172]. Zu ihnen gehören u.a. die rekombinante Lipase B *Candida Antarctica* (CAL-B) und die Lipase FE01 vom *Aspergillus oryzae* (FE01) sowie die Lipase L8906 vom *Mucor javanicus* (L8906) und die Lipase L9031 vom *Mucor miehei* (L9031) (Tabelle 13). Die Fähigkeit dieser Enzyme, Luteinester aus Präemulsionen als Substrat zu nutzen und zum freien Lutein umzusetzen, wurde untersucht. Weiterhin sollte geprüft werden, welchen Einfluss die spezifischen Enzyme auf vorliegendes freies Lutein haben. Dazu wurden die Miniemulsionen MO5 und MO6 mit der Wirkstoffkombination Lutein und Luteinester für 24 h mit synthetischem Intestinalsaft in Modifikation mit CAL-B (2 mg/mL) statt Pankreatin bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach einer Behandlung für 24 h konnte in den entsprechenden Aliquoten kein signifikanter Abbau, Umbau bzw. Abnahme der Menge an Luteinester im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Probe nachgewiesen werden. In der Miniemulsion MO5 betrug die Menge an Luteinäquivalent nach Behandlung $4,05 \pm 0,05$ mg/mL. Prozentual betrachtet war diese Menge mit $100,52 \pm 4,97\%$ nahezu identisch mit der Luteinäquivalentmenge der analogen unbehandelten Proben. Die in der Miniemulsion MO6 detektierte Menge an Luteinäquivalent nach Behandlung betrug $3,70 \pm 0,09$ mg/mL. Hier war dabei eine geringfügige Abnahme der Luteinäquivalentmenge von 2,5% zu beobachten. Bei qualitativer Betrachtung des Luteinäquivalents wiesen die unbehandelten und inkubierten Proben identische Mengen an Lutein auf. Die detektierte Abnahme in den inkubierten Formulierungen MO6 betrafen ausschließlich die Luteinester. Eine Zunahme der Luteinmenge wurde in keiner Probe ermittelt. In einem erweiterten Versuchsansatz wurde das Enzymgemisch Pankreatin im AIF durch verschiedene Lipasen im identischen Mengenverhältnis (2 mg/mL) ersetzt. Untersucht wurden hier die hydrolytischen Effekte modifizierter Intestinalsäfte mit jeweils einer von drei Lipasen (FE01, L8906, L9031) auf die Wirkstoffe in den Präemulsionen M5 und M6. Aliquote der Formulierungen wurden mit dem jeweiligen modifizierten AIF in einem Komplettdau nach *in vitro* Verdaumodell *basic* inkubiert. Abweichend wurden die Behandlungszeiten für die einzelnen simulierten Magen-Darm-Passagen verändert (AHS 30 min, AGF 1 h, AIF 2 h). Die Erhöhung der Inkubationszeit des synthetischen Speichels sollte eine längere orale Verweildauer simulieren. Weiterhin wurde durch Verkürzen der Inkubationszeit mit synthetischem Magensaft (AGF) der Fokus auf die intestinale Phase gelegt. Die Veränderungen der Wirkstoffmengen nach Behandlung der Formulierungen sind der

Tabelle 30 zu entnehmen. Grundsätzlich verursachten alle in diesem Zusammenhang durchgeführten *in vitro*-Verdauabläufe in den Präemulsionen eine Abnahme der Menge an Luteinäquivalent. Ausnahme bildete die Behandlung der Miniemulsion M6 mit dem Intestinalsaft, welcher die Lipase L9031 enthielt. Hier kam es zu einer Zunahme der Menge an Luteinäquivalent von 27,5%. Diese Zunahme war jedoch nicht signifikant. Bei qualitativer Betrachtung der Wirkstoffe in dieser Probe war keine Verschiebung der Menge an Luteinäquivalent zu Gunsten des freien Luteins festzustellen. Das bedeutet, die Zunahme war nicht auf die Hydrolyse von Luteinestern zu freiem Lutein zurückzuführen. Kritisch zu betrachten ist die hohe Standardabweichung im Rahmen der Berechnung der Menge an Luteinäquivalent dieser Analyse, welche einen Hinweis für eine fehlerhafte Probenaufbereitung gibt. Auch in allen anderen behandelten Proben war keine Verschiebung des Verhältnisses Lutein/Luteinester festzustellen. Lutein und Luteinester waren hier im gleichen Maße vom Abbau betroffen. Dies zeigt wiederum, dass die Umsetzung von Luteinestern zu freiem Lutein nicht stattgefunden hat. Eine höhere Abbaurate bei Anwesenheit von Biozate 1 in der Präemulsion wurde in dieser Versuchsreihe nicht festgestellt. Hier waren im Allgemeinen die Formulierungen ohne Biozate 1 von einer höheren Wirkstoffminderung betroffen. Fraglich bleibt, warum ein Abbau des Luteinäquivalents in dem Maße stattgefunden hatte. Die gewählte Versuchsanordnung schien demnach ungeeignet für die Untersuchung der Enzymaktivitäten hinsichtlich der Umsetzung von Luteinestern zu Lutein.

Tabelle 30 Einfluss verschiedener industrieller Lipasen von Pilzen auf Lutein und Luteinester in Miniemulsionen.

Dargestellt sind die ermittelten prozentualen Mengen an Luteinäquivalent in den behandelten Proben im Vergleich zur jeweils unbehandelten Kontrolle (100%). Aliquote der Miniemulsionen wurden 1:1 (v/v) chronologisch mit den synthetischen Verdauungssäften des Magen-Darm-Traktes bei 37°C im Dunkeln über einem bestimmten Zeitraum inkubiert. Dabei wurde der synthetische Intestinalsaft jeweils hinsichtlich der Enzymausstattung durch die Verwendung von spezifischen Lipasen (2 mg/mL) modifiziert. Nach der Inkubation wurden die Proben extrahiert und mittels RP-HPLC die Menge an Luteinäquivalent mg/mL detektiert. Analog wurde die Menge des Wirkstoffes in den entsprechenden unbehandelten Proben ermittelt und zum Vergleich genutzt. M5 Lutein/Luteinester/Tween 80, M6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1. FE01 = Lipase FE01 vom *Aspergillus oryzae*, L9031 = Lipase L9031 vom *Mucor miehei*, L8906 = Lipase L8906 vom *Mucor javanicus*.

	Luteinäquivalent [%] relativ zur Kontrolle		
	Lipase FE01	Lipase L9031	Lipase L8906
M5	66,00 ± 1,29	74,38 ± 8,00	71,97 ± 1,91
M6	85,61 ± 1,60	127,52 ± 18,49	79,86 ± 5,09

4.4.4 Simulierte Esterhydrolyse durch Verseifung mit ethanolischer Kaliumhydroxidlösung (Positivkontrolle)

Die Miniemulsionen MO5 und MO6 sowie Oleoresin 60 mg/mL in MCT-Öl wurden mittels chemischer Verseifung (Saponifizierung) behandelt, um eine Esterhydrolyse von Luteinestern zu freiem Lutein kontrolliert zu initiieren. Nach Behandlung und Extraktion wurden die Mengen an Lutein und Luteinestern quantitativ (Luteinäquivalent mg/mL) sowie qualitativ analysiert. Bereits die qualitative Auswertung der nach RP-HPLC-Analyse erhaltenen Chromatogramme zeigte den fast vollständigen Umbau von Luteinestern zu freiem Lutein. Die Peakflächen der Luteinester waren nur noch minimal vorhanden. Die quantitative Auswertung bestätigte eine fast vollständige Umsetzung der Ester zu reinem Lutein. Nach Verseifung konnten die in Tabelle 31 dargestellten Mengen an Luteinäquivalent in den jeweiligen Proben detektiert werden. Die Ergebnisse bestätigen eine nahezu vollständige Hydrolyse der Luteinester in den Formulierungen zu Lutein. Die ermittelten Konzentrationen von Luteinestern lagen unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ). Dagegen nahm in allen Proben die Menge an freiem Lutein zu. Die höheren Luteinäquivalentmengen von Lutein im Vergleich zu Luteinestern sind unter dem Aspekt zu betrachten, dass die Verlängerung der Inkubationszeit und die Anwendung der spezifischen Lösemittelkombination die Extrahierbarkeit des Wirkstoffes Lutein erhöht. Ein standardisierter Umrechnungsfaktor für die Freisetzung von freiem Lutein aus Luteinestern ist bis heute nicht wissenschaftlich belegt. Durch den Versuch konnte jedoch bestätigt werden, dass grundsätzlich die Hydrolyse von Luteinestern aus Miniemulsionen und reinen Ölphasen mit Entstehung von freiem Lutein möglich ist.

Tabelle 31 Simulierte Hydrolyse von Luteinestern in Miniemulsionen und reiner Ölphase durch Verseifung mit ethanolischer Kaliumhydroxidlösung (Positivkontrolle).

Dargestellt sind die ermittelten Mengen an Luteinäquivalent in den jeweiligen saponifizierten und unbehandelten Proben. Aliquote der Miniemulsionen bzw. Oleoresin 60 mg/mL wurden 1:1 (v/v) mit ethanolischer Kaliumhydroxidlösung und Zugabe von Diethylether für 24 h unter Schutzgas bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Überstände wurden gewaschen, unter Stickstoffstrom abgedampft und eine Rückwaage vorgenommen. Es erfolgte die Extraktion der Proben mit sich anschließender RP-HPLC-Analyse der Wirkstoffe. MO5 Lutein/Luteinester/Tween 80, MO6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1, Oleoresin 60 mg/mL = 60 mg Oleoresin in 1 mL MCT-Öl, c (LÄ) = Konzentration Luteinäquivalent, n.d. = nicht detektierbar.

		c (LÄ) [mg/mL]	
		Saponifizierung	unbehandelt
MO5	Lutein	9,91	0,30
	Luteinester	0,36	3,74
MO6	Lutein	15,45	0,29
	Luteinester	0,61	3,52
Oleoresin 60 mg/mL	Lutein	22,10	n.d.
	Luteinester	0,67	30,70

4.5 CHARAKTERISIERUNG ZYTOTOXISCHER EFFEKTE UND DER WIRKSTOFFABSORPTION DURCH CACO-2 ZELLEN AUS LUTEIN- UND LUTEINESTERHALTIGEN FORMULIERUNGEN *IN VITRO*

4.5.1 Zytotoxische Einordnung der Wirkstoffe und Substanzen in den kolloidalen Formulierungen

4.5.1.1 *Lutein und Luteinester*

Zur Beurteilung einer möglichen toxischen Bedenklichkeit der reinen Wirkstoffe wurden zunächst Inkubationsmedien mit reinem Lutein bzw. Luteinestern hinsichtlich eines hemmenden Einflusses auf das Zellwachstum bzw. die Viabilität von Caco-2 Zellen untersucht. Die Behandlung der Zellen erfolgte für 24 h. Eine Einordnung der kurzfristigen, akuten toxischen Wirkung sollte so aufgezeigt bzw. widerlegt werden. Nach Behandlung der Zellen mit den jeweiligen Inkubationsmedien konnte unter Verwendung des Resazurinassays die metabolische Zellaktivität bzw. mittels Neutralrotassay (NR) die lysosomale Membranintegrität ermittelt werden. Es wurde dazu der Einfluss des reinen Wirkstoffes Lutein im Medium auf die Viabilität der Caco-2 Zellen geprüft. Weiterführend erfolgten Untersuchungen mit dem Wirkstoff in Form von Luteinestern aus Oleoresin, welches dazu in MCT-Öl (Oleoresin 60 mg/mL) gelöst wurde. Ergänzend wurde eine mögliche zytotoxische Wirkung von Luteinestern aus dem pulverförmigen Präparat Biolut kontrolliert. Biolut wurde dazu in Ethanol in Lösung gebracht. Die Konzentrationen der jeweiligen Inkubationsmedien wurden in Anlehnung an die Anwendung in den späteren kolloidalen Formulierungen und Verdünnungen mit Durchlaufen der Magen-Darm-Passage gewählt. In der Abbildung 16 sind die mittels Resazurinassay bzw. NR erfassten Viabilitäten von Caco-2 Zellen nach der 24-stündigen Behandlung mit den Wirkstoffen graphisch dargestellt.

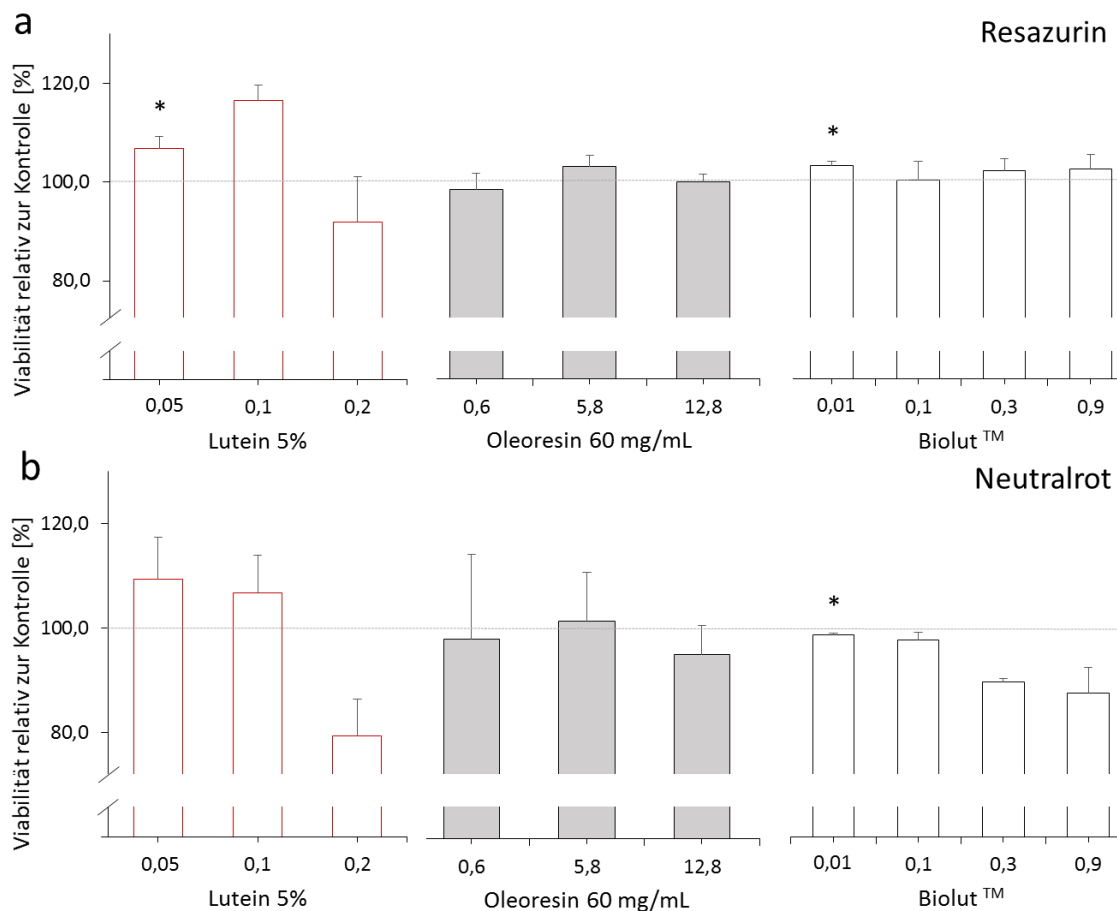


Abbildung 16 Viabilität von Caco-2 Zellen nach Behandlung mit den Wirkstoffen Lutein und Luteinestern in vitro.

Dargestellt ist die prozentuale Viabilität von Caco-2 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit den jeweiligen Wirkstoffen als Konzentration des Luteinäquivalents in μM relativ zur unbehandelten Zellpopulation (Kontrolle). Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte mittels a) dem Resazurinassay und b) dem Neutralrotassay. Statistik: t-Test, * signifikant $p < 0,05$ zur unbehandelten Zellpopulation.

Im Vergleich mit der Zellviabilität der unbehandelten Zellpopulationen (Kontrolle) konnte zunächst festgestellt werden, dass im Resazurinassay ausschließlich die Zellen einen markanten Viabilitätsverlust aufwiesen, welche mit Lutein 5% bei der höchsten eingesetzten Konzentration behandelt wurden. Dagegen konnte eine Veränderung der Membranintegrität von Caco-2 Zellen bei Behandlung mit allen drei Wirkstoffen im Neutralrotassay gezeigt werden. Hier korrelierte die Senkung der Zellviabilität mit dem Anstieg der Menge an Luteinäquivalent des Wirkstoffes im Medium bei den Präparaten Lutein 5% und Biolut. Die präzise Auswertung der Daten aus beiden Viabilitätassays sollte diese Aspekte genauer beleuchten.

Nach Behandlung der Caco-2 Zellen mit Lutein 5% in einer LÄ-Konzentration von $0,05 \mu\text{M}$ konnte zunächst eine signifikante Zunahme der Zellviabilität auf $106,7 \pm 2,5\%$ relativ zur Kon-

trolle im Resazurinassay beobachtet werden. Eine Verdopplung der Luteinäquivalentkonzentration im Medium führte in diesem Assay ebenso zu einer Zunahme der Viabilität, welche jedoch nicht signifikant war ($0,1 \mu\text{M}$ $116,5 \pm 3,1\%$). Wie in Abbildung 16 a deutlich erkennbar, wurde bei Inkubation der Zellen mit $0,2 \mu\text{M}$ Luteinäquivalent aus Lutein 5% eine Abnahme der Lebensfähigkeit von Caco-2 Zellen auf $91,9 \pm 9,2\%$ im Resazurinassay detektiert. Die Veränderung relativ zur unbehandelten Probe war nicht signifikant. Bei der Bestimmung der Viabilität mittels NR zeigten die mit $0,05$ und $0,1 \mu\text{M}$ LÄ behandelten Zellen wiederum eine leichte Zunahme der Lebensfähigkeit. Während für die Zellpopulationen, welche mit $0,2 \mu\text{M}$ LÄ inkubiert wurden, eine Abnahme der Viabilität von mehr als 20% ermittelt werden konnte. Hier betrug die detektierte Viabilität der Zellen nur noch $79,3 \pm 7,0\%$. In keinem Fall waren diese Einflüsse signifikant.

Die beiden luteinesterhaltige Präparate (Oleoresin, Biolut) hatten keinen hemmenden Einfluss auf die Stoffwechselaktivität von Caco-2 Zellen (Resazurinassay). Die Ergebnisse der Zellviabilitäten relativ zur Kontrolle lagen um den Wert von 100%. Die detektierten Zellviabilitäten für die Behandlung mit Oleoresin in verschiedenen Konzentrationen von LÄ betragen $98,1 \pm 3,3\%$ ($0,6 \mu\text{M}$), $102,7 \pm 2,5\%$ ($5,8 \mu\text{M}$) sowie $99,7 \pm 1,4\%$ ($12,8 \mu\text{M}$) und waren statistisch nicht signifikant. Nahezu identische Ergebnisse der Viabilität konnten für die LÄ-Konzentrationen $0,6 \mu\text{M}$ und $5,8 \mu\text{M}$ im NR ermittelt werden ($0,6 \mu\text{M}$ $98,6 \pm 16,3\%$, $5,8 \mu\text{M}$ $102,1 \pm 9,4\%$). Auffallend waren dabei höhere Standardabweichungen als beispielsweise im analogen Resazurinassay. Eine Signifikanz der Werte im Vergleich zur Kontrolle lag nicht vor. Eine weitere Erhöhung der LÄ-Konzentration auf $12,8 \mu\text{M}$ korrelierte mit einer geringfügigen Abnahme der Zellviabilität um $4,4\%$ (Viabilität relativ zur Kontrolle $95,6 \pm 5,7\%$). Analog den Ergebnissen von Luteinestern aus Oleoresin zeigten die Inkubationsmedien mit Biolut in den verwendeten Konzentrationen keinen Effekt auf die Stoffwechselaktivität von Caco-2 Zellen im Resazurinassay. Die Zellviabilitäten relativ zur Kontrolle betragen auch hier annähernd 100% bei allen eingesetzten LÄ-Konzentrationen. Signifikant war dabei das Ergebnis bei Behandlung mit einer LÄ-Konzentration von $0,01 \mu\text{M}$ ($102,6 \pm 0,9\%$). Im NR dagegen konnten Zusammenhänge zwischen Erhöhung der LÄ-Konzentration und Anstieg eines hemmenden Einfluss auf Caco-2 Zellen aufgezeigt werden. So betrug die Zellviabilität relativ zur Kontrolle bei einer Konzentration von $0,01 \mu\text{M}$ signifikante $98,7 \pm 0,3\%$. Die Behandlung der Zellen mit $0,28 \mu\text{M}$ LÄ im Medium führte zur Senkung der Viabilität um $10,2\%$ ($89,8 \pm 0,5\%$), und mit $0,9 \mu\text{M}$ LÄ um $12,5\%$ ($87,5 \pm 5,0\%$). Da die hemmenden Effekte der Wirkstoffe

hauptsächlich im NR sichtbar wurden, ist zu vermuten, dass Lutein aber auch Luteinester möglicherweise einen Einfluss auf die lysosomale Membranintegrität der Zellen haben. Eine akute Toxizität der Wirkstoffe konnte bei den verwendeten Konzentrationen nicht festgestellt werden.

4.5.1.2 Relevante Zusatzstoffe in den Miniemulsionen und Fertigrezepturen

Mögliche wachstumsbeeinflussende Effekte der verwendeten Emulgatoren bzw. des Öles in den Miniemulsionen und auch Fertigrezepturen auf die Caco-2 Zellen wurden exemplarisch überprüft. Relevante Substanzen waren Tween 80, Biozate 1 und MCT-Öl. Diese wurden zunächst in DMSO gelöst und danach unter sterilen Bedingungen im Medium (complete) in dem Maße verdünnt, dass keine zytotoxischen Effekte von DMSO hervorgerufen wurden (DMSO <0,1%). In Abbildung 17 sind die jeweiligen Dosis-Toxizitätskurven nach Behandlung von Caco-2 Zellen mit den jeweiligen Substanzen aufgeführt. Dabei wurden die Stoffe in folgenden Konzentrationen bzw. Volumina eingesetzt.

➤	Tween 80	[μM]	1,0	10,0	50,0	100,0	250,0
➤	Biozate 1	[$\mu\text{g}/\text{mL}$]	1,0	10,0	50,0	75,0	100,0
➤	MCT-Öl	[$\mu\text{L}/\text{mL}$]	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5

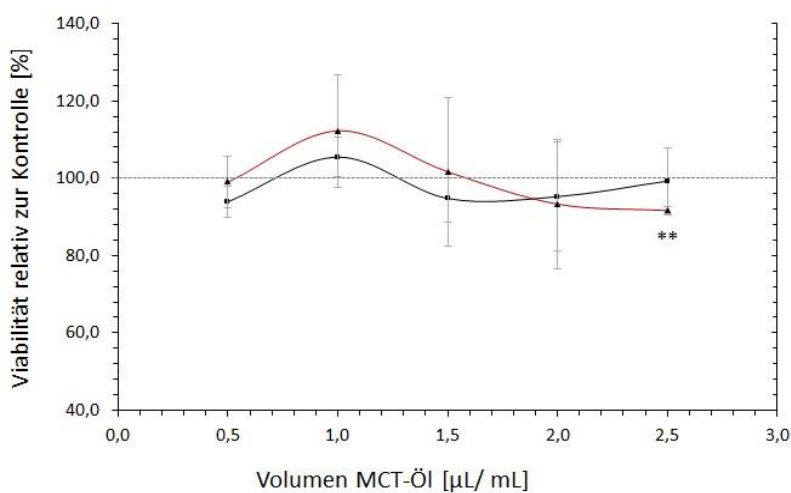
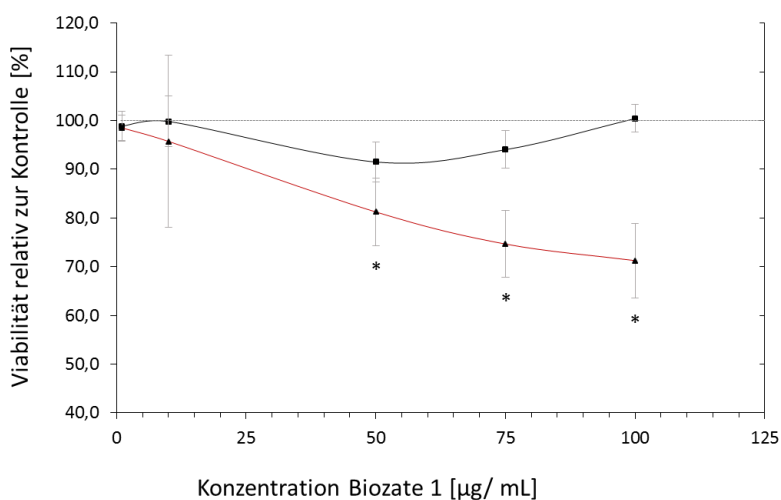
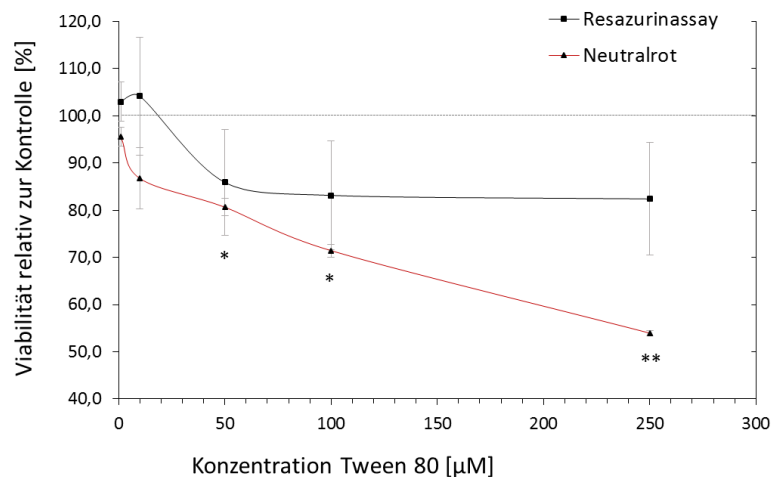


Abbildung 17 Viabilität von Caco-2 Zellen nach Behandlung mit Tween 80, Biozate 1 und MCT-Öl in vitro. Dargestellt sind die Dosis-Toxizitätskurven von Caco-2 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Tween 80, Biozate 1 bzw. MCT-Öl im Resazurinassay (Linie schwarz) und Neutralrotassay (Linie rot). Statistik: t-Test, *signifikant $p < 0,05$, **hoch signifikant $p < 0,01$ zur unbehandelten Zellpopulation.

Tween 80 zeigte ab einer Konzentration von 50 μM einen hemmenden Einfluss auf das Zellwachstum im Rahmen des Resazurinassays. Hier betrug die Viabilität von Caco-2 Zellen nur noch $85,9 \pm 11,2\%$ im Vergleich zur unbehandelten Zellpopulation. Eine weitere Erhöhung der Konzentration von Tween 80 auf 100 bzw. 250 μM führte zu weiteren, minimalen Einschränkungen der Stoffwechselaktivität der Zellen. Die prozentuale Viabilität relativ zur Kontrolle betrug hier $83,1 \pm 11,5\%$ bzw. $82,4 \pm 11,9\%$. Im Neutralrotassay konnte bereits bei der geringsten eingesetzten Tween 80-Konzentration von 1 μM eine Wachstumshemmung der Zellen um 4,4% festgestellt werden. Das Verzehnfachen der Konzentration führte zu einer Senkung der Zellviabilität um 13,3% auf $86,7 \pm 6,5\%$. In diesem Assay wurde somit sehr viel früher eine Hemmung, um mehr als 10% erreicht, als wie im Resazurinassay. Eine Erhöhung der Tween 80-Konzentration korrelierte mit einer weiteren signifikanten Senkung der Zellviabilität. So betrug die Lebensfähigkeit der Caco-2 Zellen nach Behandlung mit Tween 80 in einer Konzentration von 50 μM $80,6 \pm 1,9\%$ und bei 100 μM $71,4 \pm 1,3\%$. Einen hochsignifikanten Einfluss auf die lysosomale Membranintegrität von Caco-2 Zellen hatte Tween 80 in einer Konzentration von 250 μM (Viabilität relativ zur Kontrolle $54,0 \pm 0,6\%$). Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde hier um 46,0% gesenkt.

Da für das Molkenproteinhydrolysat Biozate 1 kein spezifisches Molekulargewicht angegeben werden kann, erfolgte die Verwendung in dem Medium in Konzentrationen von $\mu\text{g/mL}$. Hinsichtlich der Behandlung von Caco-2 Zellen mit Biozate 1 zeigte sich im Resazurinassay ausschließlich bei den Konzentrationen 50 und 75 $\mu\text{g/mL}$ eine Einschränkung der Zellviabilität um mehr als 5% (50 $\mu\text{g/mL}$: $91,5 \pm 4,1\%$, 75 $\mu\text{g/mL}$: $94,0 \pm 3,9\%$). In beiden Fällen war die Abnahme der Lebensfähigkeit der Zellen nicht signifikant. Keine der weiteren eingesetzten Konzentrationen von Biozate 1 im Zellmedium führten zu einer signifikanten Hemmung der Stoffwechselaktivität. Hinsichtlich der lysosomalen Membranintegrität konnte wiederum ein stärkerer Einfluss der Substanz beobachtet werden. Während bei der Behandlung der Zellen mit Biozate 1 in den Konzentrationen 1,0 und 10,0 $\mu\text{g/mL}$ die Lebensfähigkeit von Caco-2 Zellen annähernd erhalten blieb ($98,5 \pm 2,6\%$ bzw. $95,7 \pm 17,7\%$), betrug bei 50 $\mu\text{g/mL}$ die Zellviabilität nur noch $81,3 \pm 6,9\%$. Diese Senkung war signifikant gegenüber der Kontrollpopulation. Ebenso signifikant waren die Effekte auf die lysosomale Membranintegrität der Zellen bei Verwendung von Biozate 1 in hohen Konzentrationen im Inkubationsmedium. Die Hemmung der Lebensfähigkeit der Zellen betrug dabei maximal 28,7% (75,0 $\mu\text{g/mL}$ $74,7 \pm 6,8\%$, 100 $\mu\text{g/mL}$ $71,3 \pm 7,7\%$) und war somit weniger gravierend bzw. nicht analog, wie die ausgelöste Inhibierung des Zellwachstums bei hohen Konzentrationen von Tween 80.

Vor dem Hintergrund, dass die Wirkstoffe Lutein bzw. Luteinester in den Präemulsionen, in den Fertigrezepturen sowie in dem späterem NEM in MCT-Öl gelöst vorliegen, wurde ein möglicher Effekt von MCT-Öl auf die Lebensfähigkeit der Caco-2 Zellen untersucht. Die Einordnung der verwendeten Konzentrationen erfolgte in Form von zugegebenen Volumina des MCT-Öles in $\mu\text{L}/\text{mL}$. Die Auswertung der in diesem Zusammenhang stehenden detektierten Viabilitäten im Resazurinassay zeigte keinen signifikanten Einfluss des Öles auf die Lebensfähigkeit von Caco-2 Zellen. Nach Behandlung mit einer Menge von $0,5 \mu\text{L}/\text{mL}$ MCT-Öl im Medium betrug die Viabilität der Zellen relativ zur Kontrolle $93,9 \pm 4,0\%$. Bei Verdopplung der Menge des Öles stieg diese sogar auf $105,5 \pm 5,1\%$ an. Mit weiterem Erhöhen der MCT-Menge im Inkubationsmedium konnte keine korrelierende Senkung der Zellviabilität bzw. Stoffwechselaktivität der Zellen im Resazurinassay detektiert werden. So wurde bei der MCT-Öl-Konzentration von $1,5 \mu\text{L}/\text{mL}$ eine Viabilität von $94,8 \pm 6,3\%$, bei $2,0 \mu\text{L}/\text{mL}$ von $95,3 \pm 14,0\%$ beobachtet. Weiterhin lag die Zellviabilität bei der höchsten verwendeten Menge an MCT-Öl im Medium ($2,5 \mu\text{L}/\text{mL}$) bei $99,3 \pm 8,7\%$. Im Neutralrotassay konnten für die analog behandelten Zellpopulationen ebenso keine bzw. nur geringfügige Effekte auf die Lebensfähigkeit bzw. lysosomale Membranintegrität nachgewiesen werden. Einzig bei einer zugesetzten Menge an MCT-Öl von $2,5 \mu\text{L}/\text{mL}$ wurde eine hochsignifikante Hemmung der Zellviabilität von $8,3\%$ festgestellt (Viabilität relativ zur Kontrolle $91,7 \pm 0,9\%$). Bei den Konzentrationen $1,0$ und $1,5 \mu\text{L}/\text{mL}$ war dagegen sogar ein Anstieg der prozentualen Viabilität relativ zur Kontrolle nachweisbar, welcher nicht signifikant war ($1,0 \mu\text{L}/\text{mL}$ $112,3 \pm 14,6\%$, $1,5 \mu\text{L}/\text{mL}$ $101,7 \pm 19,3\%$). Bei einer MCT-Öl-Konzentration von $2,0 \mu\text{L}/\text{mL}$ im Medium betrug die Viabilität der Caco-2 Zellen $93,3 \pm 16,7\%$.

4.5.1.3 *Lutein und Luteinester in Miniemulsionen mit Hochdruckhomogenisierung*

In den Versuchen zu möglichen hemmenden Effekten der Miniemulsionen auf die Lebensfähigkeit von Caco-2 Zellen wurden zunächst höhere Mengen an Luteinäquivalent im Inkubationsmedium eingesetzt, als in späteren Absorptionsversuchen zur Anwendung kommen sollten. Es sollte so geprüft werden, inwiefern hohe Mengen der Formulierungen zytotoxische Wirkungen hervorrufen könnten. Korrelierend mit dem Anstieg der verwendeten Luteinäquivalentkonzentrationen in den eingesetzten Inkubationsmedien stiegen auch die Mengen der Zusatzstoffe. Die Angaben über diese Mengen sind in Abhängigkeit der verwendeten Formulierung der Tabelle dem Anhang zu entnehmen. Im engen Zusammenhang mit späteren Absorptionsversuchen wurde ebenso die Zytotoxizität der Inkubationsmedien

mit M6 (0,6 μM LÄ) und M22 (0,5 μM LÄ) in geringeren Mengen an Luteinäquivalent geprüft. Die Zellviabilität nach Behandlung von Caco-2 Zellen mit den Miniemulsionen M5, M6, M11 und M22 wurden mittels Resazurin- und Neutralrotassay ermittelt. Die Lösung der Miniemulsionen erfolgte direkt in das Kulturmedium. Die Menge an Luteinäquivalent wurde nach Extraktion der verwendeten Verdünnungsreihen und Analyse mittels RP-HPLC bestimmt. Die Mengen an Luteinäquivalenten schwankten dabei in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Formulierungen, so dass sich Unterschiede in den LÄ-Konzentrationen zwischen M5 und M6 bzw. M11 und M22 ergaben. Bei allen hier eingesetzten Miniemulsionen wurden als Emulgiertechnik Ultraschall und Hochdruckhomogenisation angewendet. M5 und M6 beinhalteten Lutein und Luteinester als Wirkstoffe. In die Miniemulsionen M11 und M22 wurde ausschließlich der Wirkstoff Lutein eingebracht. Die verwendeten Konzentrationen der Wirkstoffe in den Inkubationsmedien zur Bestimmung der Zellviabilität sind der Tabelle 32 zu entnehmen. Ergänzend sind neben der Konzentration des Gesamtluteinäquivalents ebenso der molare Anteil an freiem Lutein aufgezeigt. In die Miniemulsionen M11 und M22 wurde als Wirkstoff ausschließlich Lutein eingebracht, weshalb sich niedrigere Konzentrationen hinsichtlich des Gesamtluteinäquivalents in den Inkubationsmedien im Vergleich zu M5 und M6 ergaben. Bezieht man die Konzentration des Wirkstoffes lediglich auf die jeweils vorliegende Menge an Lutein, ergeben sich vergleichbare Konzentrationen an Lutein zwischen den Formulierungen M5 und M11 bzw. M6 und M22. Messbare Unterschiede zu den Zellviabilitäten ermöglichen dann gegebenenfalls Rückschlüsse auf Wechselwirkungen zwischen den Wirkstoffen und auch den zugegebenen Emulgatoren.

Tabelle 32 Wirkstoffkonzentrationen in den Inkubationsmedien zur Bestimmung der Viabilität von Caco-2 Zellen bei Behandlung mit Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen (hochdruckhomogenisiert) in vitro.

Dargestellt sind die in den Viabilitätsassays eingesetzten Endkonzentrationen des Gesamtluteinäquivalents bzw. von Lutein aus Miniemulsionen in den Inkubationsmedien in μM . M5 Lutein/Luteinester/Tween 80, M6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1, M11 Lutein/Tween 80, M22 Lutein/Tween 80/Biozate 1, c (LÄ) = Konzentration Luteinäquivalent, c = Konzentration.

	M5				M6			
c (LÄ) [μM]	6,2	12,5	125,0	375,2	6,3	12,5	166,9	501,1
c _{Lutein} [μM]	0,8	1,6	16,2	48,7	0,9	1,8	23,7	71,3
	M11				M22			
c (LÄ) [μM]	1,2	2,4	18,0	54,0	1,1	2,3	23,0	69,0
c _{Lutein} [μM]	0,9	1,8	13,3	40,0	1,1	2,2	22,1	66,3

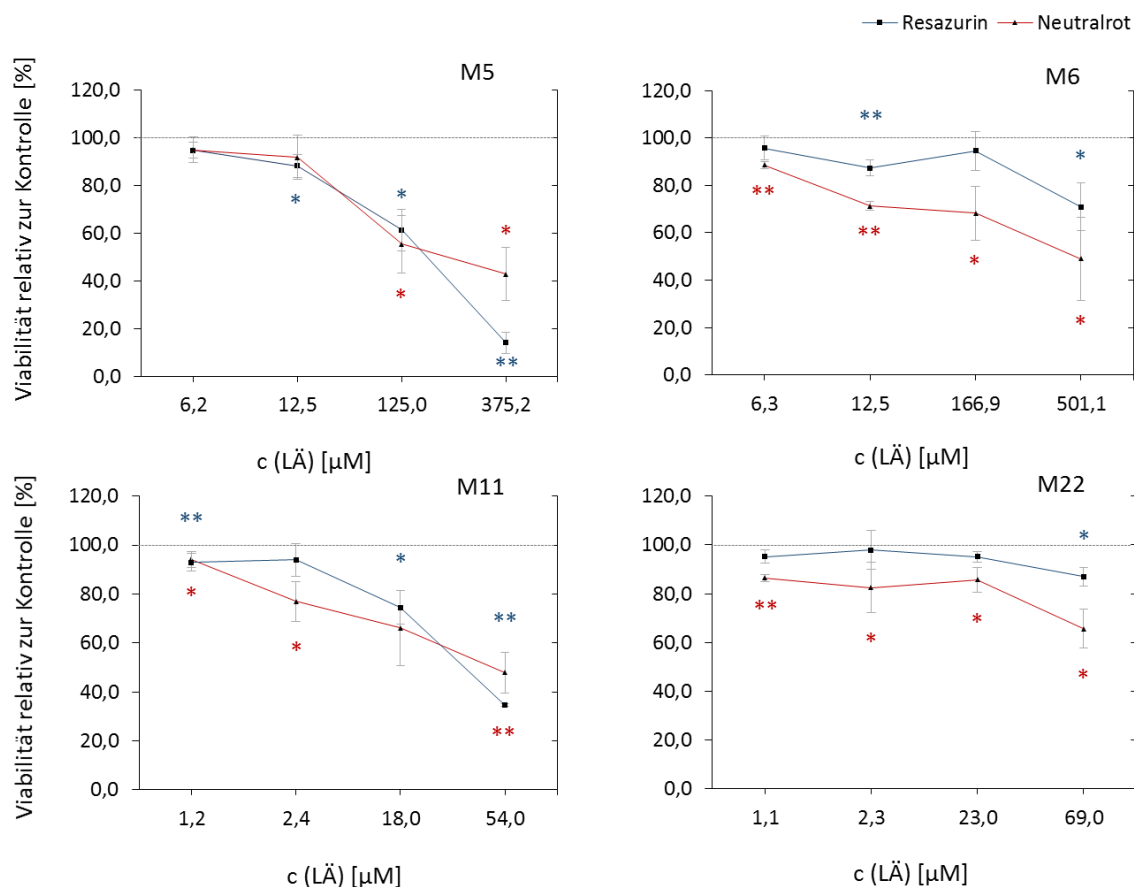


Abbildung 18 Viabilität von Caco-2 Zellen nach Behandlung mit Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen (hochdruckhomogenisiert) in vitro.

Dargestellt sind die Dosis-Toxizitätskurven von Caco-2 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit den Miniemulsionen M5, M6, M11 und M22 im Resazurinassay (Linie blau) und Neutralrotassay (Linie rot). M5 Lutein/Luteinester/Tween 80, M6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1, M11 Lutein/Tween 80, M22 Lutein/Tween 80/Biozate 1, c (LÄ) = Konzentration Luteinäquivalent. Statistik: t-Test, *signifikant $p < 0,05$, **hoch signifikant $p < 0,01$ zur unbehandelten Zellpopulation.

Die Abbildung 18 zeigt die Dosis-Toxizitätskurven nach einer Behandlung der Zellen mit der jeweiligen Miniemulsionen. Betrachtet man die Dosis-Toxizitätsbeziehung der Miniemulsion M5 wird sichtbar, dass in beiden Viabilitätsassays ähnliche Kurvenverläufe somit ähnliche hemmende Effekte auf die Lebensfähigkeit der Zellen zu verzeichnen sind. Bei Konzentrationen des Luteinäquivalents von 6,2 bzw. 12,5 µM sind in beiden Assays geringe Einschränkungen der Zellviabilität (<10%) zu beobachten. Mit weiterem Verzehnfachen der Konzentration an Luteinäquivalent auf 125 µM sind gravierende zytotoxische Effekte in beiden Viabilitätsnachweisen festzustellen. Bei Anwendung dieser Konzentration von LÄ wurde im Resazurinassay eine Lebensfähigkeit der Zellen von nur noch $61,3 \pm 8,7\%$, im Neutralrotassay von $55,3 \pm 11,9\%$ ermittelt. In beiden Fällen waren die Ergebnisse signifikant zur jeweiligen unbehandelten Zellpopulation. Bei der höchsten verwendeten Menge der Miniemulsion M5 im

Inkubationsmedium (375 μM LÄ) zeigten die Caco-2 Zellen eine nahezu vollständige Einstellung ihrer Stoffwechselaktivität. So konnte im Resazurinassay lediglich eine Zellviabilität von $13,9 \pm 4,5\%$ festgestellt werden. Diese war hoch signifikant zur Kontrolle. Zugleich konnte eine Veränderung der Membranintegrität der Lysosomen mit dem Neutralrotassay assoziiert werden. Im NR kam es zu einer signifikanten Senkung der Viabilität der Zellen auf $42,9 \pm 11,0\%$.

Weniger starke inhibitorische Effekte auf das Wachstum von Caco-2 Zellen, aber bereits mit niedrigen Mengen an Luteinäquivalent einsetzend, zeigten sich bei Verwendung der Miniemulsion M6. Im Resazurinassay betrug die detektierte Abnahme der Zellviabilität $4,3\%$ bei $6,3 \mu\text{M}$ LÄ bzw. hochsignifikante $12,7\%$ bei $12,5 \mu\text{M}$ LÄ. Analog führte die Verwendung dieser Konzentrationen im Neutralrotassay zu einem Nachweis einer Senkung der Zellviabilität um $11,4\%$ ($6,3 \mu\text{M}$ LÄ) bzw. $28,7\%$ ($12,5 \mu\text{M}$ LÄ). In beiden Fällen war die Veränderung der Lebensfähigkeit der Caco-2 Zellen hoch signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Bei der Inkubation der Zellen mit der Formulierung M6 in einer Konzentration von $166,9 \mu\text{M}$ LÄ konnte im Resazurinassay Viabilitätseinschränkungen mit ähnlichem Ausmaß, wie bei der niedrigsten untersuchten Konzentration festgestellt werden. Die ermittelte Viabilität der Caco-2 Zellen betrug $94,6 \pm 8,3\%$. Eine weitere Abnahme der Zellviabilität bei dieser LÄ-Konzentration wurde dagegen im Neutralrotassay gezeigt. Die Viabilität der Zellen betrug hier $68,4 \pm 11,4\%$. Die Abnahme der Lebensfähigkeit der Zellen um $31,6\%$ war dabei signifikant zur Kontrolle. Bei Einsatz von M6 in einer Konzentration an Luteinäquivalent von $501,1 \mu\text{M}$ konnte in beiden Assays eine Herabsetzung der Lebensfähigkeit der Zellen beobachtet werden. Wobei diese Abnahme der Zellviabilität im Neutralrotassay sehr viel markanter war. Während im Resazurinassay eine Zellviabilität von $70,9 \pm 10,1\%$ ermittelt wurde, betrug diese im NR nur noch $49,1 \pm 17,4\%$. In beiden Assays war die Abnahme statistisch signifikant. Vergleicht man die Verläufe der Dosis-Toxizitätskurven von M5 und M11 sind diese ähnlich. Es zeigt sich in beiden Fällen ein Zusammenhang zwischen der Abnahme der Zellviabilität und dem Anstieg der Konzentration an Luteinäquivalent bzw. Lutein im Inkubationsmedium. Der hemmende Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen bei der Behandlung mit Inkubationsmedien der Miniemulsion M11 in einer Konzentration an LÄ von $1,2 \mu\text{M}$ fällt ähnlich gering aus, wie bei M5. Dabei betrug die Zellviabilität relativ zur Kontrolle im Resazurinassay hochsignifikante $92,9 \pm 9,7\%$. Im Neutralrotassay lag die Lebensfähigkeit der Zellen bei $94,2 \pm 3,2\%$ (signifikant). Eine um $23,1\%$ eingeschränkte lysosomale Membranintegrität konnte bei der Behandlung der Zellen mit M11 in einer

Konzentration von 2,4 μM LÄ beobachtet werden. Die Viabilität sank signifikant auf $76,7 \pm 8,1\%$ im Vergleich zur unbehandelten Zellpopulation. Weniger stark war die Viabilitätseinschränkung bei dieser Konzentration im Resazurinassay ($93,9 \pm 6,6\%$). Bei Behandlung der Caco-2 Zellen mit einer Konzentration von 18,0 μM LÄ betrug die Viabilitäten $74,6 \pm 6,8\%$ (Signifikanz $p < 0,05$ Resazurin) bzw. $66,1 \pm 15,4\%$ (NR) und lagen damit in einem Bereich einer Hemmung von über 25%. Eine weitere Erhöhung der Molarität LÄ auf 54,0 μM korrelierte mit einer zunehmenden Minderung der Lebensfähigkeit der Zellen. Die Viabilität der Zellen betrug nun nur noch $34,6 \pm 0,5\%$ ($p < 0,01$ Resazurin) bzw. $48,0 \pm 8,3\%$ (NR).

Die wachstumshemmenden Effekte auf die Caco-2 Zellen bei Behandlung mit der Miniemulsion M22 im Inkubationsmedium waren wiederum weniger gravierend als bei M11. Dieser Effekt trat bereits im Vergleich von M5 und M6 auf. Möglicherweise ist die weniger zytotoxische Wirkung auf die geringere Menge an Tween 80 durch den Austausch mit Biozate 1 in der jeweiligen Rezeptur zurückzuführen. Nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit M22-haltigem Medium konnte im Resazurinassay eine maximale messbare Abnahme der Lebensfähigkeit von 12,9% ermittelt werden. Diese war bei der höchsten angewandten Menge an LÄ (69,0 μM) zu beobachten und hoch signifikant (Viabilität relativ zur Kontrolle $87,1 \pm 3,8\%$). Bei der Inkubation der Zellen mit Medien in geringerer Konzentration an LÄ (1,1 bzw. 2,3 μM) betrug die Viabilität der Zellen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle $95,2 \pm 2,8\%$ bzw. $97,9 \pm 7,9\%$. Eine signifikante Abnahme der Lebensfähigkeit der Zellen auf $95,1 \pm 4,9\%$ konnte bei Einsatz von 23,0 μM LÄ ermittelt werden. Einen größeren hemmenden Einfluss hatte M22 auf die Membranintegrität der zellulären Lysosomen. Bei den Konzentrationen von 1,1 bzw. 2,3 μM wurden hoch signifikante Beeinträchtigungen der Viabilität von Caco-2 Zellen im NR detektiert. Die Lebensfähigkeit der Zellen betrug hier $86,5 \pm 1,5\%$ bzw. $85,8 \pm 5,1\%$ im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Am stärksten war die Senkung der Lebensfähigkeit bei Einsatz von M22 in einer Konzentration an Luteinäquivalent von 69,0 μM im Behandlungsmedium. Die Zellviabilität war diesbezüglich signifikant auf $65,7 \pm 8,0\%$ herabgesetzt.

Da in den Versuchen zur Absorption von Lutein bzw. Luteinestern aus dem Medium *in vitro* geringere Konzentrationen an Luteinäquivalent zur Anwendung kommen sollten, wurden zusätzlich mögliche zytotoxische Effekte der Miniemulsionen M6 und M22 in geringeren Konzentrationen im Inkubationsmedium geprüft. Die dabei eingesetzten Endkonzentrationen an Gesamtluteinäquivalent in den Inkubationsmedien betrug 0,6 μM (M6) bzw. 0,5 μM (M22).

In beiden Fällen konnten keine signifikanten Viabilitätseinschränkungen in Caco-2 Zellen beobachtet werden. Die ermittelten Zellviabilitäten relativ zu unbehandelten Zellpopulationen (Kontrolle) sind der Tabelle 33 zu entnehmen. Die Anwendung der Formulierungen in der jeweiligen Konzentrationen in Absorptionsversuchen konnte als zytotoxisch unbedenklich bewertet werden. Einschränkungen in der Stoffwechselaktivität bzw. lysosomalen Membranintegrität von Caco-2 Zellen gingen von den hier eingesetzten Mengen der Formulierungen M6 und M22 nicht aus.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die hier untersuchten Miniemulsionen (Emulgierverfahren: Hochdruckhomogenisation) bei Anwendung in physiologischen Konzentrationen keine zytotoxischen Effekte hervorrufen. Eine Supplementierung über dieses Maß hinaus könnte das intestinale Milieu stören und möglicherweise die Resorbierbarkeit von Substanzen insbesondere dem eingebrachten Wirkstoff im Dünndarm herabsetzen. Im Rahmen zellulärer Effekte haben die eingesetzten Formulierungen eher Einfluss auf die metabolischen Aktivitäten von Zellen (Resazurin), als auf eine Einschränkung der (lysosomalen) Membranintegrität. Ein Anstieg der Konzentration von LÄ der Miniemulsionen korrelierte mit einer höheren, prozentualen Senkung der Zellviabilität im Resazurinassay, als im NR (Ausnahme M22). Eine markante Begrenzung der Lebensfähigkeit von Caco-2 Zellen bzw. Zytotoxizität wird mit Anwendung hoher Konzentrationen LÄ von Miniemulsionen in Inkubationsmedien hervorgerufen. Möglicherweise hat dabei der korrelierenden Anstieg der Konzentration von Tween 80 eine entscheidende Bedeutung. Dies wird damit untermauert, dass die hemmenden Effekte bei den Emulsionen mit Tween 80 und Biozate 1 (M6, M22) weniger stark ausfielen, als bei den analogen, ausschließlich Tween 80 enthaltenden Formulierungen (M5, M11). Ein partieller Ersatz des Emulgators Tween 80 durch Biozate 1 ist dahingehend empfehlenswert.

Tabelle 33 Viabilität von Caco-2 Zellen nach Behandlung mit Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen (hochdruckhomogenisiert) in vitro.

Dargestellt sind die mittels Resazurin- und Neutralrotassay ermittelten prozentualen Viabilitäten von Caco-2 Zellen relativ zur unbehandelten Zellpopulation (Kontrolle) nach 24-stündiger Behandlung mit den Miniemulsionen M6 und M22. M6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1, M22 Lutein/Tween 80/Biozate 1. c (LÄ) = Konzentration Luteinäquivalent.

	c (LÄ) [μ M]	Viabilität relativ zur Kontrolle [%]	
		Resazurin	Neutralrot
M6	0,6	98,9 \pm 1,5	92,4 \pm 6,1
M22	0,5	98,3 \pm 1,8	98,9 \pm 1,4

4.5.1.4 Lutein und Luteinester in Miniemulsionen ohne Hochdruckhomogenisierung

Um eine zytotoxische Wirkung bei Versuchen zur zellulären Aufnahme von Lutein und Luteinestern aus Formulierungen ohne Hochdruckhomogenisation auszuschließen, wurden analog zu diesen Studien zytotoxische Effekte der verwendeten Miniemulsionen MO4 und MO6 überprüft. Dabei wurde diese direkt und auch nach Inkubation im *in vitro* Verdau *basic* hinsichtlich einer zellwachstumshemmenden Wirkung untersucht. Vor Einsatz im Viabilitätsassay wurden die jeweiligen Formulierungen in 96% Ethanol gelöst. Durch eine weitere Verdünnung in das Medium (complete) wurde die Konzentration des Ethanols auf 0,1% herabgesetzt. Die ermittelten prozentualen Viabilitäten der Caco-2 Zellen nach Inkubation mit den entsprechenden Medien im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Zellpopulation (Kontrolle) sind der Tabelle 34 zu entnehmen. Aus den im Resazurinassay ermittelten prozentualen Viabilitäten relativ zur Kontrollpopulation lässt sich ausschließlich bei Behandlung der Zellen mit MO6 in einer LÄ-Konzentration von 0,4 μ M ein signifikanter, wachstumshemmender Effekt herleiten. Die Viabilität der Caco-2 Zellen sank hier auf $90,8 \pm 2,3\%$. Keinen einschränkenden Einfluss auf die Lebensfähigkeit konnte bei Verwendung der analogen verdauten Formulierung sowie bei der entsprechenden Inkubation der Zellen mit MO4 gezeigt werden. Einen stärkeren Effekt hatten die verwendeten Inkubationsmedien mit MO4 und MO6 auf die Stabilität der Lysosomenmembranen der Caco-2 Zellen. Im Neutralrotassay konnte eine Senkung der Zellviabilität nach Behandlung mit MO4 von 8,3% (direkt) bzw. MO4 2,8% (verdaut) ermittelt werden. Die Verwendung von MO6 im Medium führte zu einer Herabsetzung der Lebensfähigkeit der Zellen auf 10,5% (direkt) bzw. 1,8% (verdaut). In keinem Fall waren diese wachstumshemmenden Effekte signifikant. Die Inkubation der Zellen mit Medium, welches 0,1% Ethanol enthielt, diente einer zusätzlichen Kontrolle. Die Verwendung führte in keinem der angewendeten Viabilitätsassays zu Einschränkungen der Lebensfähigkeit der Caco-2 Zellen.

Tabelle 34 Viabilität von Caco-2 Zellen nach Behandlung mit Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen (ultraschallbehandelt) in vitro.

Dargestellt sind die mittels Resazurin- und Neutralrotassay ermittelten prozentualen Viabilitäten von Caco-2 Zellen relativ zur unbehandelten Zellpopulation (Kontrolle) nach 24-stündiger Behandlung mit den Miniemulsionen MO4 bzw. MO6 (direkt bzw. verdaut). MO4 Luteinester/Tween 80/Biozate 1, MO6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1. LÄ = Luteinäquivalent, n.d. = nicht detektierbar. Statistik: t-Test, *signifikant $p < 0,05$ zur unbehandelten Zellpopulation.

	Konzentration Inkubationsmedium in Bezug auf		Viabilität relativ zur Kontrolle [%]	
	Lutein [μM]	LÄ [μM]	Resazurin	Neutralrot
MO4				
<i>direkt</i>	n.d.	0,4	101,6 \pm 2,5	91,7 \pm 5,8
<i>verdaut</i>	n.d.	0,5	99,8 \pm 1,6	97,2 \pm 4,2
MO6				
<i>direkt</i>	0,1	0,4	90,8 \pm 2,3*	89,5 \pm 11,8
<i>verdaut</i>	0,2	0,6	103,7 \pm 0,5*	98,2 \pm 4,1
0,1% Ethanol	0,0	0,0	106,9 \pm 7,0	102,4 \pm 10,7

4.5.1.5 Lutein und Luteinester in Fertigrezepturen

Für die Studien zur zellulären Aufnahme von Lutein und Luteinestern aus Fertigrezepturen wurden die zytotoxischen Effekte der verwendeten Inkubationsmedien mit diesen Formulierungen ebenso überprüft. Die Behandlungsdauer wurde auf 72 h erhöht, um möglichst gleiche Bedingungen, wie in den Absorptionsversuchen zu schaffen. Die ermittelten Ergebnisse zu den Viabilitäten der Caco-2 Zellen sind der Tabelle 35 zu entnehmen. Im Vergleich der Daten beider Assays wird ersichtlich, dass die Fertigrezepturen anscheinend einen stärkeren Einfluss auf die Stoffwechselaktivitäten der Zellen (Resazurin) haben, als auf die lysosomale Membranintegrität (NR). Im Resazurinassay war eine Senkung der Lebensfähigkeit der Zellen zwischen 12,2% und 17,9% zu beobachten. Weiterhin konnte hier festgestellt werden, dass die jeweiligen Fertigrezepturen mit Biozate 1 (124, 125) eine geringfügig stärkere Wachstumshemmung hervorriefen, als die analogen Rezepturen mit ausschließlich Tween 80 (122, 123). Im Neutralrotassay betrug die höchste Abnahme der Zellviabilität 6,8% (124). Bei der Behandlung der Caco-2 Zellen mit den Fertigrezepturen 122 bzw. 123 (Emulgator: Tween 80) wurde sogar ein Anstieg der Lebensfähigkeit der Zellen beobachtet. Dieser betrug 1,3% (122) bzw. 3,2% (123). Dagegen konnte bei Inkubation mit Kulturmedien, welche die Formulierungen 124 und 125 enthielten eine Verminderung der Lebensfähigkeit der Zellen detektiert werden (124: 93,2 \pm 6,0%; 125: 97,7 \pm 3,6%). Ein wachstumshemmender Effekt ging demnach nur

von den Formulierungen mit Biozate 1 aus. Die hier vorliegenden Ergebnisse der Untersuchungen eines Einflusses auf die Viabilität der Fertigrezepturen auf Caco-2 Zellen zeigen, dass durch die Zugabe der Formulierungen die Stoffwechselaktivität der Zellen stark beeinflusst bzw. herabgesetzt wird. Dies ist insofern von Bedeutung, dass die zelluläre Aufnahme von Substanzen, wie auch Lutein bzw. Luteinester eingeschränkt wird. Somit würde folglich die Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe sinken.

Tabelle 35 Viabilität von Caco-2 Zellen nach Behandlung mit Lutein und Luteinestern aus Fertigrezepturen *in vitro*.

Dargestellt sind die mittels Resazurin- und Neutralrotassay ermittelten prozentualen Viabilitäten von Caco-2 Zellen relativ zur unbehandelten Zellpopulation (Kontrolle) nach 72-stündiger Behandlung mit den Fertigrezepturen. 122 Luteinester/Tween 80/MCT-Öl, 123 Luteinester/Tween 80/Rapsöl, 124 Luteinester/Tween 80/Biozate 1/MCT-Öl, 125 Luteinester/Tween 80/Biozate 1/Rapsöl, LÄ = Luteinäquivalent, n.d. = nicht detektierbar. Statistik: t-Test, **hoch signifikant $p < 0,01$ zur unbehandelten Zellpopulation.

	Konzentration im Inkubationsmedium in Bezug auf		Viabilität relativ zur Kontrolle [%]	
	Lutein [μM]	LÄ [μM]	Resazurin	Neutralrot
122	n.d.	0,5	87,8 \pm 6,8**	101,3 \pm 0,6
123	n.d.	0,6	85,6 \pm 5,9	103,2 \pm 4,6
124	n.d.	0,7	84,3 \pm 6,8	93,2 \pm 6,0
125	n.d.	0,6	82,1 \pm 2,7	97,7 \pm 3,6

4.5.2 Zelluläre Aufnahme von Lutein und Luteinestern aus kolloidalen Formulierungen

4.5.2.1 Lutein und Luteinester

Zunächst wurde die zelluläre Aufnahme der reinen Wirkstoffe in einem Vorversuch geprüft. Dazu wurde Lutein 5% bzw. Luteinester aus Oleoresin jeweils in MCT-Öl gelöst und als Formulierungen in Absorptionsstudien *in vitro* eingesetzt. Die verwendeten Konzentrationen in den Inkubationsansätzen wurden dabei in Anlehnung an Untersuchungen von Frede et al. (2014) gewählt. Nach Vorverdünnung der wirkstoffhaltigen Formulierungen in DMSO wurden diese unter sterilen Bedingungen mit Medium gemischt. Die Wirkstoffkonzentration des Inkubationsmediums mit Lutein betrug 0,44 μM . Das luteinesterhaltige Inkubationsmedium wies eine Endkonzentration von 0,28 μM Luteinäquivalent auf. Caco-2 Zellen wurden für 72 h mit dem jeweiligen Medium behandelt. Wobei alle 24 h das Medium durch frisches Inkubationsmedium ersetzt wurde. Nach Ernte, Waschen und Extraktion sowie Aufkonzentrieren der Zellpellets erfolgte die Analyse von Lutein bzw. Luteinäquivalent mittels RP-HPLC. In den mit luteinhaltigem Medium behandelten Zellpellets konnte eine absolute Menge an

Luteinäquivalent von 0,206 μg nachgewiesen werden. Dies entsprach einer aufgenommenen Wirkstoffmenge von 15,49 $\text{pmol}/10^6$ Zellen. Dabei betrug der Anteil an Lutein 93,9%. Im Gegensatz zur Analyse von dem Präparat Lutein 5% konnten in den Zellpellets qualitativ 6,1% Luteinester detektiert werden. Es erfolgte scheinbar eine Veresterung von freiem Lutein auf zellulärer Ebene. In Bezug auf Zellzahl und der inkubierten Menge des Wirkstoffes konnte abschließend eine Aufnahmerate an Luteinäquivalent von 2,9% nachgewiesen werden. Die mit luteinesterhaltigem Medium behandelten Zellextrakte wiesen dagegen eine Aufnahmerate von nur 0,09% LÄ auf. Die zelluläre Aufnahme betrug 1,5 $\text{pmol}/10^6$ Zellen. Während hier im ursprünglichen Ausgangsmedium ausschließlich Luteinester nachweisbar waren, konnten im Extrakt nach Inkubation auch Lutein sowie seine Isomere qualitativ erfasst werden. Der prozentuale Anteil von Lutein am gemessenen Luteinäquivalent betrug hierbei 64,1%. Damit erfolgte ein Nachweis für die Hydrolyse der Luteinester zu Lutein aufgrund vorhandener zellulärer Enzyme und eine gerichtete Aufnahme von Lutein in die Zellen.

4.5.2.2 *Lutein und Luteinester in Miniemulsionen mit Hochdruckhomogenisierung*

Zur Charakterisierung des Absorptionsverhaltens der Caco-2 Zellen gegenüber kolloidalen Formulierungen wurden anschließend direkt die Miniemulsion M22 (Wirkstoff: Lutein) sowie die Miniemulsion M6 (Wirkstoff: Lutein und Luteinester) für Untersuchungen verwendet. Da beide Formulierungen den Wirkstoff Lutein enthielten, wurde dieser als Bezugsgröße für die Wirkstoffkonzentrationen in den Inkubationsmedien gewählt. Die Konzentration von Lutein im Inkubationsansatz mit M22 betrug 1,6 μM . In den Inkubationsmedien mit M6 wurden drei verschiedene Konzentrationen verwendet, um mögliche Unterschiede in Aufnahmeraten bzw. Verschiebungen hinsichtlich des Lutein/Luteinester-Verhältnisses zu untersuchen. Es wurden Inkubationsmedien mit M6 in Luteinkonzentrationen von 0,1 μM , 0,5 μM und 1,6 μM eingesetzt. Die Formulierung M6 enthielt eine Wirkstoffkombination aus Lutein und Luteinester. Es ist also zu beachten, dass sich bezogen auf die Menge an Luteinäquivalent gesamtheitlich höhere Konzentrationen in diesen Inkubationsansätzen ergaben (0,5 μM , 2,75 μM und 10 μM). Nach 72-stündiger Inkubation und Aufarbeitung der Zellpellets konnten die in Tabelle 36 dargestellten zellulär aufgenommenen Mengen an Luteinäquivalent ermittelt werden. Im Fall der Miniemulsion M6 war stetig ein leichter Anstieg der Aufnahmerate von Luteinäquivalent bei Erhöhung der Wirkstoffkonzentration zu beobachten. Auch die zelluläre Wirkstoffaufnahme ($\text{pmol}/10^6$ Zellen) korrelierte mit steigender Konzentration des Inkubationsmediums

und war stets signifikant. Die detektierten Aufnahmeraten bestätigen jedoch nicht die Ergebnisse aus der Untersuchung der zellulären Aufnahme der reinen Wirkstoffe (4.5.2.1). Dies lässt vermuten, dass die Anwesenheit von weiteren Inhaltsstoffen in den Formulierungen, wie z.B. Emulgatoren, einen Einfluss auf die Aufnahmerate des Wirkstoffes und somit auf das Absorptionsverhalten der Caco-2 Zellen hat. Möglicherweise kommt es zu Wechselwirkungen zwischen Enzymen oder Transportproteinen, welche die Umwandlung von Luteinestern zu Lutein unterbinden bzw. die Aufnahme von Lutein in die Zellen einschränken. Weiterhin zeigte sich eine Verschiebung des Verhältnisses Lutein/Luteinester zu Gunsten des Luteins. Während die prozentuale Verteilung der Wirkstoffe in M6 vor Inkubation bei $15,6 \pm 1,9\%$ (Lutein) und $84,5 \pm 1,9\%$ (Luteinester) lag, betrug der Anteil an Lutein nach Inkubation stets über 40%. Dies deutet zum einen auf eine enzymatische Spaltung der Luteinester zu Lutein *in vitro* hin. Zum anderen kann eine präferierte, direkte Aufnahme des in den Inkubationsansätzen vorliegenden Luteins über entsprechende Transportmechanismen in den Zellen stattgefunden haben. Die nachgewiesene zelluläre Aufnahme von Lutein in den mit M22 behandelten Zellextrakten betrug $2,8 \pm 0,9$ pmoL/ 10^6 Zellen. Dies entsprach einer Aufnahmerate der Wirkstoffe von $0,15 \pm 0,02\%$. Die absolute Aufnahmerate ist somit ähnlich, wie bei der Behandlung der Zellen mit M6 gleicher Luteinkonzentration ($1,6 \mu\text{M}$). Die Ergebnisse lassen ebenso vermuten, dass Lutein gerichtet und direkt von den Zellen durch vorhandene Transporter aufgenommen werden kann. Weiterführend konnte beobachtet werden, dass der prozentuale Luteinanteil am Luteinäquivalent abnahm. In der ursprünglichen Miniemulsion M22 betrug der Luteinanteil fast 100%. Nach Inkubation sank der Wert auf $86,3 \pm 3,5\%$ bei gleichzeitiger Zunahme der Luteinestermenge ($13,7 \pm 3,5\%$). Vorhergehende *in vitro* Untersuchungen zu einzelnen Kompartimenten des Verdauungstraktes zeigten, dass Lutein gegenüber metabolischen Bedingungen instabil sein kann (4.4.1). Während der Behandlung der Zellen könnten Umbauprozesse von Lutein zur Synthese von Luteinestermolekülen geführt haben. Dies würde die Verringerung des prozentualen Luteinanteils und Zunahme der Luteinester erklären. Möglich wären auch enzymatische oder spontane Veresterungen des freien Luteins zu Luteinestern auf zellulärer Ebene.

Tabelle 36 Zelluläre Aufnahme von Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen (hochdruckhomogenisiert) *in vitro*.

Dargestellt sind die ermittelten Mengen an Luteinäquivalent in pmol/10⁶ Zellen, absoluten Aufnahmezeiten sowie reiner Luteinanteil in Prozent in den aufgearbeiteten Zellpellets von Caco-2 Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit Inkubationsmedien aus den Miniemulsionen M6 bzw. M22. Das jeweilige Inkubationsmedium wurde alle 24 h durch entsprechendes, frisches Medium ersetzt. Am Ende des Behandlungszeitraumes wurden die Zellen geerntet, gewaschen, die Zellpellets extrahiert und mittels RP-HPLC die Menge an Luteinäquivalent in mg/mL detektiert. Weiterhin konnte eine qualitative Bestimmung vorhandenen Luteins bzw. seiner Ester vorgenommen werden. Anhand der ermittelten Zellzahl bei Ernte erfolgte die Berechnung von Luteinäquivalent in pmol/10⁶ Zellen sowie der Aufnahmezeit von LÄ [%]. M6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1, M22 Lutein/Tween 80/Biozate 1, LÄ = Luteinäquivalent. Statistik: t-Test, signifikant p<0,05, hoch signifikant p<0,01. **a = hoch signifikant zu M6 mit 0,1 µM Lutein, *b = signifikant zu M6 mit 0,1 µM Lutein, *c = signifikant zu M6 mit 1,6 µM Lutein.

	Konzentration Inkubationsmedium in Bezug auf		zelluläre Aufnahme [pmol/10 ⁶ Zellen]	absolute Aufnahmezeit [%]	reiner Luteinanteil [%]
	Lutein [µM]	LÄ [µM]			
M6	0,1	0,50	1,0 ± 0,2	0,08 ± 0,00	46,4 ± 1,7
	0,5	2,75	3,8 ± 0,4 ^{**a}	0,09 ± 0,03	56,6 ± 9,0
	1,6	10,00	18,8 ± 2,1 ^{*b}	0,13 ± 0,05 ^{*b}	42,1 ± 2,6
M22	1,6	1,60	2,8 ± 0,9 ^{*c}	0,15 ± 0,02 ^{*c}	86,3 ± 3,5

4.5.2.3 Lutein und Luteinester in Miniemulsionen ohne Hochdruckhomogenisierung

Ein weiterer Versuchsansatz sollte zeigen, inwiefern die Herstellungsmethode bzw. Vorbehandlung der Miniemulsionen, die Wirkstoffaufnahme in die Caco-2 Zellen beeinflussen kann. Es wurden dazu die Miniemulsionen MO4 (Wirkstoff: Luteinester) und MO6 (Wirkstoff: Lutein und Luteinester), welche ausschließlich durch Ultraschallbehandlung hergestellt wurden, verwendet. Zunächst erfolgte die Inkubation der Caco-2 Zellen mit emulsionshaltigen Medien für 48 h. Da nur MO6 den Wirkstoff Lutein, aber beide Miniemulsionen Luteinester aufwiesen, wurde in diesen Versuchen als Bezugsgröße für die Wirkstoffkonzentration in den Inkubationsansätzen Luteinäquivalent herangezogen. Dabei betrug die Konzentration des Luteinäquivalents in den Inkubationsmedien jeweils 0,4 µM. Nach 48-stündiger Inkubation wurden die jeweiligen Zellpellets aufgearbeitet und mittels RP-HPLC analysiert. Die ermittelten Mengen an Luteinäquivalent in pmol/10⁶ Zellen sind der Tabelle 37 zu entnehmen. Die Aufnahmezeit von LÄ, der mit MO4 behandelten Zellen, lag bei 0,09 ± 0,0% und damit unter der, der analog mit MO6 behandelten Zellen (0,12 ± 0,01%). Dies ist möglicherweise wiederum ein Indiz, dass Lutein aufgrund vorhandener Transportmechanismen direkt aus dem Medium durch die Zellen aufgenommen werden kann. Während Luteinester nur bedingt mittels vorheriger Hydrolyse oder aber auch durch Diffusion in die Zellen gelangen können. Eine Ent-

stehung von Lutein konnte in den MO4 behandelten Zellen aufgezeigt werden. Die Miniemulsion MO4 beinhaltet als Wirkstoff ausschließlich Luteinester. Nach Inkubation konnte Lutein in den Zellpellets mit einem Anteil von $10,8 \pm 4,7\%$ am Luteinäquivalent detektiert werden. In der ursprünglichen Miniemulsion MO6 verteilten sich Lutein und Luteinester mit 21,2% und 78,8% auf die Gesamtmenge Luteinäquivalent. Nach zellulärer Inkubation veränderte sich dieses Verhältnis in den gewonnenen Extrakten geringfügig. Es kam zu einem Anstieg des Luteinanteils am Luteinäquivalent auf $28,0 \pm 3,3\%$.

Tabelle 37 Zelluläre Aufnahme von Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen (ultraschallbehandelt) *in vitro*.

Dargestellt sind die ermittelten Mengen an Luteinäquivalent in $\text{pmol}/10^6$ Zellen, absoluten Aufnahmeraten sowie reiner Luteinanteil in Prozent in den aufgearbeiteten Zellpellets von Caco-2 Zellen nach 48-stündiger (direkt) bzw. 72-stündiger (verdaut) Behandlung mit Inkubationsmedien aus den Miniemulsionen MO4 bzw. MO6. Der Verdau erfolgte gemäß dem *in vitro* Verdaumodell *basic*. Das Inkubationsmedium wurde alle 24 h durch entsprechendes, frisches Medium ersetzt. Am Ende des Behandlungszeitraumes wurden die Zellen geerntet, gewaschen, die Zellpellets extrahiert und mittels RP-HPLC die Menge an Luteinäquivalent mg/mL detektiert. Weiterhin konnte eine qualitative Bestimmung vorhandenen Luteins bzw. seiner Ester vorgenommen werden. Anhand der ermittelten Zellzahl bei Ernte erfolgte die Berechnung von Luteinäquivalent in $\text{pmol}/10^6$ Zellen sowie die Aufnahmerate von LÄ [%]. MO4 Luteinester/Tween 80/Biozate 1, MO6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1, LÄ = Luteinäquivalent, n.d. = nicht detektierbar. Statistik: t-Test, signifikant $p < 0,05$, hoch signifikant $p < 0,01$. ** = hoch signifikant zu MO4 direkt.

	Konzentration Inkubationsmedium in Bezug auf		zelluläre Aufnahme [$\text{pmol}/10^6$ Zellen]	absolute Aufnahmerate [%]	reiner Luteinanteil [%]
	Lutein [μM]	LÄ [μM]			
MO4					
<i>direkt</i>	n.d.	0,4	$0,4 \pm 0,1$	$0,09 \pm 0,00$	$10,8 \pm 4,7$
<i>verdaut</i>	n.d.	0,5	$1,2 \pm 0,2^{**}$	$0,59 \pm 0,26$	$37,7 \pm 5,3$
MO6					
<i>direkt</i>	0,1	0,4	$0,4 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,01$	$28,0 \pm 3,3$
<i>verdaut</i>	0,2	0,6	$1,3 \pm 0,4$	$0,22 \pm 0,10$	$45,1 \pm 5,0$

Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob eine vorhergehende Metabolisierung der Miniemulsionen analog zum Passieren des Magen-Darm-Traktes, eine vermehrte zelluläre Aufnahme von Lutein bewirkt. Dazu wurden die Miniemulsionen MO4 und MO6 im *in vitro* Verdaumodell *basic* vorbehandelt (3.2.8.3), die Menge an Luteinäquivalent quantitativ sowie qualitativ bestimmt und anschließend dem Medium von Caco-2 Zellen hinzugegeben. Die Behandlung erfolgte für 72 h, wobei alle 24 h das Inkubationsmedium erneuert wurde. Diesbezüglich wurden dazu die Miniemulsionen stets frisch verdaut bzw. metabolisiert. Die Konzentrationen der Inkubationsmedien bezogen auf Luteinäquivalent betragen $0,5 \mu\text{M}$ (MO4) und $0,6 \mu\text{M}$ (MO6).

In den mit MO4 behandelten Zellextrakten konnte nun ein Anstieg der Aufnahmerate auf $0,59 \pm 0,26\%$ nachgewiesen werden (Tabelle 37). Die erhöhte Aufnahmerate war nicht signifikant zur Aufnahmerate, der mit unverdauter MO4 Emulsion behandelten Proben. Weiterhin wurde ein Anstieg des prozentualen Anteils von reinem Lutein am Luteinäquivalent detektiert. Nach Inkubation der ursprünglichen Emulsion MO4 im Medium betrug der Luteinanteil $10,8 \pm 4,7\%$. Nach Behandlung der Caco-2 Zellen mit der metabolisierten Formulierung erhöhte sich dieser Anteil auf $37,7 \pm 5,3\%$. Möglicherweise konnten im *in vitro*-Verdau stattfindende Emulgiervorgänge die Luteinestermoleküle für die zelluläre Hydrolyse zugänglicher machen und so die Luteinaufnahme vorantreiben. Dies würde wiederum den Anstieg nachgewiesenen Luteins erklären. Ein weiterer zu berücksichtigender Faktor, welcher zum Anstieg der Aufnahmerate geführt haben könnte, ist die verlängerte Inkubationszeit (48 h vs. 72 h). Ebenso kritisch ist der detektierte Anstieg der Aufnahmerate in den mit der metabolisierten Formulierung MO6 behandelten Zellextrakten zu betrachten. Hier wurden die Zellen bereits bei Behandlung mit einer doppelt so hohen Luteinmenge, im Vergleich zum vorhergehenden Versuch bei Behandlung mit unverdauter MO6 inkubiert. Dies allein kann bereits zum Anstieg der aufgenommenen Menge an Luteinäquivalent geführt haben. Eine erhöhte Aufnahmerate korrelierte grundlegend mit der höheren Wirkstoffkonzentration im Inkubationsmedium. Unabhängig davon kam es zu dem erwarteten Anstieg des Luteinanteils am Luteinäquivalent. In der ursprünglichen Miniemulsion MO6 betrug der Luteinanteil am Luteinäquivalent annähernd $21,2 \pm 0,3\%$. Dieser Anteil veränderte sich nach Vorbehandlung von MO6 mittels *in vitro* Verdaumodell *basic* nur geringfügig ($17,9 \pm 2,0\%$). Nach zellulärer Inkubation des Verdauansatzes von MO6 im Medium stieg der Anteil von Lutein am Luteinäquivalent auf $45,1 \pm 5,0\%$. Die Verschiebung des Lutein-Luteinester-Verhältnisses zu Gunsten des Luteins kann zum einen damit erklärt werden, dass das vermehrt im Inkubationsansatz vorhandene Lutein direkt von den Zellen absorbiert wurde. Gleichzeitig kann eine zelluläre Hydrolyse von leicht zugänglicheren Luteinestermolekülen zu Lutein und dessen Aufnahme, einen Anstieg der Luteinmenge in den Zellen bewirkt haben.

4.5.2.4 *Lutein und Luteinester in Fertigrezepturen*

Analog den vorherigen Untersuchungen wurden die Fertigrezepturen 122 bis 125 hinsichtlich der zellulären Hydrolyse von Luteinestern und Absorption von Lutein in den Enterocyten überprüft. Die Konzentrationen der Inkubationsansätze wurden individuell an die technischen Anforderungen des Zellkulturversuchs angepasst und bezogen sich auf die Menge an Luteinäquivalent (Tabelle 38). Grundsätzlich erfolgte die eingesetzte Menge in Anlehnung an die vorhergehenden Versuche und betrug mindestens 0,5 µM Luteinäquivalent. Parallel wurden die Miniemulsionen M5 und M6 in die Untersuchungen einbezogen. Im Vergleich zu den Inkubationsansätzen mit Fertigrezepturen wurden hier jedoch die Konzentrationen an Luteinäquivalent um annähernd das Zehnfache erhöht. Da eine Aufnahme der Wirkstoffe zu erwarten war, diente dies u.a. als Positivkontrolle. Weiterhin sollten die Ergebnisse eine Einschätzung der Effektivität bzw. Bioverfügbarkeit von Luteinestern bei der Verwendung höherer Wirkstoffkonzentrationen sowie -kombinationen ermöglichen. Die Zellen wurden für 72 h mit dem jeweiligen Medium behandelt. Wobei alle 24 h das Medium durch frisches Inkubationsmedium ersetzt wurde. Nach Ernte, Waschen und Extraktion sowie Aufkonzentrieren der Zellpellets erfolgte die Analyse von Lutein bzw. Luteinäquivalent mittels RP-HPLC. Bei visueller Betrachtung der Zellpellets von Caco-2 Zellen konnte eine markante Gelbfärbung ausgehend vom aufgenommenen Wirkstoff Lutein bei den mit M5 und M6 behandelten Rückständen beobachtet werden (Abbildung 19). Auch die mit den Fertigrezepturen inkubierten Zellpellets wiesen eine leicht gelbe Färbung auf. Dagegen erschienen die Zellpellets der Kontrolle und der mit 0,1% DMSO behandelten Zellen farblos.

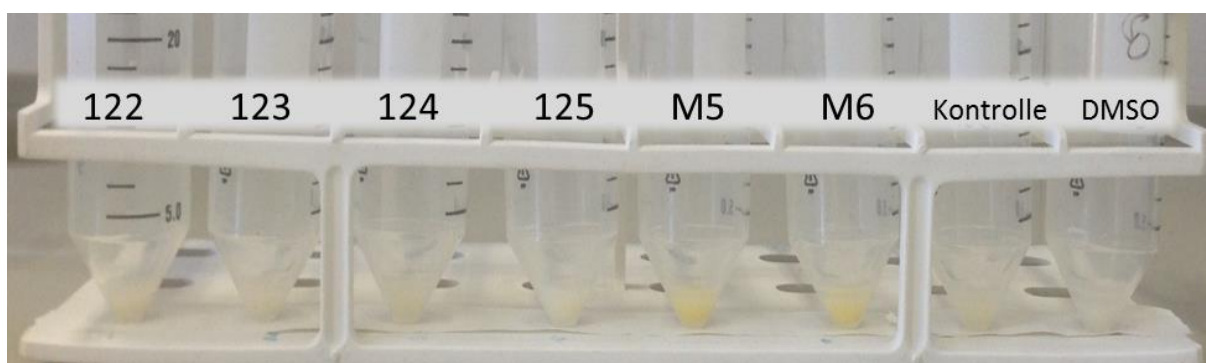


Abbildung 19 Zelluläre Aufnahme von Lutein und Luteinestern aus Fertigrezepturen und Miniemulsionen (hochdruckhomogenisiert) am Caco-2 Modell in vitro.

Die Abbildung zeigt die aufgearbeiteten Zellpellets von Caco-2 nach 72-stündiger Behandlung mit Inkubationsmedien aus den Fertigrezepturen 122 bis 125, Miniemulsionen M5 und M6. 122 Luteinester/Tween 80/MCT-Öl, 123 Luteinester/Tween 80/Rapsöl, 124 Luteinester/Tween 80/Biozate 1/MCT-Öl, 125 Luteinester/Tween 80/Biozate 1/Rapsöl, M5 Lutein/Luteinester/Tween 80, M6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1, M22 Lutein/Tween 80/Biozate 1.

Analytisch konnten in den Extrakten, der mit Fertigrezepturen behandelten Zellen kaum Unterschiede in den absoluten Mengen an Luteinäquivalent sowie den Aufnahmeraten detektiert werden. In den Fertigrezepturen lag der Wirkstoff ausschließlich als Luteinester vor. Nach Inkubation mit wirkstoffhaltigen Medien konnte nun in allen Zellextrakten Lutein nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil von Lutein am Luteinäquivalent stieg auf mindestens 27%, maximal 30,4% (Tabelle 38). Damit ist hier eindeutig eine zelluläre Umwandlung bzw. Hydrolyse der Luteinester zu Lutein nachweisbar. Betrachtet man nun außerdem die Luteinesterverteilung in den extrahierten Zellpellets, zeigt sich, dass teilweise ausschließlich Monoester detektiert wurden. In den luteinesterhaltigen Grundformulierungen lag ursprünglich ein höherer Anteil an Diestern vor. Die Verschiebung zu Gunsten der Monoester könnte ein Hinweis sein, dass auf zellulärer Ebene relevante Enzyme für die Hydrolyse der Luteinester vorhanden sind. Vermutlich erfolgte hier bereits eine unvollständige Abspaltung einzelner Fettsäuren. Vorstellbar wäre auch, dass die kleineren Monoestermoleküle leichter mittels einfacher Diffusionsprozesse in die Zellen gelangen konnten. Diese Verschiebung der Monoesteranteile wurde jedoch nur bei der Behandlung der Zellen mit den Fertigrezepturen beobachtet. In den Zellextrakten, welche mit den Miniemulsionen M5 und M6 behandelt wurden, konnten erwartete Aufnahmeraten von $0,12 \pm 0,004\%$ (M5) und $0,11 \pm 0,006\%$ (M6) nachgewiesen werden. Die Analyseergebnisse, der mit M6 behandelten Zellextrakte bestätigen die zuvor ermittelten Werte in den Studien mit M6 zur zellulären Aufnahme der Wirkstoffe (4.5.2.2). Vergleicht man die aufgenommene Menge an Luteinäquivalent mit den Werten der Inkubationsansätze, welche die Fertigrezepturen enthielten, führt die zehnfach höhere Konzentration an Luteinäquivalent aus M5 bzw. M6 zu einer vier- bis fünfmal höheren Aufnahmerate von LÄ in die Zellen. Genauere Betrachtungen zeigen aber auch, dass ein Vergleich so nicht möglich ist. Die Anwesenheit von Lutein in den wirkstoffkombinierten Formulierungen M5 und M6 beeinflusst die Aufnahmerate entscheidend, da Lutein direkt von den Zellen aufgenommen werden kann. Deutlich wird dies auch am hohen Luteinanteil in den aufgearbeiteten Zellpellets, der eine schnelle, direkte Aufnahme von Lutein in die Zellen belegt. Die ermittelte Aufnahmerate des Luteinäquivalents wird durch die bevorzugte Luteinaufnahme bestimmt.

Tabelle 38 Zelluläre Aufnahme von Lutein und Luteinestern aus Fertigrezepturen und Miniemulsionen (hochdruckhomogenisiert) *in vitro*.

Dargestellt sind die ermittelten absoluten Aufnahmearten sowie der reine Luteinanteil in Prozent in den aufgearbeiteten Zellpellets von Caco-2 Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit Inkubationsmedien mit den Fertigrezepturen 122 bis 125, Miniemulsionen M5 und M6 in verschiedenen Konzentrationen. Das Inkubationsmedium wurde alle 24 h durch entsprechendes, frisches Medium ersetzt. Am Ende des Behandlungszeitraumes wurden die Zellen geerntet, gewaschen, die Zellpellets extrahiert und mittels RP-HPLC die Menge an Luteinäquivalent mg/mL detektiert. Weiterhin konnte eine qualitative Bestimmung vorhandenen Luteins bzw. seiner Ester vorgenommen werden. Anhand der ermittelten Zellzahl bei Ernte erfolgte die Berechnung der Aufnahmearten von LÄ [%]. 122 Luteinester/Tween 80/MCT-Öl, 123 Luteinester/Tween 80/Rapsöl, 124 Luteinester/Tween 80/Biozate 1/ MCT-Öl, 125 Luteinester/Tween 80/Biozate 1/Rapsöl, M5 Lutein/Luteinester/Tween 80, M6 Lutein/Luteinester/ Tween 80/Biozate 1, LÄ = Luteinäquivalent, n.d. = nicht detektierbar.

	Konzentration Inkubationsmedium in Bezug auf		absolute Aufnahmearten [%]	reiner Luteinanteil [%]
	Lutein [μM]	LÄ [μM]		
122	n.d.	0,5	$0,03 \pm 0,006$	$26,2 \pm 5,0$
123	n.d.	0,6	$0,02 \pm 0,005$	$30,4 \pm 4,8$
124	n.d.	0,7	$0,02 \pm 0,002$	$27,0 \pm 5,3$
125	n.d.	0,6	$0,02 \pm 0,000$	$27,9 \pm 4,9$
M5	0,8	4,5	$0,12 \pm 0,004$	$77,2 \pm 0,8$
M6	0,9	5,7	$0,11 \pm 0,006$	$74,4 \pm 1,2$

Abschließend konnte die direkte zelluläre Aufnahme von Lutein *in vitro* aufgezeigt werden (Abbildung 20). Eine Hydrolyse von Luteinestern zu Lutein und nachfolgende Aufnahme von Lutein in die Zelle findet statt. Die vorherige notwendige enzymatische Spaltung führt zu einer weniger effizienten zellulären Aufnahme des entstehenden Luteins aus luteinesterhaltigen Formulierungen, als bei direkter Luteingabe. Eine Aufnahme von Luteinestermolekülen durch einfache Diffusion in den Enterocyten scheint ebenso möglich. Die Anwesenheit von Transportproteinen für hydrophobe Moleküle in den Membranen von Enterocyten ist bekannt [173]. In Abhängigkeit der Molekülgröße des Wirkstoffes (Lutein ≈ 569 Da; Luteinmonopalmitat ≈ 807 Da, Helenien ≈ 1.046 Da) kann dieser in die Zelle diffundieren. Die Versuchsanordnungen lassen offen, inwiefern die Wirkstoffe tatsächlich in die Zellen gelangt sind oder möglicherweise an den Zellmembranen interagieren bzw. anheften. Grundsätzlich kann jedoch in allen Versuchen die Entstehung bzw. der Anstieg von Lutein durch zelluläre Interaktionen belegt werden.

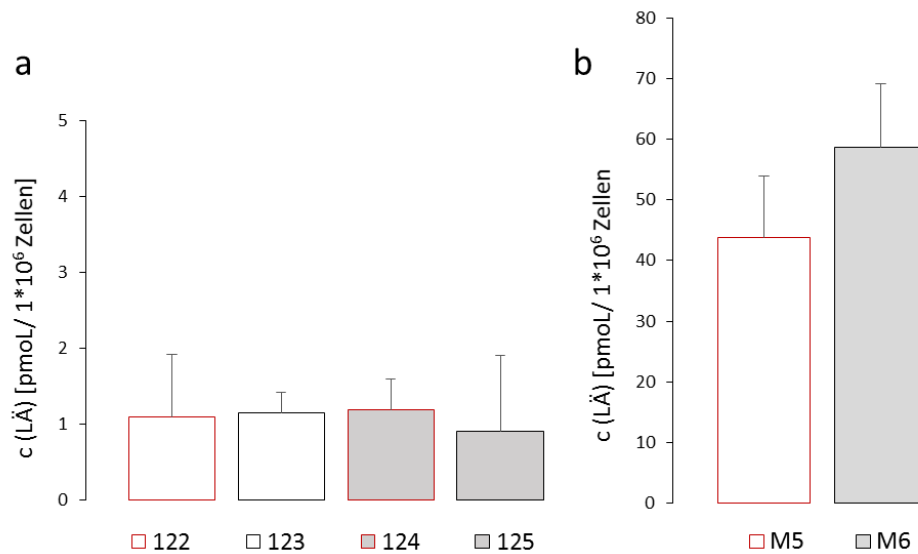


Abbildung 20 Zelluläre Aufnahme von Lutein und Luteinestern aus Fertigrezepturen und Miniemulsionen (hochdruckhomogenisiert) *in vitro*.

Dargestellt sind die ermittelten absoluten Aufnahmemengen an Luteinäquivalent in pmol/ 1*10⁶ Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit Inkubationsmedien aus den a) Fertigrezepturen 122 bis 125, b) Miniemulsionen M5 und M6. 122 Luteinester/Tween 80/MCT-Öl, 123 Luteinester/Tween 80/Rapsöl, 124 Luteinester/Tween 80/Biozate 1/MCT-Öl, 125 Luteinester/Tween 80/Biozate 1/Rapsöl, M5 Lutein/Luteinester/Tween 80, M6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1, c (LÄ) = Konzentration Luteinäquivalent.

5 DISKUSSION

Forschungen zu degenerativen, alterungsbedingten Erkrankungen, ihrer Ursachen, Prävention oder sogar Heilung beschäftigen zahlreiche wissenschaftliche Studien. Auch die altersbedingte Makuladegeneration ist Gegenstand vieler Untersuchungen und doch noch nicht vollständig aufgeklärt. Vorbeugende Maßnahmen, um die Entstehung der Krankheit zu verhindern oder aber auch Heilungsmöglichkeiten sind bis heute nicht ausreichend bzw. erschöpfend beschrieben. Dabei wurde schon frühzeitig der Nutzen einer Supplementierung mit den sekundären Pflanzenstoffen Lutein und Zeaxanthin als Lösungsansatz in Betracht gezogen. Seither sind dazu eine Vielzahl von Studien durchgeführt worden. In einigen konnte dabei gezeigt werden, dass die Gabe von Lutein, in der Regel in Form von Kapseln, zusätzlich zur täglichen Nahrung, einen Anstieg des Serumspiegels an Lutein, eine Erhöhung der Makulapigmentdichte (MPOD) oder sogar Verbesserung der Sehschärfe insbesondere bei älteren Menschen bewirkt [8, 174, 175]. Basierend auf den Erkenntnissen der AREDS I und II Studien werden u.a. Empfehlungen hinsichtlich der zusätzlichen Einnahme von Lutein und Zeaxanthin bei fortgeschrittener AMD in Betracht gezogen, um eine weitere Progression zu verhindern [176]. In der Konzeption eines altersgerechten NEMs mit Xanthophyllen zur Verbesserung bzw. Aufrechterhaltung der Augen- bzw. Retinagesundheit sollten grundlegend verschiedene Aspekte Beachtung finden. Zusätzlich zu den Einschränkungen hinsichtlich der Stoffwechselaktivitäten und degenerativen Prozessen im alternden Organismus lässt mit zunehmendem Alter die Effizienz der Aufnahme essentieller Nährstoffbestandteile über den Magen-Darm-Trakt nach. Damit kann sich möglicherweise ein Mangel für essentielle Wirkstoffe zur Aufrechterhaltung aller Lebensfunktionen manifestieren, dem durch einfache Supplementierung mit gezielter Diät nicht mehr ausreichend entgegengewirkt werden kann. Teilweise erschwerten Schluckbeschwerden oder eingeschränkte Akzeptanz bei der Gabe von Tabletten oder Kapseln eine Supplementierung mit bestimmten Nährstoffen. Moderne Formulierungen von Nahrungsergänzungsmitteln als wirkstoffhaltige Emulsionen oder Nanosuspensionen integriert in Dosiersysteme wie Sprühstifte stellen daher eine hervorragende Alternative dar. Das NEM als Applikation eines Mundsprays sollte in erster Linie den Anforderungen hinsichtlich eines Lebensmittels entsprechen. Die Rezeptur muss jedoch auch physikochemische Stabilitäten des Produktes gewährleisten, sowie die adäquate Resorptions- und Bioverfügbarkeit des Wirk- oder Nährstoffes sicherstellen. Grundlegende Überlegungen zur Entwicklung eines konkurrenzfähigen, marktgängigen NEMs mit einem lipophilen Wirkstoffträger wie Lutein beinhalteten neben der Fragestellung, welche Applikationsform

und begleitenden Inhaltsstoffe angestrebt werden, ebenso Recherchen zur Findung einer kosteneffizienten, reinen und lebensmittelunbedenklichen Quelle des Wirkstoffes. Weiterhin wurden vorhandene, marktrelevante Darreichungsformen des Luteins beachtet und die Prüfung vorhandener Patente vorgenommen (Abbildung 21).



Abbildung 21 Produktentstehungsprozess eines kolloidalen Nahrungsergänzungsmittels zur altersgerechten Supplementierung mit dem sekundären Pflanzenstoff Lutein.

Im Rahmen des Kooperationsprojektes KF2370105SK3 des Bundesministerium für Wirtschaft und Energie erfolgte die Produktentwicklung durch das mittelständische Unternehmen (Projektpartner) unter Beteiligung der Universität Potsdam (Forschungseinrichtung I) und dem Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung (Forschungseinrichtung II).

5.1 FRÜHE PHASEN ZUR KONZEPTION DES NEMs IN FORM EINER MINIEMULSION MIT DEM WIRKSTOFFTRÄGER LUTEIN BZW. LUTEINESTERN

5.1.1 Wahl des Wirkstoffträgers

Als Wirkstoffquelle standen zunächst die drei Produkte Oleoresin aus Marigold (food grade), Biolut und Lutein 5% zur Verfügung (Tabelle 16). Bei der Wahl des Wirkstoffträgers für die Verwendung in dem NEM war dessen pflanzliche, naturbelassene Herkunft, aber auch der Kosten-Nutzen-Faktor von großer Bedeutung. Hauptaugenmerk bei der Rezepturentwicklung wurde auf das Oleoresin gelegt. Oleoresin ist als pflanzliche Quelle auf dem Markt einfach, in großen Mengen und zu adäquaten Preisen zu erwerben. Das zähflüssige, orangefarbene Oleoresin enthält den Wirkstoff Lutein in Form von fettlöslichen Estern, welche die Speicherform

von Lutein in den Pflanzen darstellen und somit auch eine gewisse Stabilität gegenüber äußeren Einflüssen von Natur aus mit sich bringen. Die Gewinnung von Oleoresin erfolgt im Allgemeinen durch Lösungsmittlextraktion und anschließender Aufreinigung. Die Wahl dieser pflanzlichen Quelle ergab sich u.a. aus dem fehlenden, kostengünstigen Angebot an reinem Lutein auf dem Markt. Luteinhaltige Pulver sind z.B. in China und Indien erhältlich, jedoch ist nichts über die Reinheit und Lebensmittelkonformität bekannt. Vorhandene alternative Quellen, wie Biolut und Lutein 5% weisen Grenzen in der Verwendung zur Herstellung eines NEMs in einem mittelständischen Unternehmen auf. So liegt im Präparat Biolut der Wirkstoff in hohen Mengen als Luteinester (90%) vor, ist aber mit einer unbekanntem Verkapselung geschützt, was seinen Einsatz in einer Miniemulsion aus lebensmittelrechtlicher Sicht bedenklich macht. Die Verwendung von Lutein 5% ist wegen der niedrigen Menge des reinen Luteins und dem hohen Anteil an Maltodextrin (95%) problematisch. Ein Einsatz würde zunächst eine Reinigung und Aufkonzentrierung notwendig machen. Der Kosten- und Zeitaufwand einer Anwendung wäre zu hoch. Neben Reinheit und Kostenfragen hatte auch die Löslichkeit der Trägerform einen entscheidenden Einfluss auf deren Wahl als Wirkstoffquelle. Während die pulverförmigen Produkte in Ölen weniger gut löslich waren, konnte Oleoresin problemlos und ohne großen Zeitaufwand in die Öle eingebracht werden. Weiterer Aspekt bei der Wahl des Wirkstoffträgers ist die Bioverfügbarkeit des Luteins aus der kolloidalen Formulierung. Es ist bekannt, dass Lutein im menschlichen Organismus nur in freier Form zirkuliert. Mit Ausnahme des retinalen Gewebes ist es nur in geringen Mengen detektierbar. Die Verwendung von Luteinestern im Präparat setzt eine Resorptionsverfügbarkeit verbunden mit Hydrolyse durch Enzyme im Magen-Darm-Trakt und Aufnahme in die Enterocyten im Dünndarm über vorhandene Transportmechanismen voraus. Studien zeigten, dass ein Anstieg von Lutein im Serum durch Gabe von Supplementen mit Luteinestern stattfindet [100, 101, 177]. Luteinestern können demnach vom humanen Organismus metabolisiert und resorbiert werden. Somit schien die Verwendung von Oleoresin als Wirkstoffträger angemessen. Bei der Herstellung und den Untersuchungen der Prototypen (Präemulsionen) wurde zum Vergleich Lutein 5% als Wirkstoffquelle direkt bzw. zusätzlich zu Luteinestern in den Formulierungen verwendet.

5.1.2 Wahl der Trägerphase und der Emulgatoren

Das wirkstoffhaltige NEM sollte eine möglichst ernährungsphysiologisch begünstigende Zusammensetzung und effektive Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes aufweisen. Gleichzeitig

musste eine kurzfristige und langfristige Stabilität der Formulierung als Miniemulsion (Partikelgröße $\leq 1,0 \mu\text{m}$) gewährleistet werden. Weitere Überlegungen zur Konzeption des NEM beinhalteten daher die Wahl der Trägerphase des Wirkstoffes. Da Lutein und Luteinester hydrophobe Eigenschaften aufweisen, musste entsprechend eine Trägerphase gewählt werden, welche eine stabile Löslichkeit des Wirkstoffes ermöglicht. In Frage kamen hierbei ausgewählte Öle mit vorteilhafter Fettsäurezusammensetzung. Die in den Ölen enthaltenen Fettsäuren haben u. a. einen entscheidenden Einfluss auf die Verdaulichkeit des Wirkstoffträgers. Ein Zusammenhang zwischen höherer Bioverfügbarkeit von Carotinoiden aus der Nahrung bei gleichzeitiger Aufnahme von Fetten oder Ölen wurde mehrfach beschrieben [90, 156, 178-180]. Hintergrund einer geringen Bioverfügbarkeit von Carotinoiden wie Lutein ist deren Hydrophobizität, welche eine weniger gute Löslichkeit im wässrigen Milieu des Magen-Darm-Traktes zur Folge hat. Die gleichzeitige Aufnahme von Carotinoiden und Fetten aus der Nahrung hat einen emulgierende Effekt und vermittelt eine bessere Verteilung der Carotinoide im Verdauungstrakt [180]. Gleichermäßen wird die Ausschüttung pankreatischer Enzyme und die Chylomikronensekretion stimuliert [179, 180]. Während die Bioverfügbarkeit des Carotinoids β -Carotin in Abhängigkeit der Art des aufgenommenen Fettes oder Öles gesteigert werden kann, gibt es hinsichtlich der Bioverfügbarkeit von Lutein keine eindeutigen Korrelationen. Es konnte gezeigt werden, dass der Verzehr von Salat mit Rapsöl zu einem höheren Response an Lutein im Blut von Probanden führte, als der Verzehr der gleichen Menge Salat mit Streichfett [179]. Rapsöl weist einen hohen Anteil an einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (*monounsaturated fatty acid* MUFA, *polyunsaturated fatty acid* PUFA) auf. Während in Streichfett bzw. Butter hauptsächlich gesättigte Fettsäuren (*saturated fatty acid*, SFA) vorliegen. In einer weiteren Studie konnten im simulierten *in vitro*-Verdau von Lutein mit MUFAs bzw. SFAs keine unterschiedlichen Effekte hinsichtlich der Bioverfügbarkeit beobachtet werden. Dagegen zeigte sich hier eine verminderte Metabolisierung von Lutein bei Anwesenheit von Linolsäure (PUFA) [180]. Das Spektrum der Fettsäuren scheint für die Bioverfügbarkeit von Lutein somit nicht unbedingt entscheidend zu sein. Die Zugabe von Fetten wirkt sich jedoch begünstigend auf die physikochemische Umsetzung im Magen-Darm-Trakt und Aufnahme in den systemischen Kreislauf aus. Mit dem Hintergrund der Supplementierung sollte ein Trägeröl mit begleitenden positiven Effekten im humanen Organismus gewählt werden. Dabei spielte der chemische Aufbau der Fettsäuremoleküle in den Ölen eine Rolle. Chemisch können Fettsäuren anhand der Kettenlänge, Anzahl der Doppelbindungen und Konfiguration unterschieden werden. Besteht das Molekül der Fettsäure aus zwei bis vier Kohlenstoffatomen, handelt es sich um eine kurzkettige

Fettsäure (*short chain fatty acid*, SCFA). Bei einer Kettenlänge von sechs bis zwölf Kohlenstoffatomen liegt eine mittelkettige- (*medium chain fatty acid*, MCFA), ab vierzehn Kohlenstoffatomen eine langkettige Fettsäure (*long chain fatty acid*, LCFA) vor [181]. Gleichermäßen ist eine Unterscheidung anhand der vorhandenen Doppelbindungen im Molekül möglich. Besitzt die Fettsäure keine Doppelbindung, liegt eine gesättigte Fettsäure (SFAs) vor. Ungesättigte Fettsäuren dagegen weisen in ihrem Molekül eine Doppelbindung (MUFA) oder mehr als zwei Doppelbindungen (PUFA) auf [181]. Anhand der dann eingenommenen Konfiguration der Kohlenstoffatomkette unterscheidet man zusätzlich *cis*- (gewinkelt) und *trans*-Fettsäuren (linear). Wobei natürlich vorkommende ungesättigte Fettsäuren gewöhnlich in der *cis*-Konfiguration vorliegen. Die Kettenlänge und die Anzahl der vorhandenen Doppelbindungen können dem Lipidnamen der Fettsäure entnommen werden. Weiterhin wird die Position der ersten Doppelbindung im Lipidnamen erfasst. Gebräuchlich ist dabei die Zählung der Kohlenstoffatome ab dem Methylenende des Fettsäuremoleküls. Die Angabe erfolgt dann mit Omega (ω) und Ziffer (n) der Position der Doppelbindung (Omega-n-Fettsäuren). Alternativ kann die Zählung vom Carboxylende der Fettsäure vorgenommen werden (Delta-n-Fettsäure) [55]. Die allgemeine biologische Bedeutung der Fettsäuren ist vielfältig. Neben der Speicherform von Energie sind sie struktureller Bestandteil biologischer Membranen sowie Zelloberflächen und treten als Stoffwechselmediatoren oder Synthesestufen von fettlöslichen Vitaminen, Steroidhormonen und Gallensäuren auf. Insbesondere MUFAs und PUFAs besitzen weitreichend bekannte gesundheitsfördernde Eigenschaften. Zusätzlich spielt die Relevanz der essentiellen Fettsäuren wie Linolsäure (18:2, ω -6) und α -Linolensäure (18:3, ω -3) eine Rolle. Diese PUFAs müssen über die Nahrung aufgenommen werden, da der menschliche Organismus sie selbst nicht synthetisieren kann, aber für lebenswichtige Moleküle im Stoffwechselsystem benötigt. Über den enzymatisch katalysierten Einbau von Doppelbindungen (Desaturase) und Kohlenstoffatomen (Elongase) werden aus ihnen die Arachidonsäure (20:4, ω -6) bzw. die Docosahexaensäure (22:6, ω -3) synthetisiert [182]. Arachidonsäure (AA) ist Grundbaustein für die Bildung von Eicosanoiden, die spezifische Funktionen, wie die Regulation von Entzündungsprozessen und des Blutdrucks, sowie die Blutgerinnung im Körper übernehmen [165]. Zu den Eicosanoiden zählen z.B. Prostaglandine und Thromboxane [165]. Docosahexaensäure (DHA) ist als hydrophobe Kohlenstoffkette Bestandteil in den Phospholipiden der Lipiddoppelschicht von Zellmembranen [165, 183]. Die Umwandlung von Vorstufen in DHA findet limitiert statt. Ein Mangel äußert sich in Erkrankungen, wie z.B. Störungen des Gehirns oder Infertilität [184]. Dagegen sind eine Vielzahl von gesundheitsfördernden Effekten der DHA *in vitro* und *in vivo*

gezeigt worden [185-188]. Hohe Konzentrationen an DHA können im Gehirn und retinalen Geweben nachgewiesen werden [189]. Aufgrund ihrer positiven Effekte sind die Omega-3-Fettsäuren DHA und Eicosapentaensäure (EPA) auch in der Rezeptur der AREDS 2-Formulierung eingebracht worden [7]. Gleichwohl konnte mit der AREDS 2 Studie und der untergeordneten *Cardiovascular Outcome Studie* (COS) keine inverse Korrelation zwischen DHA/EPA-Supplementierung und der Entstehung der AMD bzw. Herz-Kreislaufkrankungen belegt werden [7, 190]. Neben gesundheitsfördernden Aspekten muss der Bioverfügbarkeit der Formulierung insbesondere im Hinblick auf Einschränkungen von Stoffwechselaktivitäten im alternden Menschen Beachtung geschenkt werden. Ein Ansatzpunkt stellte deshalb hier der Einsatz von MCT-Öl als Trägerphase dar. MCT-Öl enthält MCFAs mit einer Kettenlänge von sechs bis zwölf Kohlenstoffatomen. Einen bedeutenden Anteil hat dabei die Caprylsäure (C8). Der Vorteil der MCFAs liegt in ihrer chemischen Natur. Die relativ kurzen Kohlenstoffatomketten bieten eine gute Löslichkeit im Milieu des humanen Magen-Darm-Traktes und schnelle Freisetzung der Fettsäuren aus dem Öl. Dabei entfällt das Emulgieren durch Gallensäure. Die MCFAs können ohne Einbau in Chylomikronen absorbiert werden [191]. Es erfolgt eine direkte Aufnahme in den Blutkreislauf. In der parenteralen Ernährung ersetzen die MCFAs immer mehr die Anwendung von LCFAs. So konnte in einer Humanstudie mit schwerkranken Patienten gezeigt werden, dass MCFA in intravenösen Lipidemulsionen (IVLE) sehr viel schneller hydrolysiert, und zu Fettsäuren bzw. Ketonen oxidiert werden, als LCFA [192]. Die Energie steht somit sehr viel schneller zur Verfügung. Weiterhin treten MCFAs nicht als Lipidmediatoren auf. Zum Einsatz als IVLE für erkrankte Patienten wirken sie sich begünstigend auf Entzündungsereignisse und die Eindämmung von oxidativen Stress aus [193, 194]. Auch der Einsatz von MCFAs in oral zu applizierenden Formulierungen könnte vorteilhaft sein. So zeigten O/W Emulsionen mit MCT-Öl in Untersuchungen eine höhere Stabilität und kleinere Partikelgrößen nach Behandlung mit Hochdruckhomogenisierung im Gegensatz zu Formulierungen mit Raps-, Palm- und Sojabohnenöl [195]. Yuan et al. (2018) konnten *in vitro* nachweisen, dass MCFA-basierte Emulsionen (MCT- und Kokosöl) die Aufnahme von Lutein im Gegensatz zu Emulsionen mit langkettigen Lipiden begünstigen [196].

Tabelle 39 Fettsäurezusammensetzung [%] ausgewählter Öle.

a = Herstellerangaben Endima GmbH, Deutschland; b = Herstellerangaben Caesar & Loretz GmbH, Deutschland; SFA = engl. saturated fatty acids-gesättigte Fettsäuren; MCFA = engl. medium chain fatty acids-mittelkettige Fettsäuren; LCFA = engl. long chain fatty acids-langkettige Fettsäuren; MUFA = engl. monounsaturated fatty acids-einfach ungesättigte Fettsäuren; PUFA = engl. polyunsaturated fatty acids-mehrfach ungesättigte Fettsäuren; n.d. = nicht detektierbar.

Fettsäure	Lipidzusammensetzung [%]				
	MCT-Öl ^a	Rapsöl ^b	Mandelöl ^b	Sonnenblumenöl ^b	Olivenöl ^b
Ölsäure (18:1 ω -9)	n.d.	50-67	62-86	14-40	56-85
Linolsäure (18:2 ω -6)	n.d.	16-30	20-30	48-74	3,5-20
α -Linolensäure (18:3 ω -3)	n.d.	6-14	max. 0,4	0	max. 1,2
SFAs<C16 (MCFA)	98-99	n.d.	max. 0,1	0	max. 0,1
SFA \geq C16 (LCFA)	0	2,8-6,3	7,4-12,4	5-16	9,1-26,1
MUFAs	0	57-74	63,2-87,2	14-40	59,9-88,9
PUFAs	0	22-44	20,4-30,4	48-74	4,7-21,2
ω -3 PUFAs	0	6-14	max. 0,4	0	max. 1,2
ω -6 PUFAs	0	16-30	20-30	48-74	3,5-20

Für die ersten physikalischen Untersuchungen zur Herstellung einer stabilen, wirkstofffreien Miniemulsion wurden anhand der Lipidzusammensetzung fünf relevante Öle als Trägerphase gewählt (Tabelle 39). Dabei traf die Wahl auf das zügig und leicht absorbierbare MCT-Öl. Hinzu kamen Raps-, Mandel-, Sonnenblumen- und Olivenöl, da diese einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren aufweisen. Zunächst wurden wirkstofffreie Miniemulsionen (Mustere-mulsionen) hergestellt, in denen das jeweilige Öl mit Reinstwasser und durch Zugabe des synthetischen Emulgators Tween 80 sowie Natriumcitrat gelöst und ultraschallbehandelt wurde (Anhang 8.2.1.1). Die angewendete Ultraschallbehandlung stellt eine gängige Emulgier-technik zur Herstellung von Emulsionen dar, um Tropfen in der Dispersion zu bilden und me-chanisch zu zerkleinern. Der Emulgator Tween 80 ist ein in der Lebensmittelindustrie bewähr-ter Emulgator für stabile O/W-Emulsionen. Natriumcitrat sollte als Löslichkeitsvermittler (Pep-tisator) agieren, da in der Wasserphase die Zugabe von ionenfreiem Reinstwasser erfolgte. Pep-tisatoren wie Citrat weisen eine hohe elektrische Ladung auf. Dies ermöglicht ihnen eine An-lagerung an der Oberfläche von Partikeln in Emulsionen. Die Oberflächenladung der Partikel selbst steigt. Die Folge ist eine stärkere Abstoßung der Partikel voneinander. Das Einsetzen von Destabilisierungsmechanismen einer Emulsion wird damit eingegrenzt. Zur Charakterisierung der Verwendung ausgewählter Öle wurden die Partikelgrößen der wirkstofffreien, ölspezifi-

schen Miniemulsionen mittels Mastersizer X nach Herstellung sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Lagerung bei 4°C im Dunkeln bestimmt (Tabelle 17). Es wurde zunächst gezeigt, dass alle Öle für die Herstellung von Miniemulsionen unter Verwendung des Emulgators Tween 80 geeignet waren. Die durchschnittliche Partikelgrößenverteilung lag in allen Formulierungen unter 1,0 µm. Nach sechsmonatiger Lagerung blieben die Partikelgrößenverteilungen in den Miniemulsionen annähernd in diesem Bereich erhalten. Leicht größere Partikel wies die Miniemulsion auf Olivenölbasis auf. Dagegen konnten für die Formulierungen mit MCT- und Rapsöl durchschnittlich kleinere Partikelgrößen als 1,0 µm nachgewiesen werden. Es konnte demnach festgestellt werden, dass durch die angewandte Basiszusammensetzung und Emulgiertechnik alle Öle zur Herstellung einer Miniemulsion geeignet waren. Tween 80 wurde als adäquater Emulgator für die O/W-Emulsion bestätigt. Die Ergebnisse dieser ersten Untersuchungen ließen eine Tendenz zur Eingrenzung der Ölauswahl zu. MCT-Öl und Rapsöl schienen bereits in diesem Kontext beste Stabilität der Partikelgrößen im Bereich einer Miniemulsion aufzuweisen. Zur Stärkung dieser These und gleichzeitiger Optimierung der Rezeptur wurden die Versuche mit verschiedenen Ölen weitergeführt. Dabei wurden die Musteremulsionen um den Emulgator Biozate 1 erweitert. Das Peptidgemisch stellt ein bioaktives Molkenproteinhydrolysat dar. Molkenproteine kommen als natürliche Emulgatoren bzw. Stabilisatoren von Lebensmitteln in der Industrie zum Einsatz. Durch Isolierung und Modifikationen können Molkenproteinhydrolysate mit verbesserter Funktionalität generiert werden [197]. Voruntersuchungen zeigten, die Entstehung von kleineren Partikelgrößen und das Auftreten einer besseren physikalischen Stabilität in Emulsionen bei Verwendung von Biozate 1 im Vergleich zu synthetischen Emulgatoren bzw. nativen Molkenproteinen [53]. Zudem wurde der Wirkstoff Lutein in den Emulsionen mit dem Molkenproteinhydrolysat besser vor oxidativen Ab- und Umbaureaktionen geschützt [53]. Zusätzlich sind Molkenproteinhydrolysate leichter verdaulich und weisen eine höhere Bioverfügbarkeit als die native Form auf [198]. Als bioaktive Moleküle bieten sie somit einen weiteren positiven ernährungsphysiologischen Effekt. Aufgrund dieser Vorteile wurde grundsätzlich der Einsatz von Biozate 1 als Emulgator in der zu entwickelnden Rezeptur angestrebt. Vorversuche zeigten aber auch, dass die Verwendung von Biozate 1 als alleiniger Emulgator nicht praktikabel ist. Bereits nach wenigen Tagen konnte in den dazu konzipierten Formulierungen eine Phasentrennung und somit Aufbruch der Emulsion festgestellt werden. Demnach bot sich nur die Verwendung von Biozate 1 in Kombination mit dem synthetischen Emulgator Tween 80, um die Vorteile beider Emulgatoren in einer Rezeptur zu vereinen. Dazu

wurden in weiteren Musteremulsionen mit den jeweiligen Ölen die Zugabe verschiedener Mengenverhältnisse von Tween 80 und Biozate 1 untersucht. Zunächst wurde ein Emulgatorverhältnis mit einem höheren Anteil von Biozate 1 gewählt. Weitere Bestandteile der wirkstofffreien Formulierungen und deren Mengen wurden analog zu den ersten Versuchen beibehalten. Bereits nach der Herstellung konnte eine Vergrößerung der Partikelgrößen bei zusätzlicher Verwendung von Biozate 1 im Vergleich zu den Musteremulsionen mit ausschließlich Tween 80 festgestellt werden (Tabelle 17 und 19). In allen Formulierungen lagen Partikel mit einem Durchmesser von mehr als $1,0\ \mu\text{m}$ vor. Nach 30 Tagen Lagerung kam es in den Formulierungen mit Mandel-, Sonnenblumen- und Olivenöl zur Phasentrennung. Die Stabilität einer Dispersion und das Vorliegen einer Emulsion waren nicht mehr gegeben. Die MCT- und rapsölmhaltigen Rezepturen waren auch nach 30 Tagen homogen. Die Größe der Partikel in den Emulsionen lagen jedoch nicht ausschließlich unter $1,0\ \mu\text{m}$. Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass das gewählte Mengenverhältnis der Emulgatoren unabhängig vom eingesetzten Öl zur Herstellung einer stabilen Miniemulsion ungeeignet ist. Als Schlussfolgerung wurde die Menge an Biozate 1 in weiteren Formulierungen herabgesetzt. Die Emulgatoren wurden nun zu gleichen Teilen hinzugefügt, wobei die restlichen Bestandteile konstant gehalten wurden. Ähnlich wie bei dem zuvor gewählten Emulgatorengefüge wiesen alle fünf Emulsionen nach Herstellung mittlere Partikeldurchmesser über $1,0\ \mu\text{m}$ auf. Nach 30 Tagen Lagerung brachen die Emulsionen mit Mandel- und Olivenöl auf. In der rapsölmhaltigen Formulierung stieg der Durchmesser der Partikel in der Fraktion D90 (volumetrisch) auf $2,73\ \mu\text{m}$. Die Partikelgrößen in der Emulsion mit Sonnenblumenöl blieben stabil. Es lagen aber Partikel mit einem Durchmesser von mehr als $1,0\ \mu\text{m}$ vor. Einzig die Formulierung mit MCT-Öl wies nach 30 Tagen die für eine Miniemulsion gewünschte Partikelgröße von $\leq 1,0\ \mu\text{m}$ bei 90% der in der Emulsion enthaltenen Tropfen auf. Ausgehend von der gewünschten Zugabe von Biozate 1 aufgrund seiner gesundheitsfördernden Effekte schien die Verwendung von Mandel- und Olivenöl als Trägerphase bei der Herstellung der Miniemulsion als nicht zweckmäßig. Eine stabile Emulsionsbildung boten das Raps- und Sonnenblumenöl. Die Erzeugung der gewünschten Partikelgröße von $\leq 1,0\ \mu\text{m}$ in Miniemulsionen konnte möglicherweise durch die Erweiterung der Emulgier-technik (Hochdruckhomogenisierung) erreicht werden. Ebenso könnte so der anfänglich große mittlere Partikeldurchmesser in der Formulierung mit MCT-Öl verringert werden. Grundsätzlich schien unter den gewählten Bedingungen das MCT-Öl als Trägerphase am geeignetsten. Es führte stets zu homogenen Emulsionen. Nach Lagerung für 30 Tage konnte eine Verkleinerung der Partikeldurchmesser in Größenordnung einer Miniemulsion nachgewiesen werden.

5.1.3 Zugabe von Peptisatoren

Neben der Variation der Emulgatorenzugabe stellte sich die Frage, inwiefern die Zugabe von Leitungswasser ohne Peptisatoren ausreichend wäre, um langfristig die gewünschte Partikelgrößenverteilung und Stabilität in den Miniemulsionen aufrecht zu erhalten. Eine derartige Vereinfachung der Rezeptur bietet verschiedene Vorteile. Neben Zeit- und Kostenersparnis kann die Verwendung von möglicherweise den humanen Organismus belastenden Substanzen vermieden werden. Leitungs- bzw. Trinkwasser gilt in Deutschland als Lebensmittel. Seine Qualität ist im Allgemeinen gut und wird stetig kontrolliert. Regelungen zum Trinkwasser, wie Grenzwerte von spezifischen Schadstoffe und Überwachungskriterien sind u.a. in der Trinkwasserverordnung (TrinkwV) verankert. Mit der Zugabe von Trinkwasser würde ebenso die Entwicklung eines naturbelassenen, nachhaltigen NEMs unterstützt werden. Konträr bietet die Verwendung von Reinstwasser kontinuierliche Bedingungen hinsichtlich der basalen Zusammensetzung der Emulsion. Ebenso kann eine mögliche Verkeimungsgefahr verringert werden. Zur Abwägung der Notwendigkeit einer Verwendung von Reinstwasser und Peptisatoren an Stelle von Leitungswasser wurden in ausgewählten wirkstofffreien Miniemulsionen zusätzlich zur Partikelgrößenverteilung die Strömungspotentiale der Partikeloberflächen detektiert. Es wurden rapsöl- und MCT-öhlhaltige Miniemulsionen mit Leitungswasser sowie Reinstwasser mit Natriumcitrat bzw. -phosphat zu einem spezifischen Zeitpunkt nach Lagerung bei 4°C im Dunkeln hinsichtlich ihrer Oberflächenladung untersucht. Alle Emulsionen waren wirkstofffrei und zeigten bei Herstellung eine Partikelgrößenverteilung im oder leicht über dem Größenbereich einer Miniemulsion (Tabelle 20). Eine klare Korrelation der analysierten Partikeldurchmesser mit der Zusammensetzung der Formulierungen konnte nicht beobachtet werden. Hier war also von keiner der gewählten Wasserphasen ein vorteilhafter Effekt zu erwarten. Bei Messung des Strömungspotentials waren in allen Emulsionen die mittleren Partikeldurchmesser gestiegen. Die registrierten Strömungspotentiale bestätigten zunächst eine effiziente Ladungsstabilität der Partikeloberflächen in allen untersuchten Emulsionen. In den rapsöhlhaltigen Formulierungen konnte durch die Zugabe von Natriumcitrat bzw. Natriumphosphat zu Reinstwasser eine größere Oberflächenladung der Partikel beobachtet werden. Dies bedeutete, dass durch die Verwendung von Peptisatoren eine höhere Stabilität der Emulsionen gewährleistet war, als bei alleiniger Verwendung von Leitungswasser. Weiterhin konnten Unterschiede in den Effekten zwischen den verwendeten Peptisatoren festgestellt werden. So führte die Natriumphosphatzugabe zur Wasserphase zu einem doppelt so hohen Strömungspotential wie die analoge Zugabe

von Natriumcitrat. Folglich war die Verwendung von Reinstwasser mit einem Peptisator empfehlenswert. In den Miniemulsionen mit MCT-Öl wurden unabhängig von der verwendeten Wasserphase ähnliche Strömungspotentiale detektiert. Es war aber ersichtlich, dass ein anderes Öl mit den angebotenen Elektrolyten in der Wasserphase geringfügig verändert wechselwirkt. Maßgebende Unterschiede in der mittleren Partikelgröße der Formulierungen aufgrund der Zugabe von Leitungswasser bzw. Reinstwasser mit Peptisator konnten nicht festgestellt werden. Grundlegend wurden in allen Formulierungen Strömungspotentiale detektiert, welche ausreichend destabilisierend wirken können und langfristig homogene Dispersionen gewährleisten. Im Zusammenhang mit dieser Erkenntnis und im Hinblick auf den Gebrauch von naturbelassenen Inhaltsstoffen in den Rezepturen wäre die Zugabe von Leitungswasser als ausreichend und sinnvoll zu bewerten. Bei der Verwendung von Leitungswasser können jedoch Unterschiede in den gelösten Ionen (Wasserhärtegrad) oder anderen gelösten Substanzen (Metalle) auftreten und somit Störungen des Milieus bzw. Veränderungen in der Charakteristik der Formulierung hervorrufen. Die Zugabe von Reinstwasser unter Anwendung eines Peptisators ist zwar kostenaufwendig, aber vorteilhaft, da die Rezeptur standardisiert wird. Damit würde eine Konstanz der Wasserphase bei Herstellung und ein gleichbleibendes Milieu in der Formulierung gewährleistet werden. Weiterhin kann durch Verwendung von Reinstwasser ein zusätzlicher Schutz vor mikrobiellem Befall und Verderb des Präparates geboten werden. Aufgrund seines breiten Einsatzspektrums in Lebensmitteln wurde als Empfehlung für das NEM die Anwendung des Peptisators Natriumcitrat im Zusammenhang mit dem Einsatz von Reinstwasser gegeben.

5.1.4 Wahl des Emulgierverfahrens

In der Definition des zu entwickelnden NEMs war als wesentliche Charakteristik die Art der Emulsion festgelegt worden. Grundsätzlich sollte eine kolloidale Dispersion in Form einer Miniemulsion erzeugt werden. Damit würde zum einen die Stabilität des NEMs gegenüber physikochemischen Einflüssen bei Lagerung bzw. des Wirkstoffes bei Passieren des Magen-Darm-Traktes gewährleistet werden. Zum anderen sollte eine hohe Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes erreicht werden. Kolloidale Dispersionen sind Emulsionen mit einer definierten Größe ihrer Partikel (Kolloide) in einem Bereich von 1 bis 1.000 nm [199]. Sie bestehen aus einem Medium (gasförmig oder flüssig) in dem die Kolloide als disperse Phase homogen verteilt vorliegen [200]. Die disperse Phase kann dabei im flüssigen, festen oder gasförmigen Zustand bestehen. Mit einem Partikeldurchmesser von 100 nm bis 1.000 nm zählen Miniemulsionen zu den kolloidalen Dispersionen. Um bei der Herstellung einer Miniemulsion gezielt die gewünschte

stabile Partikelgrößenverteilung zu erreichen, können verschiedene Emulgierverfahren angewendet werden. Diese unterteilen sich in mechanische und nicht-mechanische Verfahren. Die nicht-mechanischen Verfahren werden auch als „*low-energy*“ Methoden bezeichnet, da kein bzw. nur ein geringfügiger Energieeintrag in die Emulsionen bei Herstellung erfolgt. Zu ihnen zählen spontanes Emulgieren, sowie die Methoden zur Initiation einer Phasenumkehr [201]. In der industriellen Produktion kommen meist die mechanischen Emulgierverfahren als gängige Techniken zur Anwendung. Hier erfolgt das Emulgieren durch Energieeintrag in den meist synchron ablaufenden Schritten Mischen, Zerkleinern und Stabilisieren [132]. Zu diesen sog. „*high-energy*“ Methoden zählen Ultraschall- und Hochdruckhomogenisierung, Microfluidizer[®] sowie die Anwendung von Rotor-Stator-Systemen [132, 201]. Die Anwendungen von „*low-energy*“ Methoden für die Herstellung des zu konzipierenden NEMs standen nicht zur Verfügung. Bei der Auswahl eines für die gewünschte Rezeptur effektiven Emulgierverfahrens spielte neben der Auswahl der Inhaltsstoffe und Produkteigenschaften die spätere Wirtschaftlichkeit der einzelnen Techniken im Herstellungsprozess eine entscheidende Rolle. Als Emulgierverfahren kamen deshalb Ultraschall und Ultraschall mit anschließender Behandlung im Hochdruckhomogenisator zum Einsatz. Beide Verfahren bieten durch das Einwirken verschiedener mechanischer Kräfte eine Zerkleinerung der Kolloide in der kontinuierlichen Phase. Es können dabei Partikelgrößen von maximal 1,0 µm generiert werden [132]. Der Energieeintrag liegt bei diesen Methoden zwischen 10^8 bis 10^{10} W/kg [202]. Beide Emulgierverfahren sind für die Produktionsvolumina eines NEMs anwendbar. Neben Laborultraschallgeräten gibt es ebenso industrielle einsetzbare Ultraschallreaktoren im entsprechenden Maßstab. Das Emulgieren einer Lösung und Zerkleinern der Tropfen erfolgt bei der Anwendung von Ultraschall über Mikroturbulenzen durch Kavitation [203]. Kavitation bezeichnet das Ausbilden, Wachstum und Aufbrechen von Bläschen in der Dispersion. Ausgelöst wird dies durch auftretende Druckschwankungen induziert beim Einbringen sonographischer Longitudinalwellen [203]. Nach Optimierung der Parameter können die Amplituden und die Betriebszeit der Ultraschallgeräte bei Herstellung einer definierten Miniemulsion konstant gehalten werden. Dabei müssen jedoch stets mögliche Temperaturveränderungen im Volumen der zu verarbeitenden Proben überwacht werden. Hochdruckhomogenisatoren sind Hochdruckpumpen in denen u.a. Scher- und Dehnungskräfte zur Verkleinerung von Tropfen in Emulsionen führen [132]. Zusätzlich tritt ebenso das Phänomen der Kavitation auf. Die Lösung wird während des Emulgierprozesses mit hohem Druck und geringer Geschwindigkeit durch ein sog. Homogenisierventil geleitet. Dabei steigt

die Geschwindigkeit der Lösung stark an und der statische Druck sinkt unter den des Dampfdruckes der eingebrachten Flüssigkeit. Dies führt zur Entstehung von Dampfblasen, die wiederum bis zum Aufbrechen heranwachsen. Nach dem Verlassen des Ventils trifft die beschleunigte Flüssigkeit auf einen Anpralling, was wiederum zur weiteren Zerkleinerung der Partikel führt. Die Anwendung von Hochdruckpumpen ist im Labor- und Produktionsmaßstab bis zu einem Druck von 3.000 bar möglich [132]. Je nach Betriebstyp ergeben sich maximaler Homogenisierdruck und anwendbare Bearbeitungsvolumina. Die Effizienz und Regulierung der gewünschten Partikelgrößen wird über die Anzahl der angewendeten Zyklen und den eingestellten Betriebsdruck gesteuert. Neben der Rezirkulation der Emulsion ist ebenso die Anwendung von Mehrfachhomogenisatoren möglich [132]. Aufgrund der technischen Anforderungen liegen die Investitions- und Betriebskosten von Hochdruckhomogenisatoren höher, als die eines Ultraschallhomogenisators. Hier fallen moderate Aufwendungen bei Anschaffung, sowie hauptsächlich Kosten für Energieaufwand und möglichen Verschleiß von Zubehör wie Sonotroden an [132]. Die Fragestellung hinsichtlich der anzuwendenden Emulgiertechnik bei der Produktion des NEMs lag in erster Linie in der Effektivität des Verfahrens. Beide beschriebenen Emulgierverfahren wurden dazu jeweils an Musterbeispielen für die Prototypen der Miniemulsionen angewendet und die erzielten Partikelgrößen, sowie Lagerstabilitäten verglichen (Tabelle 21). Es konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von Ultraschall und anschließender Hochdruckhomogenisierung zur Entstehung von Miniemulsionen mit einem mittleren Partikeldurchmesser weit unter $1,0 \mu\text{m}$ führten. Die alleinige Verwendung von Ultraschall als Emulgiertechnik ermöglichte ebenfalls die Entstehung von Miniemulsionen. Der mittlere Partikeldurchmesser in der Fraktion D90 lag jedoch teilweise leicht über $1,0 \mu\text{m}$. Unabhängig von der angewandten Emulgiertechnik bei Herstellung konnten mit beiden Verfahren physikalisch stabile Emulsionen erzeugt werden. Auch nach einer Lagerung von 6 Monaten wiesen alle untersuchten Formulierungen fast identische Partikelgrößenverteilungen, wie bei Herstellung auf. Ausnahme bildete die Formulierung, welche Mandelöl als Trägerphase enthielt. Hier wurde für die ultraschall- und hochdruckhomogenisierte Probe ein Anstieg der Partikelgröße beobachtet. Zusätzlich ließen die Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass der Einsatz der mechanischen Emulgiertechniken keinen Einfluss auf die Beständigkeit des jeweiligen eingesetzten Öles hatte. Die Anwendung von Emulgiertechniken stellt für Öle eine mechanische Belastung dar. Insbesondere bei Einsatz von Hochdruckhomogenisierung über mehrere Zyklen kann dies im Einzelfall bis zur Oxidation der Fettsäuren im Öl führen [204]. Die hier gewählten Parameter der Hoch-

druckhomogenisierung waren optimal. Schlußfolgernd wurde für die Herstellung der wirkstoffhaltigen Miniemulsionen das Emulgierverfahren Ultraschall- mit anschließender Hochdruckhomogenisierung als optimale Emulgiertechnik festgelegt. Eine produktionstechnische Umsetzung dieses Emulgierverfahrens war im Geschäftsbetrieb des Projektpartners realisierbar.

5.1.5 Entwicklung von Prototypen (Präemulsionen)

Bis zu diesem Zeitpunkt waren erste wichtige Schritte im Prozess der Produktentstehung getätigt worden (Abbildung 22). Es wurden die Rezepturen für erste Prototypen (Präemulsionen M1-M6, später zusätzlich MO3 bis MO6) entwickelt und konzipiert. Diese wiesen zunächst Basisbestandteile auf und enthielten keine Zusatzstoffe wie Vitamine oder Aromen. Außerdem umfassten sie in der Wasserphase Leitungswasser. Der Wirkstoff lag in diesen Präemulsionen in drei verschiedenen Formen vor: Lutein (M1, M2), Luteinester (M3, M4), Lutein und Luteinester (M5, M6). Als Trägerphase wurde das MCT-Öl verwandt. Die Emulgatorzugabe erfolgte in zwei unterschiedlichen Kompositionen. Die alleinige Verwendung von Tween 80 (M1, M3, M5) bzw. eine Emulgatorkombination aus Tween 80 und Biozate 1 (M2, M4, M6). Die Herstellung der Prototypen dieser Miniemulsionen erfolgte durch Anwendung von Ultraschall mit sich anschließender Hochdruckhomogenisierung (6 Zyklen). Für spätere Untersuchungen über das Projektende hinaus wurden weitere Präemulsionen (MO3 bis MO6) analog den Grundzusammensetzungen der ersten Prototypen M3 bis M6 hergestellt. Angepaßt an den Labormaßstab wurde das Emulgieren bzw. Herstellen der Miniemulsionen in diesem Fall ausschließlich durch Anwenden eines Ultraschallhomogenisators realisiert. Eine Partikelgrößenanalyse nach Herstellung am Zetasizer Nano ZS im IAP bestätigte die Erfüllung der Parameter für eine Miniemulsion. Es wurden mittlere Partikeldurchmesser von $\leq 1,0 \mu\text{m}$ detektiert (Tabelle 22).

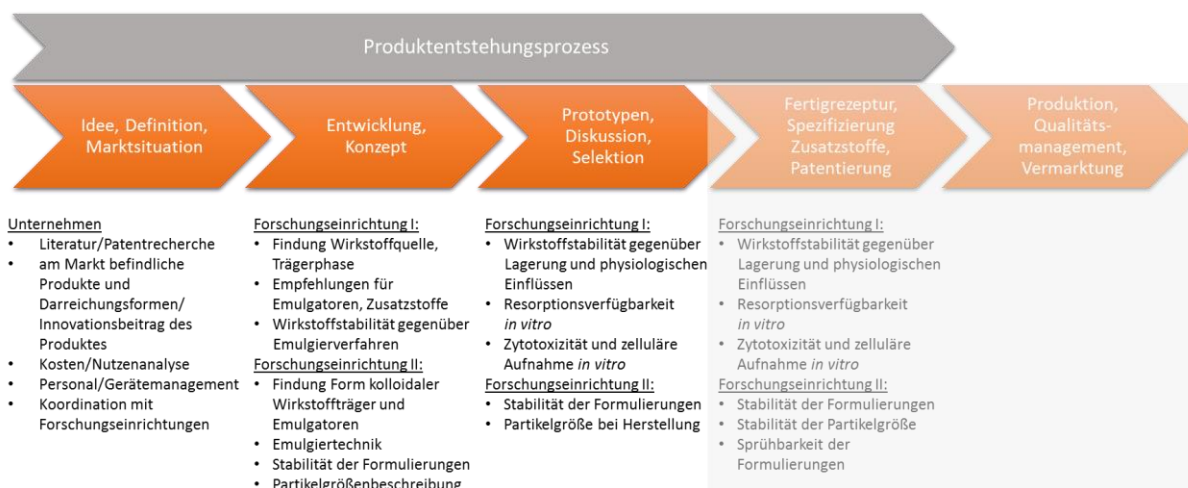


Abbildung 22 Frühe Phasen des Produktentwicklungsprozesses eines kolloidalen Nahrungsergänzungsmittels zur altersgerechten Supplementierung mit dem sekundären Pflanzenstoff Lutein.

5.1.6 Einfluß des Emulgiervfahrens auf die Wiederfindung des Wirkstoffes in Miniemulsionen

Neben den zu erzielenden physikalischen Stabilisierungseffekten der Miniemulsionen und dem Minimieren des Abbaus von Basisbestandteilen in den wirkstoffhaltigen Präemulsionen musste ebenso geprüft werden, ob das gewählte Emulgiervfahren (Ultraschall mit Hochdruckhomogenisieren) einen Einfluss auf die Beständigkeit und Konsistenz von Lutein und Luteinester hat. Dazu wurden die jeweiligen Wirkstoffformen in ausgewählten Präemulsionen vor und nach Anwendung des Emulgiervfahrens qualitativ und quantitativ bestimmt (Tabelle 22). Dabei erwies sich Lutein gegenüber dem angewendeten Emulgiervfahren als stabil. Für die entsprechenden Formulierungen M1 und M2 konnte ein Anstieg an Lutein nach Anwendung der Emulgiertechnik beobachtet werden. Ebenso stabil gegenüber der mechanischen Belastung waren die Luteinester in der Präemulsion mit Tween 80. Gegensätzlich verhielten sich die luteinesterhaltigen Formulierungen mit Tween 80 und Biozate 1. In diesen Dispersionen wurde eine Abnahme des Luteinäquivalents detektiert. Der postulierte Schutz des Wirkstoffes durch die kompensierte Zugabe des Emulgator Biozate 1 konnte in diesem Fall nicht belegt werden [53]. Eine Reduzierung des Luteinäquivalents nach Anwendung der Emulgiertechniken konnte auch für die Präemulsionen mit einer Wirkstoffkombination aus Lutein und Luteineestern (M5, M6) gezeigt werden. Dabei war im Vergleich beider Formulierungen eine geringere Abnahme bei Zugabe von Biozate 1 nachweisbar. Möglicherweise konnte Biozate 1 das Lutein aber nicht Luteinester vor einem durch die mechanische Belastung ausgelösten oxidativen Abbau besser schützen. Einen möglichen weiteren Hinweis dafür könnte auch der höhere Anstieg an Lutein in der Formulierung M2 (mit Biozate 1) im Vergleich zu M1 geben. Einen eindeutigen Beleg konnten

die Daten jedoch nicht liefern. Ebenso konnte die höhere Stabilität von Lutein gegenüber den angewendeten Emulgierv Verfahren nicht eindeutig geklärt werden. Die in Miniemulsion M5 und M6 enthaltenen spezifischen Wirkstoffformen Lutein und Luteinester waren jeweils im gleichen Maße von der quantitativen Herabsetzung betroffen. Der prozentuale Anteil des jeweiligen Wirkstoffes am Gesamtluteinäquivalent blieb in den Formulierungen nach Behandlung annähernd gleich. Eine höhere Stabilität von Lutein oder eine spezifische Schutzfunktion von Biozate 1 gegenüber Lutein konnte nicht bewiesen werden. Unter Berücksichtigung der Untersuchungsergebnisse und in Abstimmung mit dem Projektpartner wurde eine Empfehlung für den Produktionsprozess des zu entwickelnden NEMs gegeben. Ein entstehender Wirkstoffverlust durch Anwendung des Emulgierv Verfahrens sollte bereits im Vorfeld über die Erhöhung der eingebrachten Wirkstoffmenge in der Ölphase ausgeglichen werden. Für weitere Untersuchungen mit den vorhandenen Prototypen der Miniemulsionen wurden stets die Wirkstoffmengen vor Behandlung bzw. Versuchsdurchführung chromatographisch bestimmt und als Kontrolle verwendet. So waren prozentuale Veränderungen im Folgenden nachweisbar.

Tabelle 40 Stabilität von Lutein und Luteinestern gegenüber dem angewendeten Emulgierv Verfahren zur Herstellung von Präemulsionen.

Schematisch gezeigt ist die Veränderung der Menge an Luteinäquivalent nach Anwendung des Emulgierv Verfahrens Ultraschall und Hochdruckhomogenisation bei der Herstellung von Präemulsionen. O/W_M = Öl in Wasser Miniemulsion, + = Wirkstoffzunahme, - = Wirkstoffabnahme.

	Tween 80	Tween 80 + Biozate 1
Lutein in O/W _M	+	+
Luteinester in O/W _M	+	-
Lutein/-ester in O/W _M	-	-

5.2 PHYSIKOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER KONZIPIERTEN PRÄEMULSIONEN UND ENTWICKELTER FERTIGREZEPTUREN *IN VITRO*

5.2.1 Stabilität der Wirkstoffe gegenüber Lagerung

Die Verwendung der veresterten Form von Lutein in einem NEM bietet die Möglichkeit einer langfristigen besseren Stabilität des Wirkstoffes. Luteinester als pflanzliche Speicherformen sind im Gegensatz zum freien Lutein stabiler gegenüber Abbau- und Umbauprozesse durch äußere Einflüsse. Die Esterbildung an den freien Hydroxygruppen ermöglicht u.a. eine Stabilisierung von Lutein gegenüber hohen Temperaturen und UV-Strahlung [205]. Dagegen ist freies Lutein höchst sensibel gegenüber Degradation durch Hitze und Strahlung [206]. Eine Verwendung von Luteinestern kann in einem NEM vorteilhaft sein, um Verluste des Wirkstoffes bei Lagerung gering zu halten oder sogar zu vermeiden. Eine hohe Stabilität von Luteinestern aus Oleoresin in MCT-Öl (60 mg/mL) über einen Lagerzeitraum von 6 Monaten konnte in den durchgeführten Untersuchungen zur Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen (RT, 4°C, -20°C) bestätigt werden (Tabelle 24). Die Entstehung von freiem Lutein durch mögliche Umbauvorgänge (hydrolytische Spaltung von Luteinestern) konnte nicht festgestellt werden. Eine Erklärung für die Beobachtung einer leichten Zunahme der Wirkstoffmenge in den gelagerten Proben kann in der inhomogenen Verteilung der Luteinester im Oleoresin gegeben werden. Die Entstehung von geringen Mengen an Luteinestern aus in Lösung befindlichen nicht nachweisbaren Mengen an Lutein ist unwahrscheinlich. Hierzu müsste eine spontane Esterbildung zwischen freiem Lutein und denen im Öl befindlichen mittelkettigen Fettsäuren stattgefunden haben. Eine sog. Luteinveresterung *in vitro* konnte bisher jedoch nur bei Temperaturen über 30°C beobachtet werden [207]. Abschließend wurde aufgrund der vorliegenden Ergebnisse und der Effektivität, die Lagerung der Präparate bei 4°C empfohlen. Im Weiteren wurden fortlaufend die Wirkstoffstabilitäten in den Präemulsion M1 bis M6 erfasst. In diesen Formulierungen lagen drei verschiedene Wirkstoffkombinationen (Lutein, Luteinester oder Lutein + Luteinester) vor. Somit konnte zum einen die Lagerstabilität der jeweiligen spezifischen Wirkstoffform geprüft werden. Zum anderen war es möglich stabilisierende Effekte oder Wechselwirkungen in Abhängigkeit weiterer Zusatzstoffe in den Formulierungen zu erfassen. Entscheidend wurden dabei der Messzeitpunkte nach Herstellung sowie nach 6 Monaten Lagerung bei 4°C im Dunkeln festgelegt (Tabelle 25). Es bestätigte sich auch hier eine hohe Stabilität der Luteinester in den entsprechenden Formulierungen M3 und M4. Weiterhin konnte eine

protektive Wirkung von Biozate 1 gegenüber dem jeweiligen Wirkstoff bei Vergleich der Präemulsionen M1 und M2 (Lutein) bzw. M3 und M4 (Luteinester) belegt werden. Dieser stabilisierende Effekt traf nicht für die Formulierung M6 mit der Wirkstoffkombinationen Lutein und Luteinester zu. Ebenso war in den Präemulsionen M5 und M6 keine höhere Stabilität der Luteinester im Vergleich zum dort ebenso eingebrachten Lutein nachweisbar. Für beide integrierten Wirkstoffe konnte ein annähernd einheitlicher Abbau bzw. Verlust detektiert werden. Dieser lag für Lutein im gleichen Rahmen der Abnahme, wie bei den Präemulsionen M1 und M2. Die bei M5 und M6 beobachtete Abnahme der Wirkstoffmenge der Luteinester war nicht erklärbar. Eine Senkung der Menge an Luteinester aufgrund von Hydrolyse zu Gunsten des freien Luteins war nicht zu erwarten. Die Verseifung von Estern zur freien Form bedarf der Anwendung entsprechender Lösemitteln (alkoholische Laugen), um eine Hydrolyse zu induzieren. Diese Bedingungen waren hier nicht gegeben. Ebenso kann eine enzymatische Hydrolyse ausgeschlossen werden. Die Erkenntnisse zeigen somit, dass die Verwendung einer Wirkstoffkombination in einem NEM nicht vorteilhaft im Hinblick auf die langfristige Stabilisierung der Wirkstoffe ist. Vielmehr wurde aufgrund von Kosteneffizienz und im Zusammenhang mit den Ergebnissen zur Lagerstabilität die Verwendung von Oleoresin als Wirkstoffträger im NEM empfohlen.

Tabelle 41 Stabilität von Lutein und Luteinestern bei Lagerung.

Schematisch gezeigt ist die Veränderung der Menge an Luteinäquivalent nach Lagerung der Präemulsionen für 6 Monate bei 4°C im Dunkeln. O/W_M = Öl in Wasser Miniemulsion, + = Wirkstoffzunahme, - = Wirkstoffabnahme.

	Tween 80	Tween 80 + Biozate 1
Lutein in O/W _M	-	-
Luteinester in O/W _M	-	+
Lutein/-ester in O/W _M	-	-

5.2.2 Effekte von Ultraschall, Temperatur und pH-Milieu auf die Stabilität der Wirkstoffe in MCT-Öl und Präemulsionen

Die Charakterisierung von wirkstoffhaltigen Formulierungen betreffend verschiedener physikochemischer Parameter war erforderlich, um die Eigenschaften der Substanzen gegenüber äußeren Einflüssen, aber auch physiologischen Bedingungen definieren zu können. Die physikochemische Charakterisierung von Luteinestern wurde bisher nicht publiziert bzw. ausreichend belegt. Weiterhin bestand die Notwendigkeit stabilisierende oder auch degradierende Effekte auf die zur Auswahl stehenden Wirkstoffe (Zusatzstoffe, Behandlungsverfahren) aufzuzeigen. In diesem Zusammenhang wurden Oleoresin 60 mg/mL sowie verschiedene Präemulsionen auf die kurz- und langfristige Stabilität der jeweiligen Wirkstoffe

- gegenüber Ultraschall_(80 Watt) - *mechanisch* (Tabelle 26)
- physiologischer Körpertemperatur_(37°C) - *thermisch* (Tabelle 27, Abbildung 12)
- *sauren*_(pH 1,0 ± 0,2) und *basischen*_(pH 9,0 ± 0,2) Bedingungen (Abbildung 13)

untersucht. Zusammenfassend sind die Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen in der Tabelle 42 dargestellt.

Tabelle 42 Veränderungen der Wirkstoffe Lutein und Luteinester nach kurz- und langfristiger Exposition gegenüber physikochemischen Größen.

Untersucht wurden die Wirkstoffveränderungen in Gegenwart einer spezifischen physikochemischen Größe: mechanisch = Ultraschall (Nenngröße 80 Watt), thermisch = Temperatur von 37°C, sauer = pH 1,0 ± 0,2, basisch = pH 9,0 ± 0,2. Die Inkubation der Proben erfolgte für die jeweils angegebene Zeit im Dunkeln. Als Kontrolle diente eine unbehandelte bzw. unter neutralen Bedingungen inkubierte Probe. O/W_{M1} = Öl in Wasser Mini-emulsion mit Tween 80, O/W_{M2} = Öl in Wasser Mini-emulsion mit Tween 80 und Biozate 1, + = Wirkstoffzunahme, - = Wirkstoffabnahme, ≈ = Wirkstoffveränderung ≤ 0,5 %, n.b. = nicht bestimmt.

	mechanisch		thermisch		sauer		basisch	
	5 min	60 min	30 min	2 h	30 min	2 h	30 min	2 h
Lutein in O/W _{M1}	+	-	-	n.b.	+	n.b.	+	n.b.
Lutein in O/W _{M2}	+	≈	+	n.b.	+	n.b.	+	n.b.
Luteinester in Öl	+	≈	+	≈	+	+	-	+
Luteinester in O/W _{M1}	≈	-	+	-	+	+	+	-
Luteinester in O/W _{M2}	-	-	+	-	+	≈	+	-
Lutein/-ester in O/W _{M1}	n.b.	n.b.	n.b.	-	n.b.	+	n.b.	-
Lutein/-ester in O/W _{M2}	n.b.	n.b.	n.b.	-	n.b.	-	n.b.	-

Die Resultate aus den physikochemischen Untersuchungen zeigten, dass fast alle verwendeten Wirkstoffe in der jeweiligen Formulierung stabil gegenüber einer kurzfristigen Behandlung mit Ultraschall, physiologischer Temperatur von 37°C sowie bei sauren oder basischen Umgebungsbedingungen sind. Abweichend verhielt sich im Hinblick auf die Inkubation mit Ultraschall die Miniemulsion M4 (Luteinester in O/W_M + Biozate 1). In diesem Fall war eine nicht-signifikante Minderung der Wirkstoffmenge zu beobachten. Bekannt ist, dass Lutein in pflanzlichen Lebensmittel sehr stabil gegenüber mechanischer Belastung ist. So konnten Sánchez-Moreno et al. (2003) zeigen, dass bei Anwendung von Hochdruckhomogenisierung kein Abbau von Carotinoiden wie z.B. Lutein stattfindet. Vielmehr wurde eine sehr viel höhere Menge dieser Stoffe im Orangensaft detektiert, als bei Analyse des unbehandelten, frischen Saftes [208]. Eine Erklärung dafür liegt in der besseren Extrahierbarkeit der Carotinoide aus dem Wirkstoffträger. Durch die mechanische Belastung werden pflanzliche Zellstrukturen zerstört [209]. Dies kann wiederum zur Freisetzung sekundärer Pflanzenstoffe führen. Eine mindestens ähnliche Stabilität gegenüber mechanischer Einwirkungen war auch für Luteinestern angenommen worden. Möglicherweise führte im Fall der Miniemulsion M4 eine unzureichende Lösung der Luteinester aus der Probenmatrix bei Aufbereitung und Analyse zur Verfälschung der eigentlichen vorhandenen Wirkstoffmenge. Luteinester sind in den spezifischen Formulierungen in dem Wirkstoffträger Oleoresin eingebunden. Dabei handelt es um ein Lösemittelextrakt aus den Blütenblättern der Studentenblume (*Tagetes erecta*). Die Luteinester befinden sich in den Pflanzenzellen der Blütenblätter. Ein unvollständiger Aufschluss der Zellen bei der Extraktion begründet die ungleichmäßige Verteilung der Luteinester im Naturprodukt Oleoresin. Diese unzureichende Homogenität hätte ebenso Einfluss auf die Inkubation und Wiederfindung innerhalb der durchgeführten Untersuchungen. Einen real degradierenden Einfluss durch die mechanische Belastung mittels Ultraschall lässt sich hier ausschließen.

Ein konträres Verhalten hinsichtlich der Wirkstoffstabilität im Vergleich zu den anderen untersuchten Formulierungen konnte in der Formulierung M1 (Lutein in O/W_{M1}) bei kurzfristiger thermischer Inkubation (37°C) gezeigt werden. Hier wurde eine hochsignifikante Abnahme der Wirkstoffmenge detektiert, während dies in allen anderen Formulierungen nicht zu beobachten war. Grundsätzlich ist Lutein sehr labil gegenüber erhöhten Temperaturen [205]. Dahingegen weisen Luteinester eine hohe Thermostabilität auf [207]. Eine Abnahme der Menge an Luteinäquivalent in den Präemulsionen mit dem Wirkstoff Lutein war durchaus zu erwarten. So zeigten Ahmad et al. (2013), dass Lutein bereits bei Temperaturen $\leq 40^{\circ}\text{C}$ minimal abgebaut

wird, wohingegen Luteinester bis zu einer Temperatur von 60°C stabil sind [207]. Publikationen anderer Autoren bestätigen die Instabilität von Lutein bei höheren Temperaturen [142, 205]. In diesem Zusammenhang werden verschiedene Möglichkeiten für den Abbau von Lutein diskutiert. Der Einfluss von oxidativen Prozessen mit Temperaturanstieg spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Aufgrund seiner ungesättigten Molekülstruktur ist Lutein höchst anfällig gegenüber oxidativer Degradation [205]. Entsprechende oxidative Abbauprodukte wie z.B. 3'-Epilutein konnten bereits *in vivo* detektiert werden [210]. Untersuchungen von Aparicio-Ruz et al. (2011) zur thermischen Stabilität von Carotinoiden in nativem Olivenöl deuteten wiederum darauf hin, dass der Abbau von Lutein über Isomerisierungsreaktionen und dem anschließenden Zerfall der Produkte stattfindet [211]. Weiterhin ist neben dem Abbau von Lutein gleichermaßen eine spontane Veresterung des freien Luteins bei hoher Temperaturzufuhr möglich, setzt aber die Anwesenheit entsprechender freier Fettsäuren voraus [212]. Die Reaktion der Esterbildung wird vermutlich über die Anwesenheit spezifischer Triacylglycerol Lipasen katalysiert [213]. In den vorliegenden physikochemischen Untersuchungen zur Temperaturstabilität der Formulierung M1 hat der Abbau von Lutein durch oxidative Prozesse und womöglich über Isomerisierungsreaktionen stattgefunden. Eine Minderung der Luteinmenge als Folge einer Veresterung kann ausgeschlossen werden. Die Entstehung von Luteinestern nach moderater thermischer Behandlung von M1 war analytisch nicht nachweisbar. Ebenso waren weder die enzymatischen Voraussetzungen gegeben, noch die notwendigen freien Fettsäuren in der Ölphase vorhanden, welche eine Veresterung von freiem Lutein vorangetrieben hätten. Die Kontinuität der Menge an freiem Lutein auch nach thermischer Behandlung in der analogen Miniemulsion M2 kann auf das antioxidative und damit stabilisierende Potential des vorhandenen Molkenproteinhydrolysat Biozate 1 zurückgeführt werden. Molkenproteinhydrolysate sind zum einen in der Lage als Radikalfänger zu agieren [214], andererseits sind sie befähigt prooxidative Substanzen zu binden [215]. Ein Schutz des in M2 vorhandenen freien Luteins vor oxidativer Degradierung war somit gegeben. Die in vorangegangenen Untersuchungen dokumentierte erhöhte Thermostabilität von Lutein bei Anwesenheit verschiedener Molkenproteine [53] konnte hier klar bestätigt werden. Es ist außerdem bekannt das Hydrolysat von Molkenproteinen eine verstärkte antioxidative Reaktivität aufweisen [214]. So können die in den hydrolytisch modifizierten Molkenproteinen vorhanden hydrophobe Aminosäurereste wie Methionin und Tyrosin Radikale aus der wässrigen Phase von O/W Emulsionen abfangen und damit antioxidative Effekte hervorrufen [214].

Vollkommen unberührt von Wirkstoffverlusten blieben die Formulierungen nach kurzfristiger Inkubation unter sauren Bedingungen ($\text{pH } 1,0 \pm 0,2$). Lutein und Luteinester sind demnach kurzfristig stabil gegenüber saurem Milieu. In basischer Umgebung wurde nur in der luteinesterhaltigen Ölphase (Luteinester in Öl) eine Abnahme der Luteinäquivalentmenge nachgewiesen. Ein Abbau von Lutein bzw. der Luteinester in den Präemulsionen fand nicht statt. Die Wirkstoffe waren stabil. Dies lässt den Schluss zu, dass die Integration des Wirkstoffes in eine O/W Emulsion kurzfristig einen Schutz vor Degradierungen im basischen Milieu bietet. Eine uneingeschränkte Stabilität von Lutein in einer Emulsion gegenüber pH-Werten im Bereich von zwei bis sieben konnten bereits Davidov-Pardo et al. (2016) dokumentieren. Ausschließlich bei einem pH-Wert von acht konnte eine geringfügige Abnahme des Luteins beobachtet werden [142].

Bei langfristiger Behandlung der Wirkstoffe mit den identischen physikochemischen Verfahren konnte in fast allen Präemulsionen eine moderate Wirkstoffabnahme beobachtet werden. Ausschließlich in der reinen Ölphase mit Luteinester wurde gegenüber den gewählten Expositionbedingungen kein Abbau des Wirkstoffes detektiert. Dies bestätigt die hohe Stabilität von Luteinestern gegenüber mechanischer und thermischer Belastung sowie im sauren und alkalischen Milieu über einen längeren Zeitraum. Markant hohe Wirkstoffverluste waren in allen Präemulsionen bei der Behandlung unter basischen Bedingungen zu beobachten (Abbildung 13). Ein Abbau von Lutein bei einem pH-Wert von acht konnte bereits gezeigt werden [142]. Inwiefern dies als physiologisch relevant einzuordnen ist, bleibt fraglich. Dass Lutein oder auch Luteinester langfristig basischen Bedingungen in diesem hohen Maße ausgesetzt sind, ist eher unwahrscheinlich. Die Relevanz dieser Instabilität kann einer geringeren Bedeutung zugeordnet werden. Es kann jedoch definiert werden, dass Lutein und Luteinester in Emulsionen gegenüber stark basischen Bedingungen instabil sind. Eine stabilisierende oder schützende Wirkung durch das Einbringen des Wirkstoffes in eine Emulsion ist nicht gegeben. Die Abnahme der Wirkstoffe in den Präemulsionen unter sauren Bedingungen war dagegen nur geringfügig. Für die Präemulsionen ohne Biozate 1 (MO3, MO5) konnte sogar ein Anstieg der Wirkstoffmenge detektiert werden. Es ist davon auszugehen, dass Lutein und Luteinester gegenüber sauren Umgebungsbedingungen stabil sind. Eine moderate Abnahme der Wirkstoffmengen war bei der langfristigen mechanischen und thermischen Behandlung der Präemulsionen zu beobachten. Grundsätzlich ist der Abbau von Lutein und Luteinester als sehr gering einzuschätzen. Die Wirkstoffe können als langfristig stabil gegenüber diesen physikochemischen Expositionen bewertet werden. Auffallend war hier das Fehlen eines weiteren Stabilisierungseffektes


der Wirkstoffe durch die Zugabe von Biozate 1. Demnach hat das Molkenproteinhydrolysat langfristig keinen zusätzlichen protektiven Einfluss auf die Wirkstoffmenge in einer Miniemulsion gegenüber mechanischer bzw. thermischer Belastung. Möglicherweise ist es als Peptidgemisch hier selbst Abbauvorgängen unterworfen und steht demnach nur limitiert zur Verfügung. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass insbesondere Luteinester kurzfristig stabil gegenüber den angewendeten mechanischen, thermischen, sauren und basischen Bedingungen sind. Weiterhin wird eine verbesserte Stabilität der Wirkstoffe durch Integration in einer Miniemulsion erreicht. Die Zugabe von Biozate 1 ist dabei als positiv unterstützend zu bewerten. Langfristig unterliegen die in die Miniemulsionen eingebrachten Wirkstoffe moderaten Abbauvorgängen. Wogegen die Luteinester in reiner Ölphase gegenüber allen physikochemischen Anforderungen langfristig stabil waren. Eine markante Wirkstoffabnahme in den Präemulsionen bei Inkubation im basischen Milieu konnte beobachtet werden. Eine physiologische Relevanz insbesondere hinsichtlich Bioverfügbarkeitsstudien wurde dem nicht zugeordnet. Tatsächlich war jedoch die Berücksichtigung im Rahmen der Rezepturentwicklung des NEMs von Bedeutung. So sollte die Zugabe von z.B. Ascorbinsäure in Betracht gezogen werden, um die Einstellung eines pH-Wertes im NEM im leicht sauren Milieu zu gewährleisten. Außerdem wurde die technische Kontrolle des pH-Wertes von Fertigrezepturen bei Herstellung und Lagerung empfohlen. Wirkstoffverluste durch möglicherweise auftretende basische Bedingungen im NEM sollten damit vermieden bzw. ausgeschlossen werden.

5.2.3 Fortschreiten des Entstehungsprozesses: Entwurf der Fertigrezepturen mit Zugabe weiterer Inhaltstoffe

Mit dem Hintergrund der bis dahin gewonnenen Daten der physikalischen und physikochemischen Untersuchungen erster Formulierungen und Prototypen (Präemulsionen) erfolgte die selektive Aufstellung von sechs verschiedenen Fertigrezepturen mit Luteinestern (Abbildung 23). Die Rezepturen enthielten in der Ölphase den Wirkstoffträger Oleoresin sowie α -Tocopherol. Für die Herstellung der Ölphase wurden vergleichend zwei verschiedene Öle in den Ansätzen genutzt. Zum einen kam das bereits in den Prototypen verwendete MCT-Öl zur Anwendung. Neben seiner nachgewiesenen sehr guten stabilisierenden Wirkung auf die Partikelgrößenverteilung in den Miniemulsionen bietet es wie bereits beschrieben physiologische Vorteile. Die schnelle und effektive Resorbierbarkeit der mittelkettigen Triacylglyceride selbst ist bekannt, weshalb ein Einsatz von MCT-Ölen insbesondere in der parenteralen Ernährung bevorzugt

wird [192]. Im Kontext mit der Entwicklung eines NEMs für alternde Menschen mit eingeschränkter Stoffwechselaktivität bietet sich hier ein vorteilhafter Ansatz. In Applikation als Spray kann weiterhin die sublinguale Aufnahme des Wirkstoffes und direkte Weiterleitung in den Blutkreislauf gefördert werden. Ebenso wurde bereits der Zusammenhang einer höheren Bioverfügbarkeit von lipophilen Substanzen wie Lutein nach Einbindung in MCT-Öl beschrieben [196]. Als alternatives Öl wurde Rapsöl in der Ölphase angewendet. Gegensätzlich dem MCT-Öl enthält Rapsöl einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Tabelle 39). Dabei sind hohe Anteile der essentiellen Fettsäuren Linolsäure und α -Linolensäure im Rapsöl vertreten, aus denen wiederum im humanen Stoffwechsel limitiert die Synthese der Docosahexaensäure (DHA) stattfinden kann. Als struktureller Bestandteil von Phospholipiden in Zellmembranen ist DHA auch in den Diskmembranen der Aussensegmente in den Photorezeptorzellen nachweisbar [216]. Dort gewährleistet DHA u.a. die für eine effektive Phototransduktion notwendige Membranintegrität [216]. Weiterhin fungiert DHA in der Retina als Vorstufe für den antiinflammatorischen Mediator Neuroprotectin D1 (ND1) [217]. ND1 inhibiert stressinduzierte zelluläre Prozesse in der Retina und wirkt somit dem Untergang von Photorezeptorzellen entgegen. Die Supplementierung einer Formulierung aus Lutein, Zeaxanthin, EPA und DHA zeigte in der LUTEGA-Studie eine positive Assoziation mit dem Anstieg der Makulapigmentdichte (MPOD). Dies kann wiederum zur Stabilisierung des retinalen Gewebes bei AMD-Patienten beitragen [8]. Die Verwendung von Rapsöl in der Ölphase hatte durch die Bereitstellung essentieller Fettsäuren zur Synthese von DHA einen weiteren positiven Effekt des zu konzipierenden NEMs für die Augengesundheit. Ebenso gibt es eine Vielzahl von Studien, in denen die ernährungsphysiologische Relevanz von Rapsöl dokumentiert wurde [218]. So zeigten Kruse et al. (2014) in einer Humanstudie einen vorteilhaften Effekt auf den Serumlipidspiegel und postprandiale Entzündungsereignisse im humane adipösen Gewebe bei täglicher Gabe einer definierten Menge Rapsöl. Die analoge Gabe von Olivenöl löste diese Effekte nicht aus [219].

Basis Fertigrezepturen	Variationen Fertigrezepturen				
		MCT-Öl	Rapsöl	Tween 80	Biozate 1
Ölphase: Oleoresin α -Tocopherol	122	x		x	
	123		x	x	
Wasserphase: Kaliumsorbat Vitamin C Orangenaroma Xylitol Reinstwasser/Natriumcitrat	124	x		x	x
	125		x	x	x
	126	x			x
	127		x		x



Emulgierverfahren:
Ultraschallhomogenisator
5 min bei 200 Watt auf
Eiswasser

Hochdruckhomogenisator
710 bar, 6 Zyklen

Abbildung 23 Zusammensetzung der Fertigrezepturen 122 bis 127.

Dargestellt sind die Basiszusammensetzungen der Öl- und Wasserphasen sowie Variationen hinsichtlich der Öle und Emulgatoren. Alle Fertigrezepturen wurden unter Verwendung des gleichen Emulgierverfahrens hergestellt. Die Fertigrezeptur 126 und 127 waren bereits nach Herstellung inhomogen. Nach 2 Monaten Lagerung wiesen sie eine zähe Konsistenz auf. Die Formulierungen wurden nicht weiter für Untersuchungen verwendet.

Die Wasserphase der Fertigrezepturen enthielt neben Reinstwasser und Natriumcitrat, die jeweiligen Emulgatoren Tween 80 oder Tween 80 und Biozate 1. Die Formulierungen wurden in der wässrigen Phase um Kaliumsorbat, Ascorbinsäure (Vitamin C), Orangenaroma und Xylitol erweitert. Kaliumsorbat ist als Lebensmittelzusatzstoff E202 zugelassen und wird zur Stabilisierung gegenüber mikrobiologischem Befall in Lebensmitteln eingesetzt [220]. Die anwendbare Menge wird dabei u.a. durch den von der EFSA vorgelegten ADI (*acceptable daily intake*) reguliert. Dabei werden die Sorbinsäure (E200) und ihr Salz Kaliumsorbat als Gruppe zusammengefasst. Der Gruppen-ADI wurde von der EFSA im Jahr 2015 mit 3 mg/kg KG/d angegeben [221]. In einer Re-Evaluierung im Jahr 2019 erfolgte eine Erhöhung auf 11 mg/kg KG/d [222]. Mit der Zugabe von Ascorbinsäure in den Fertigrezepturen bot sich unterstützend das antioxidative und konservierende Potential dieser Substanz. Zusätzlich war die Rezeptur so vor mikrobiellem Verderb geschützt. Außerdem konnte gleichzeitig ein ernährungsphysiologischer Effekt durch die Verwendung der Ascorbinsäure bereitgestellt werden. Ebenso wie Kaliumsorbat handelt es sich um einen Lebensmittelzusatzstoff (E300). In der aktuellen wissenschaftlichen EFSA-Bewertung von Ascorbinsäure als Lebensmittelzusatzstoff (2015) sind die Anwendung in Lebensmitteln, der Verbleib im humanen Metabolismus und toxische Effekte von Ascorbinsäure beleuchtet worden [223]. Das ANS Panel (*EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food*) kommt zu dem Fazit, dass diesbezüglich keine Bedenklichkeiten für Ascorbinsäure und seine Salze vorliegen. Die Festlegung eines ADI erfolgte nicht [223]. Ein Novum in den Fertigrezepturen war die Zugabe von Xylitol (E967) als

Zuckeraustauschstoff. Xylitol ist ein Zuckeralkohol, der durch ein aufwendiges Extraktionsverfahren aus Holz wie z.B. der Birke gewonnen werden kann. Auch in einigen Früchten und Gemüse wie Erdbeeren oder Blumenkohl ist Xylitol zu finden [224]. Die Metabolisierung von Zuckeralkoholen, wie Xylitol führt im menschlichen Organismus nicht zu einer Insulinsekretion, wie bei Glukoseaufnahme [225, 226]. Weiterhin begünstigt Xylitol die Zahngesundheit. Bei oraler Aufnahme wird über die Anregung des Speichelflusses die Zahnmineralisierung stimuliert [227]. Ebenso ist bekannt, dass Xylitol das Wachstum des zahnrelevanten Bakteriums *Streptococcus mutans* hemmt [228, 229]. Grundsätzlich sind keine physiologisch nachteiligen Wirkungen von Xylitol bekannt. Gleichmaßen gibt es keine Höchstmengen für den Einsatz in Lebensmitteln. Bekannt ist die abführende Wirkung bei übermäßigem Verzehr von Xylitol, gleichmaßen wie bei anderen Zuckeralkoholen [230]. Es besteht deshalb eine Kennzeichnungspflicht auf Produkten, in denen mehr als 10% Zuckeralkohole (Summe) enthalten sind [231]. Xylitol verwendet in einem Mundspray konnte durch seine Süße die sensorische Akzeptanz des NEM erhöhen und gleichzeitig einen Schutz für die Zahngesundheit bieten. Die Verwendung von Orangenaroma in den Fertigrezepturen lag in der Entscheidung und sensorischen Prüfung des Projektpartners. Das feine, zitrusartige Aroma konnte den ungewöhnlichen Geruch des Oleoresins im Produkt überdecken. Sensorisch verursachte Einschränkungen in der Akzeptanz des NEMs wurden damit minimiert. Eine repräsentative, sensorische Prüfung erfolgte nicht.

5.2.4 Langfristiger Effekt der Lagerung auf die Wirkstoffstabilität in den Fertigrezepturen

Die Stabilität der Wirkstoffform Luteinester aus Oleoresin gegenüber unterschiedlichen äußeren Einflüssen und auch über einen bestimmten Lagerzeitraum konnte in den vorhergehenden Untersuchungen an den Präemulsionen (Prototypen) belegt werden. Unter Bezugnahme dazu, wurden die entwickelten Fertigrezepturen ausschließlich hinsichtlich der Effekte einer Langzeitlagerung (12 Monate) auf Wirkstoffkontinuität bzw. -umbau überprüft. Es bestand dabei der Anspruch an den Wirkstoff im NEM, dass mit Ablauf eines Jahres mindestens 60% der eingebrachten Wirkstoffmenge nachweisbar vorliegen sollten. Weiterhin sollte die Partikelgrößenverteilung in Anlehnung an die Eigenschaften einer Miniemulsion über diesen Zeitraum konstant bleiben. Die Fertigrezepturen 126 und 127, welche als Emulgator ausschließlich das Molkenproteinhydrolysat Biozate 1 enthielten, mussten frühzeitig aus dem Entwicklungsprozess ausgeschlossen werden. Bereits mit Herstellung waren die Formulierungen inhomogen und leicht zähflüssig. Eine Überprüfung der Partikelgrößenverteilung war nicht möglich. Auch die

Wirkstoffanalyse musste innerhalb der ersten beiden Monate nach Herstellung abgebrochen werden. Die Textur der Lösungen ließ keine reproduzierbare Probenentnahme mehr zu. Die Rezepturzusammensetzung führte zu Ausfällungen und einer pastösen Formulierung. Ein Einsatz als Mundspray wäre allein wegen der fehlenden Versprühbarkeit nicht möglich gewesen. Die Anordnung der Inhaltsstoffe mit alleiniger Zugabe des Emulgators Biozate 1 stellte nicht die zweckmäßige Rezeptur für ein NEM in Form einer wirkstoffhaltigen Miniemulsion dar.

Analog den Untersuchungen der Lagerstabilität der Fertigrezepturen wurde im gleichen Rahmen die Wirkstoffstabilität von freiem Lutein in einem kommerziell erwerblichen NEM untersucht und Unterschiede des Wirkstoffverhaltens zu den konzipierten Fertigrezepturen verglichen. Bei dem kommerziellen Produkt handelte es sich um das Mundspray New Focus™ (Good Health Naturally, UK) mit einer deklarierten Luteinextraktmenge von 10 mg/mL. Abweichend von den Fertigrezepturen wurde die Langzeitlagerung für dieses Produkt im zeitlichen Verlauf von zehn Monaten durchgeführt. Bereits nach Öffnung betrug die detektierte Menge an Lutein im Produkt nur ca. 5%, der auf der Verpackung deklarierten Menge. Eine Kennzeichnung über das Herstellungsdatum lag nicht vor. Das eingebrachte freie Lutein schien demnach in der Applikation als hoch instabil. Weiterhin war das Lutein auf der Verpackung als Luteinextrakt gekennzeichnet. Es ist also nicht klar als reines Lutein definiert worden, gleichwohl die qualitative Analyse nur den Nachweis von freiem Lutein im Produkt dokumentierte. Nach 6 Monaten Lagerung nahm die Menge des Wirkstoffes Lutein um weitere 50% ab, blieb darauf jedoch bis zum Abschluss der Untersuchung konstant. Der detektierte pH-Wert der Formulierung lag im sauren Bereich und blieb über den gesamten Lagerzeitraum unverändert. Die Fertigrezepturen konnten ebenfalls während des gesamten Untersuchungsabschnittes einen beständigen pH-Wert im sauren Bereich aufweisen. Bei diesem pH-Wert sind Lutein und Luteinester stabil. Wirkstoffveränderungen waren somit nicht auf den Einfluss oder Schwankungen des pH-Milieus zurückzuführen. Nach sechsmonatiger Lagerung konnte in den Fertigrezepturen 122 bis 125 keine Abnahme der Luteinester ermittelt werden. Vielmehr war eine Zunahme zu beobachten. Eine Wirkstoffabnahme wurde in allen Formulierungen nach 12 Monaten Lagerung detektiert. Dabei war die Abnahme mit fast 31% in der Fertigrezeptur 124 (MCT-Öl mit Biozate 1) am höchsten. Ein präziser und eindeutiger Zusammenhang zwischen Wirkstoffsenkung und Zusammensetzung der jeweiligen Fertigrezeptur war aufgrund der heterogenen Verteilung der Resultate nicht klar definierbar. Ein einheitlicher Beleg für einen stabilisierenderen Einfluss auf den Wirkstoff oder zusätzlichen Nutzen bei Verwendung von MCT-Öl bzw. Rapsöl konnte nicht gegeben werden. Auch ein positiver Effekt auf die

Wirkstoffkontinuität durch Zugabe von Biozate 1 konnte hier nicht gezeigt werden. Der angestrebte Erhalt der Wirkstoffmenge nach 12 Monaten Lagerung von mindestens 60% konnte jedoch in allen vier Fertigrezepturen 122, 123, 124 und 125 nachgewiesen werden. Im Vergleich zum freien Lutein in dem Produkt NFS waren die in die Fertigrezepturen eingebrachten Luteinester auch langfristig sehr viel stabiler. Die mangelnde Wiederfindung bzw. bereits kurzfristige markante Reduzierung des Luteins im NFS ist auf dessen hohe Anfälligkeit gegenüber Oxidationsvorgängen zurückzuführen. Die zum Produkt NFS zugegebenen Inhaltsstoffe konnten das sensible Lutein in der vorliegenden Formulierung und Applikation nicht ausreichend stabilisieren. Dagegen zeigten die Untersuchungen zur langfristigen Stabilität von Luteinestern in den Fertigrezepturen, dass eine Aufrechterhaltung dieses Wirkstoffes von mindestens 60% im NEM gewährleistet wird. Demnach scheinen Luteinester hinsichtlich der Bereitstellung einer definierten Menge an Wirkstoff auch über einen längeren Zeitraum sehr gut geeignet. Die eingebrachten Zusatzstoffe hatten keinen destabilisierenden oder degradierenden Effekt auf den Wirkstoff und die physikalische Stabilität der Miniemulsionen. Mit den Fertigrezepturen 122, 123, 124 und 125 wurden vier grundlegende Konzepte lagerstabiler Formulierungen für das Endprodukt bereitgestellt.

5.3 CHARAKTERISIERUNG DER RESORPTIONSVERFÜGBARKEIT VON LUTEIN- UND LUTEINESTERHALTIGEN FORMULIERUNGEN *IN VITRO*

Die Aufnahme und Metabolisierung von Lutein ist bereits weitreichend untersucht und beschrieben worden [62, 82, 232]. Auch der Verbleib von Luteinestern während der Passage des Magen-Darm-Traktes wurde in einigen Publikationen aufgegriffen [67, 100, 101, 171], ist aber nicht vollständig aufgeklärt. In humanen Geweben und Flüssigkeiten wurde bis heute ausschließlich freies Lutein nachgewiesen. Einzig Granada et al. (1998) konnten bisher als Folge der Supplementierung von Luteinestern Spuren von Luteinmonopalmitat im humanen Serum detektieren [233]. Grundlegend wird vermutet, dass Luteinester in den oberen Dünndarm gelangen und dort zunächst enzymatisch hydrolysiert werden müssen, um dann in Form von freiem Lutein in die Micellen eingebaut zu werden. Der Einbau in die Micellen wiederum ermöglicht die Aufnahme des Luteins mittels passiver Diffusion u.a. über den Transporter SR-B1 in den Enterocyten [69, 70, 82]. Dort wird Lutein in Chylomikronen verpackt, über das Lymphsystem in die Blutbahn sowie zu den Zielgeweben geleitet bzw. später bedingt in den hepatischen Lipoprotein-Kreislauf überführt.

Mit dem Austausch von Lutein im NEM durch die Wirkstoffform Luteinester wurde die Möglichkeit geboten kostengünstig, nahezu unbegrenzt die stabile Speicherform des Wirkstoffes nutzbar zu machen. Gleichzeitig sollten die Luteinester im gleichen Maße wie freies Lutein in den systemischen Kreislauf gelangen und einen präventiven physiologischen Effekt auf die Augenmorphologie haben. Voraussetzung für die Kenntnis dieser Wirksamkeit der in das NEM eingebrachten Substanz ist, dass die Bioverfügbarkeit des verwendeten Wirkstoffes bekannt und gegeben ist. Die Bioverfügbarkeit von Lutein aus der Nahrung oder auch über Supplemente wurde in der Literatur mehrfach dokumentiert [99, 234, 235]. Spezifisch für die Wirkstoffform Luteinester sind wenige veröffentlichte Daten vorhanden. Demnach waren Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit elementar, um eine Einschätzung der Wirkstoffaufnahme aus dem NEM in den humanen Organismus vornehmen zu können. Im engen Zusammenhang mit der Bioverfügbarkeit („*bioavailability*“) steht die Resorptionsverfügbarkeit („*bioaccessibility*“) einer Substanz, aber auch deren physiologische Aktivität („*bioactivity*“) [236]. Bio- und Resorptionsverfügbarkeit sind dabei zu unterscheiden und entsprechend definiert. Die Bioverfügbarkeit ist der Anteil des mit der Nahrung aufgenommenen Wirkstoffes, der in den systemischen Kreislauf des Organismus gelangt und dort bioaktiv wirken kann. Differenziert dazu beschreibt die Resorptionsverfügbarkeit den Anteil des Wirkstoffes, der in Abhängigkeit von dem Herauslösen aus der Nahrungsmittelmatrix, physiologischer Enzymaktivität und gegebenenfalls Micellarisierung vom Enterocyten absorbiert werden kann. Die Bewertung der Bioverfügbarkeit wird z.B. über die Bestimmung des Plasmaresponses nach Diäten in Humanstudien darstellbar. Vergleichbare Tiermodelle sind ebenfalls als *in vivo*-Studien anwendbar. Der hohe Kosten- und Zeitaufwand von Humanstudien und Tierversuchen ist in Abwägung der Relevanz der Erkenntnisse und im Rahmen von kurzfristigen Projekten jedoch nicht immer realisierbar. Vielmehr ist aber die Aufklärung der Resorptionsverfügbarkeit durch die Darstellung mittels *in vitro*-Verdau und Durchführung von Absorptionsstudien am Zellkulturmodell verbreitet, welche hier zur Anwendung kamen. Die Mehrzahl der verfügbaren *in vitro* Verdauemodelle untersucht die Metabolisierung von Pflanzen, Fleisch-, Fisch und Milchprodukten sowie in Emulsionen applizierte Lebensmittel [237]. Im Allgemeinen werden die zu untersuchenden Proben unter Anwendung der physiologischen Körpertemperatur von 37°C für 2 h in synthetischen Verdauungsflüssigkeiten mit relevanten Enzyme, Gallensalzen teilweise auch Mucinen behandelt [237]. Bei der Verwendung dieser Modelle ist die Vergleichbarkeit mit der *in vivo*-Situation kritisch zu be-

trachten. Die komplexen, physiologischen Mechanismen der Verdauung können *in vitro* teilweise nur begrenzt abgebildet werden [237]. Bei der Interpretation der Daten ist dies zu berücksichtigen.

In dieser Arbeit wurde zunächst basierend auf spezifischen Publikationen ein *in vitro* Verdauomodell *basic* entwickelt, welches die Passage der Substanzen Lutein und Luteinester durch den humanen Verdauungstraktes simulieren sollte (Tabelle 12). Aufgrund ihrer strukturell bedingten hydrophoben Eigenschaften werden Lutein und Luteinester analog im Lipidstoffwechsel metabolisiert. Beim Transfer durch die Magen-Darm-Passage werden dabei u.a. Lipasen bzw. Esterasen aktiv. Eine geringe lipolytische Aktivität kann bereits mit oraler Nahrungsaufnahme im Mund wirksam werden. Die im Mund lokalisierten exokrinen Drüsen sezernieren basal mit dem Speichel linguale Lipasen [238]. Mit Abschlucken des Speichels gelangen diese ebenso in den Magen und können dort bedingt emulgierend auf die Inhaltstoffe des Nahrungsbreis wirken. Aufgrund des pH-Milieus im Magen ist die Aktivität des Enzyms als geringfügig einzuschätzen. Auch die dort lokalisierte Magenlipase hat in diesem Zusammenhang eher eine emulgierende Funktion. Die orale Phase der Verdauung dient im Falle von Lutein und Luteinestern vordergründig dem Herauslösen aus der Nahrungsmittelmatrix. Im Weiteren werden durch die Gegebenheiten im Magen die Emulgierung und die Verbesserung der Zugänglichkeit der Wirkstoffe hervorgerufen bzw. gefördert. Ein Umbau oder die Hydrolyse von Luteinestern im Magen kann ausgeschlossen werden [67]. Erst im oberen Dünndarm kann die hydrolytische Spaltung der Ester in freies Lutein und dessen Einbau in die Micellen stattfinden. Während dort die Spaltung verschiedener Carotinoide durch die Aktivität der pankreatischen Lipase oder auch Cholesterolesterase (ChE) *in vitro* gezeigt werden konnte, ist dieser Sachverhalt für die Luteinester bis heute nicht aufgeklärt [67]. Breithaupt et al. konnten eine niedrige Hydrolyserate von Luteinestern bei Inkubation mit ChE (2002) oder auch rekombinanter humaner Pankreaslipase (2007) *in vitro* zeigen [67, 239]. Aufgrund der geringen Lipaseaktivität kann diese hydrolytische Umsetzung jedoch keine eindeutige Erklärung für den detektierten Anstieg von freiem Lutein im Serum nach luteinesterhaltigen Diäten in Humanstudien sein [67, 100, 239]. Der weiteren Vermutung einer hydrolytischen Spaltung durch die Anwesenheit von entsprechenden membranständigen Enzymen (Esterasen) unmittelbar im Bürstensaum des Enterocyten [62] sind Erkenntnisse von Dhuique-Mayer et al. (2006) entgegenzusetzen. Sie zeigten, dass die Inkubation von Caco-2 Zellen mit β -Cryptoxanthinestern nicht zum Anstieg der freien Form dieser Xanthophylle in den Zellen führte [240]. Von einer Aktivität entsprechender lokalständiger exprimierter Esterasen war nicht auszugehen [240]. Essentiell führt jedoch die Hydrolyse von

Luteinester im oberen Dünndarm zur Entstehung von freiem Lutein, welches in Abhängigkeit seiner Löslichkeit in die Micellen eingebaut werden kann [241]. Ein direkter Einbau von Luteinestern in die Micellen wurde bisher nicht gezeigt, wäre aber in Abhängigkeit der vorliegenden Molekülgröße spezifischer Ester vorstellbar. Nach erfolgter Aufnahme in den Enterocyten und Einbau in die Chylomikronen wird Lutein über die Blutbahn an die Zielgewebe geleitet. Dort kann es dann seine spezifischen physiologischen Funktionen übernehmen („*bioactivity*“).

5.3.1 Wirkstoffverhalten von Lutein und Luteinestern in Miniemulsionen gegenüber synthetischen Verdauungssäften – Einzelkompartimente

Die Darstellung von Effekten und Wirkstoffveränderungen in Präemulsionen (M1-M4) gegenüber einzelnen Kompartimenten des Verdauungstraktes sollte in erster Linie in die spätere Bewertung der Resorptionsverfügbarkeit von Luteinestern aus Fertigrezepturen einfließen. Zusammenhänge zwischen dem spezifischen Kompartiment und auftretenden Abbauprozessen vor Erreichen des Dünndarms sollten aufgeklärt werden. Neben der Variation der Emulgatoren konnten zusätzlich Unterschiede aufgrund der eingebrachten Wirkstoffformen (M1/M2 Lutein, M3/M4 Luteinester) interpretiert werden. Es war zu beachten, dass die Untersuchung einzelner Kompartimente nur bedingt den vollständigen Ablauf des *in vitro*-Verdauens der jeweiligen Wirkstoffe abbilden würde. Herleitungen über individuelle Einflüsse des kompartimentspezifischen Milieus (pH, Peristaltik, Wechselwirkungen mit Proteinen/Enzymen) waren aber möglich und sollten in die Beurteilung der Bio- bzw. Resorptionsverfügbarkeit einfließen.

Grundsätzlich war in allen untersuchten Proben unabhängig von der Behandlungsdauer ein Wirkstoffabbau nach Inkubation der Formulierungen mit einem der drei synthetischen Verdauungssäften festzustellen (Abbildung 14). Eine Besonderheit stellte dabei die Miniemulsion mit Luteinestern ohne Biozate 1 (M3) nach zweistündiger Behandlung mit dem synthetischen Intestinalsaft dar. Hier war eine Zunahme der Wirkstoffmenge zu beobachten. Weiterhin auffällig innerhalb der Untersuchungsreihe und kontinuierlich für alle kompartimentspezifischen Verdauungsansätze wurde die höchste Abnahme der Wirkstoffmenge in der Formulierung mit Lutein ohne Biozate 1 (M1) gezeigt. Hierbei betrug die Minderung der Wirkstoffmenge Lutein stets mehr als 50%. Die hohe Abbaurate suggeriert wiederum die Empfindlichkeit von Lutein gegenüber Degradation und Oxidation im Rahmen markanter Umgebungsbedingungen. In der analogen Miniemulsion mit Biozate 1 (M2) war die Abnahme der Menge an Lutein weniger hoch. Bei dem Vergleich der Wirkstoffveränderungen nach Behandlung in den Präemulsionen M3 und M4 konnte eine Abnahme an Luteinestern ähnlich wie bei M2 ermittelt werden.

Es ist demnach zu postulieren, dass die Zugabe von Biozate 1 zu Lutein, eingebracht in einer Emulsion den Wirkstoff im gleichen Maße stabilisiert, wie die Wirkstoffform Luteinester von Natur aus mit sich bringt. Dagegen scheint die Zugabe von Biozate 1 in luteinesterhaltigen Miniemulsionen keinen weiteren stabilisierenden Effekt auszuüben. Die Präemulsion M3 (ohne Biozate 1) wies einen geringeren Wirkstoffverlust auf als die analoge Formulierung M4 mit Biozate 1. Weiterhin lässt die Beobachtung die Vermutung zu, dass die schützende Wirkung vom Molkenproteinhydrolysat von seiner Funktion als Antioxidant ausgeht. Oxidativen Reaktionen im synthetischen Ansatz, die wiederum die Degradation des leicht oxidierbaren Luteins bewirken würden, werden abgeschwächt bzw. unterbunden. Die geringere Wirkstoffabnahme in M2 im Vergleich zu M1 bestätigt ebenso die Untersuchungsergebnisse von Frede et al. (2014), welche insbesondere eine erhöhte Thermostabilität von Lutein bei Zugabe von Molkenproteinpräparaten zeigen konnten [53]. Da Luteinester weniger labil gegenüber Oxidation auftreten, ist die schützende, antioxidative Wirkung von Biozate 1 hier weniger bedeutend. Vielmehr scheinen andere Eigenschaften bzw. Prozesse im jeweiligen Inkubationsansatz den geringfügigen Abbau von Luteinestern ausgelöst zu haben. Möglicherweise waren geringe Lipaseaktivitäten teilweise für die beobachteten Wirkstoffveränderungen verantwortlich. Dabei kann die Anwesenheit und Aktivität der Enzyme zur Hydrolyse der Ester geführt haben. Die Menge des dabei entstandenen freien Luteins war höchstwahrscheinlich so gering, dass ein analytischer Nachweis nicht möglich war. Denkbar könnten auch fortlaufende Oxidationen zum sofortigen Abbau des generierten freien Luteins geführt haben. Zusammenfassend konnte bei Inkubation der verschiedenen Wirkstoffformulierungen in synthetischen Einzelkompartimenten des Magen-Darm-Traktes eine höhere Instabilität von Lutein gegenüber Oxidation und Degradation gezeigt werden. Luteinester scheinen dagegen weniger labil, wurden aber dennoch in ihrer Menge reduziert. Während die Zugabe des Molkenproteinhydrolysat Biozate 1 Lutein vor Abbau schützte, war dies für Luteinester nicht eindeutig der Fall. Weder eine spontane Veresterung von Lutein, noch eine Hydrolyse von Luteinestern zu freiem Lutein waren detektierbar.

5.3.2 Resorptionsverfügbarkeit von Lutein und Luteinestern nach chronologischer Passage im *in vitro* Verdaumodell *basic*

Lutein und Luteinester in Miniemulsionen

Weiterführend wurden die Präemulsionen (M1-M4) sowie die Wirkstoffe Lutein und Luteinester in reiner Ölphase in einer komplett ablaufenden Simulation mittels *in vitro* Verdaumodell *basic* behandelt. Das vollständige Passieren von oraler Phase mit dem sich anschließenden

Magen-Darm-Trakt ermöglichte die Untersuchung von Ab- und Umbauprozessen der Wirkstoffe *in vitro*. Entgegen den vorhergehenden Resultaten bei der Untersuchung der Einzelkompartimente konnten hier in allen Formulierungen Zunahmen der Mengen an Lutein bzw. Luteinestern gezeigt werden. Dabei waren der Anstieg des Luteinäquivalents für die Präemulsion M2 und Lutein 10 mg/mL sehr viel höher als für die Formulierung M1 bzw. in den analogen luteinesterhaltigen Formulierungen. Die ohne Unterbrechung ablaufende Simulation der Magen-Darm-Passage führte dazu, dass komplexe Reaktionen und Umbauprozesse chronologisch ablaufen konnten. So wurde u.a eine effektive Micellarisierung von Lutein und Luteinestern ermöglicht. Dies ging einher mit einer verbesserten Extrahierbarkeit der Wirkstoffe aus den Formulierungen und erklärte den analytisch nachweisbaren Anstieg der Wirkstoffe. Der effektive Einbau von lipophilen Wirkstoffen wie Lutein in die Micellen ist essentiell, um in den Enterocyten zu gelangen und stellt damit indirekt einen Marker für die Bewertung der Resorptionsverfügbarkeit einer Substanz dar. Grundlegend ist bekannt, dass der Einbau von Lutein in Emulsionen mit dem Emulgator Tween[®] 40 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monopalmitat, Tween 40) und Tween 80 gleichwertig der Micellarisierung durch Emulgieren im Magen und Einwirken von Gallensalzen im Dünndarm ist [242]. Durch diese Micellarisierung wird die Absorption in den Enterocyten *in vitro* ermöglicht [242]. Physiologisch wird der Einbau des Wirkstoffes in Micellen durch Anwesenheit von Gallensalzen und Fetten vorangetrieben. Die Relevanz von Gallensalzen bei dem Einbau von Lutein in die Micellen konnten Garrett et al. (1999) *in vitro* zeigen. In ihren Untersuchungen führte die Abwesenheit von Gallensalzen in synthetischen Intestinalflüssigkeiten zu einem Ausbleiben des Einbaus von Carotinoiden, insbesondere von Lutein in Micellen [155]. Gegensätzlich dazu hemmte das Fehlen von Pankreatin die Micellarisierung *in vitro* nicht [155]. So ist grundsätzlich der vollständige Ablauf der komplexen Verdauvorgänge im Magen-Darm-Milieu notwendig, um *in vitro* vergleichbare *in vivo*-Bedingungen zu schaffen. Emulgiervorgänge und die Anwesenheit von Gallensalzen scheinen maßgeblich die Resorptionsverfügbarkeit von Lutein und Luteinestern zu beeinflussen. Durch den effektiven Einbau in Micellen bleibt der Wirkstoff nicht in der wässrigen Phase zurück. Die Micellenfraktion wird extrahiert und der Wirkstoff kann analytisch erfasst werden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Micellarisierung der Wirkstoffe stattgefunden hat. Diese erfolgte ebenso für Lutein, wie auch für die Luteinester. Dabei war der Einbau von Lutein aus der reinen Ölphase sehr viel effektiver als aus einer Miniemulsion mit Tween 80. Durch die Zugabe von Biozate 1 wurde scheinbar die Extrahierbarkeit von Lutein aus der Miniemulsion vorangetrieben. Die Extrahierbarkeit von Luteinestern war stets geringer.

Auch hier wurde die effektivste Extraktion für Luteinester aus der reinen Ölphase beobachtet. Gegensätzlich zu Lutein, hatte der Zusatz des Molkenproteinhydrolysat keinen stimulierenden Einfluss auf den Einbau von Luteinestern in die Micellen.

Eine Voraussetzung für eine gute Resorptionsverfügbarkeit von Luteinestern ist deren Hydrolyse zu freiem Lutein im oberen Dünndarm unter Beteiligung pankreatischer Enzyme. Eine Spaltung zu freiem Lutein scheint für die passive Diffusion und Aufnahme über den membranständigen Rezeptor SR-B1 in den Enterocyten entscheidend. Inwiefern dieser SR-B1 ebenso Luteinester in den Enterocyten transportieren kann, wurde bis heute nicht untersucht. Ebenso bleibt offen, inwiefern die Molekülgröße der Luteinester den Transport über das Dünndarmepithel begrenzt. Freies Lutein weist eine Molekülgröße von 568,9 Da auf [243, 244]. Diese Größe ist ähnlich den von SR-B1-gängigen lipophilen Substanzen (z.B. Cholesterolpalmittat 625,1 Da [245]). Ein Transport in den Enterocyten über diesen Rezeptor ist nach Micellarisierung demnach durch die strukturellen Voraussetzungen möglich. Die Molekülgröße könnte ebenso erklären, warum nur freies Lutein in humanen Geweben und Flüssigkeiten nachweisbar ist. Nur in einer Studie konnten bisher Luteinester in Form von Monopalmitat im humanen Blut nachgewiesen werden [233]. Eine klare Beschreibung zugrundeliegender Mechanismen (Transportform?, *in vivo*-Veresterung?) konnte jedoch nicht gegeben werden [233]. Möglicherweise konnte durch Sättigungseffekte und die moderate Molekülgröße des Luteinmonopalmitats ($\approx 807,3$ Da [246]) ein passiver Eintritt der Luteinmonoester in den Enterocyten über den Rezeptor SR-B1 erfolgen [233]. In dieser Arbeit wurde in den luteinesterhaltigen Präemulsionen nach *in vitro*-Verdau kein freies Lutein nachgewiesen. Damit lag eine limitierte Resorptionsverfügbarkeit der Luteinester hinsichtlich der Aufnahme in die Dünndarmepithelzellen vor. Die Bioverfügbarkeit der Formulierungen mit freiem Lutein war demnach als sehr viel höher einzuschätzen, als die der luteinesterhaltigen Miniemulsionen. Die höchste Resorptionsverfügbarkeit konnte mit der luteinhaltigen Miniemulsion mit Biozate 1 definiert werden. Das Vorliegen des freien Luteins bietet günstige Bedingungen zur Micellarisierung und Aufnahme in den Enterocyten. In Hinblick auf die Entwicklung eines NEMs mit Luteinestern in einer Miniemulsion ist von einer geringeren Resorptionsverfügbarkeit dieses Wirkstoffes als bei der Verwendung von freiem Lutein auszugehen. Weiterhin scheint die Anwesenheit spezifischer Emulgatoren hier keinen stimulierenden Effekt auf den Micellenturnover zu bewirken.

Luteinester in Fertigrezepturen

Zur weiteren Charakterisierung der Resorptionsverfügbarkeit der Luteinester aus dem NEM wurden die Fertigrezepturen im *in vitro* Verdaumodell *basic* unter physiologischen Bedingungen inkubiert. Ausgehend von der begrenzten Resorbierbarkeit der Luteinester in Miniemulsionen musste abgeklärt werden, inwiefern die Zugabe weiterer Inhaltsstoffe in das NEM die Resorptionsverfügbarkeit beeinflusste. Veränderungen der Wirkstoffmengen sollten bewertet und entsprechende Rezepturanpassungen ermöglicht werden. Die Resultate der Untersuchungsreihe zeigten eine Abnahme der Wirkstoffmenge an LÄ im höheren Maße. In allen Proben war nach *in vitro*-Verdau ein minimaler Anstieg der Luteinkonzentration messbar. Dieser Anstieg des freien Luteins korrelierte dabei nicht mit der Abnahme der Luteinestermenge, sondern war sehr viel geringer. Eine hydrolytische Wirksamkeit der Lipasen in den synthetischen Verdauungssäften gegenüber den Esterformen von Lutein konnte demnach *in vitro* nur im geringfügigen Maße nachgewiesen werden. Dies stimmt mit den Untersuchungsergebnissen von Breithaupt et al. (2002) überein. Dort zeigten verschiedene Enzyme (porcine pankreatische Lipase, - Cholesterolesterase, humane Lipase) *in vitro* keine oder nur minimale hydrolytische Aktivität gegenüber Luteinestern [67]. Eine ebenso nur sehr geringe Umwandlungsrate von Luteinestern zu freiem Lutein *in vitro* konnten die Wissenschaftler bei Einsatz einer rekombinanten humanen pankreatischen Lipase zeigen [239]. Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass möglicherweise die humane pankreatische Cholesterolesterase *in vivo* für die Spaltung von Luteinestern verantwortlich ist [239]. Ein Nachweis dazu erfolgte bis heute nicht. In einer *in vivo*-Studie von Granado-Lorencio et al. (2010) zur Metabolisierung von Luteinestern wurde ein Anstieg des Serumspiegels von Lutein nach Aufnahme von luteinesterfortifizierter Milch geprüft und belegt [247]. Der analog dazu durchgeführte *in vitro*-Verdau der Milch dokumentierte dagegen eine unvollständige Hydrolyse der Luteinester [247]. Die *in vivo*-Metabolisierung von Luteinestern scheint demnach mittels *in vitro* Verdaumodellen nicht erschöpfend abgebildet werden zu können. Hier besteht weiterhin Forschungsbedarf.

Eine weitere Bedeutung hinsichtlich des Verlustes von Luteinestern während des *in vitro*-Verdau scheint die Zugabe von weiteren Inhaltsstoffen zu haben. Womöglich wurden mit weiteren ergänzenden Substanzen in den Fertigrezepturen Einschränkungen der Stabilität der Luteinester gegenüber den synthetischen Verdauungssäften *in vitro* und ein stärkerer Abbau der Wirkstoffe ebenso von entstandenem freiem Lutein hervorgerufen. So könnte die Zugabe von α -Tocopherol einen oxidativen degenerierenden Effekt gegenüber dem freien Lutein hervorgerufen haben. Dies würde die fehlende Korrelation zwischen Luteinesterabbau und Zunahme an Lutein

teilweise erklären. Weiterhin fand der Einbau des Wirkstoffes in die micelläre Fraktion nicht in dem Maße statt, wie bei den Präemulsionen beobachtet. Die Erweiterung der Rezeptur führte grundlegend zu Veränderungen des Wirkstoffmilieus. So lagen in den Präemulsionen weniger saure pH-Bedingungen vor (Daten nicht gezeigt), als in den analogen Fertigrezepturen. Während saure Umgebungsbedingungen keine destabilisierenden Auswirkungen auf die Wirkstoffe selbst haben, kann bei Durchlaufen der Magen-Darm-Passage die Aktivität spezifischer Enzyme des Dünndarms herabgesetzt werden. Dies könnte ebenso zur eingeschränkten hydrolytischen Spaltung von Luteinestern zu Lutein beigetragen haben. Gleichmaßen könnten Wechselwirkungen zwischen den Inhaltsstoffen der Rezeptur die Zugänglichkeit der Formulierung für das Emulgieren durch Gallensalze oder des Wirkstoffes für enzymatische Veränderungen beeinflusst bzw. verhindert haben. Was jedoch nicht den beobachteten Abbau der Luteinester eindeutig erklären würde. Neben konkurrierenden Einflüssen sind auch hemmende Effekte der Zusatzstoffe denkbar, welche eine Einschränkung der *in vitro* Metabolisierung hervorgerufen haben könnten. So ist bekannt, dass Ascorbinsäure, wie auch Kaliumsorbat inhibitorisch auf Enzyme wirken können [248]. Die Hemmung der Enzyme wird vermutlich durch die Reaktion von Ascorbinsäure mit freien Thiolgruppen an den Proteinen hervorgerufen [249]. Weiterhin können Wechselwirkungen zwischen Ascorbinsäure und niedermolekularen Tensiden in der Wasserphase auftreten [249]. Diese Interaktion könnte das Dispersionmilieu einschließlich der Wirkstoffstabilität negativ beeinflusst haben. Auch die Zugabe von Xylitol als Zuckeraustauschstoff kann zur Einschränkung des Verdauungsprozesses *in vitro* geführt haben. So wurde neben einem antidiabetischen Effekt [250], ein möglicher stimulierender Einfluss auf die Lipogenese im Zusammenhang mit einer Hochfettdiät diskutiert [251, 252]. Eine genaue Darstellung des dabei ablaufenden Mechanismus blieb ungeklärt. Inwiefern hier ein Zusammenhang zur Wechselwirkung mit Enzymen des Lipidmetabolismus oder ein Destabilisierungseffekt für Luteinester besteht, wird nicht weiter dargestellt und als weniger bedeutend im Kontext eingeschätzt. Abschließend konnte empfohlen werden, die Komplexität der Inhaltsstoffe in dem Produkt mit dem Wirkstoff Luteinester so gering wie möglich zu halten. Jeder weitere Zusatz von Substanzen, der zwar die Haltbarkeit des Produktes verlängert und Schutz vor mikrobiellem Verderb bietet, führt zur Destabilisierung und Einschränkung der Resorptionsverfügbarkeit des gewählten Wirkstoffes Luteinester. Eine minimale Umsetzung der Luteinester zu Lutein konnte gezeigt werden, was deren basale Resorptionsverfügbarkeit belegt.

5.3.3 Wirkstoffverhalten von Lutein und Luteinestern in kolloidalen Formulierungen gegenüber verschiedenen industriellen Enzymen – Diskussionsansatz für eine Produkterweiterung

Im Zusammenhang mit den Erkenntnissen zur Resorptionsverfügbarkeit wurde im weiteren Projektverlauf Überlegungen diskutiert, inwiefern es möglich ist, das NEM in seiner Applikation zu erweitern. Dabei stellte sich die Frage, ob das Einbringen von Formulierungen in einem Zwei-Kammer-System die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes verbessern würde, stets mit dem Hintergrund dabei die Wirtschaftlichkeit des Produktes beizubehalten. Die Idee war eine Applikation zu schaffen, die in einer Kammer des Mundsprays die Miniemulsion mit dem Wirkstoff Luteinester enthält. In einer zweiten Kammer sollte ein spezifisches hydrolytisches Enzym in lyophilisierter Form vorliegen. Vor Verwendung sollten die Kammern mechanisch zusammengebracht werden. Das Enzymgemisch würde dann bereits vor Einnahme des Wirkstoffes aktiv werden und die Luteinester in der Miniemulsion zu Lutein spalten. Mit Versprühen würde der Wirkstoff bereits in freier Form in den Mund gelangen und dort im ersten Weg über die Mundschleimhaut resorbierbar sein. Unvollständig bzw. nicht gespaltene Luteinester würden wiederum im weiteren Verlauf der Magen-Darm-Passage *in vivo*, im physiologischen Milieu in freies Lutein umgesetzt werden und zur Aufnahme über den Enterocyten zur Verfügung stehen. Theoretisch wäre so eine verbesserte Resorptionsverfügbarkeit der Luteinester zu erreichen. Folglich wurden zunächst relevante Enzyme, für diese Applikation ausgewählt und hinsichtlich ihrer Fähigkeit freies Lutein durch die hydrolytische Spaltung der Luteinester zu generieren, untersucht. Zunächst betrafen die Untersuchungen das Enzym pankreatische Cholesterolesterase (ChE, EC 3.1.1.13). Aufgrund seiner strukturellen Beschaffenheit ist dieses Enzym in der Lage ein weites Spektrum an Substraten zu nutzen [253]. ChE kann die hydrolytische Spaltung von wasserlöslichen, wie auch hydrophoben Substraten vornehmen [253]. Das Enzym katalysiert u.a. die Hydrolyse von Cholesterolestern, Ester von fettlöslichen Vitaminen, Phospholipiden, Mono-, Di- und Triacylglyceriden [67]. Dabei ist seine Aktivität abhängig von der Anwesenheit von Gallensalzen. Hier besteht möglicherweise wiederum ein enger Zusammenhang zu den Ergebnissen von Garrett et al. (1999), die belegten, dass der Einbau von Carotinoiden insbesondere von Lutein in die Micellen durch das Fehlen von Gallensalzen verhindert wird [155]. Dieses Fehlen würde ebenso die Aktivität der ChE herabsetzen. Eine Spaltung von Luteinestern aus dem Nahrungsbrei würde nicht stattfinden und ein Einbau von Lutein in die Micellen nur bedingt erfolgen. Um zu prüfen, ob Luteinester Substrate für ChE darstellen, wurden Präemulsionen mit der Wirkstoffkombination aus Lutein und Luteinestern (MO5, MO6) mit einem modifizierten synthetischen Intestinalsaft (mAIF) *in vitro* inkubiert. Die zuvor

verwendete AIF-Komposition wurde hinsichtlich des Austausches von Pankreatin durch ChE verändert. Das Enzym wurde dabei in gleicher bzw. in doppelter Konzentration wie Pankreatin eingesetzt. Grundsätzlich konnte keine oder nur eine geringfügige Abnahme der Luteinester beobachtet werden (Tabelle 29). Ein Anstieg von freiem Lutein aus der hydrolytischen Spaltung von Luteinestern konnte nicht nachgewiesen werden. Es war jedoch zu beobachten, dass mit einer Steigerung der ChE-Konzentration und verlängerter Inkubationszeit die Minderung der Luteinester leicht zunahm. Auffallend war dabei außerdem, dass in der Präemulsion mit Biozate 1 stets ein leicht höherer Verlust an Luteinestern auftrat. Sollten enzymatische Aktivitäten die Minderung hervorgerufen haben, ist womöglich durch die Anwesenheit von Biozate 1 eine verbesserte Zugänglichkeit der Luteinester für enzymatische Abläufe erreicht worden. Während Tween 80 an dieser Stelle scheinbar einen Schutz vor enzymatischen bzw. unspezifischen Abbauprozessen ausübt. Eine die ChE aktivierende Funktion, wie die der Gallensalze scheint Tween 80 nicht zu besitzen. Geht man davon aus, dass der Abbau der Luteinester auf eine hydrolytische Spaltung zurückzuführen ist, dann könnte Biozate 1 in diesem Zusammenhang stimulierend auf das Enzym gewirkt haben. Eine Erklärung für das Ausbleiben eines detektierbaren Anstiegs von freiem Lutein könnte die relativ geringe Umsetzungsrate sein. Möglicherweise war die entstandene Menge an freiem Lutein in einem nicht mehr nachweisbaren, sensiblen Bereich einzuordnen (<LOQ, LOD). Eine adäquate Umsetzung der Luteinester zu freiem Lutein durch das Enzym ChE konnte hier nicht gezeigt werden. Denkbar wäre, dass die vorliegenden Bedingungen im *in vitro*-Verdau nicht optimal für die Entfaltung der Enzymaktivität vorlagen. So wird u.a. in der Literatur beschrieben, dass die Aktivität von Enzymen wie Lipasen neben der Anwesenheit von Gallensalzen durch die Zugabe von Calcium und Colipasen begünstigt wird [254]. Diese Zugaben erfolgten hier nicht. Unabhängig davon konnten bereits Breithaupt et al. (2002) eine sehr niedrige Hydrolyserate unter ähnlichen *in vitro* Bedingungen zeigen. Hier war eine ChE-Aktivität für die Umsetzung von Luteinestern aus Oleoresin von $8,1 \cdot 10^{-4}$ U/mg festgestellt worden [67]. Im Vergleich dazu betrug die Enzymaktivität gegenüber dem Substrat 1,2 Diacylglycerin 44,8 U/mg [67]. In den Untersuchungen von Grando-Lorencio et al. (2007) wurde die ChE zu einem synthetischen Intestinalsaft mit Pankreatin und anderen Lipasen ergänzend hinzugegeben. Weiterhin wurde die Inkubationszeit verlängert, um die Enzymaktivitäten und Micellarisierung von Carotinoiden voranzutreiben [157]. Trotz der Modifikationen des *in vitro* Verdauomodells zugunsten einer hydrolytischen Spaltung von Estern war auch in dieser Studie keine vollständige Umsetzung der Luteinester zu freiem

Lutein nachweisbar [157]. Abschließend konnte in der vorliegenden Versuchsreihe keine hydrolytische Aktivität der ChE gegenüber Luteinestern *in vitro* demonstriert werden. Im Zusammenhang mit der Entwicklung eines NEMs in einer Applikation als Zwei-Kammer-System wäre der Einsatz nicht sinnvoll. Eine Zugabe hoher Mengen des spezifischen Enzyms hätte nur limitiert physiologische Vorteile. Neben einer zu erwartenden sehr geringen Umsetzungsrate wäre nicht bekannt, in welchem Rahmen toxikologische oder andere negative Effekte ausgelöst werden würden. Hierzu wären weitere Untersuchungen notwendig. Weiterhin wäre die Zugabe eines synthetisch gewonnenen Enzyms in hohen Mengen in der Applikation kostspielig und nicht vom wirtschaftlichen Nutzen.

Losgelöst von dieser Erkenntnis wurden im Weiteren industriell synthetisierte Lipasen von Pilzen in die Untersuchungen einbezogen. Die Anwendung von synthetischen Lipasen aus Bakterien, Hefen und Pilzen ist mittlerweile weit verbreitet. Insbesondere in der Nahrungsmittelindustrie finden synthetisch gewonnene Enzyme Gebrauch in Backwaren, Milchprodukten oder auch bei der Herstellung von Lipiden aus Ei [255]. Vorteile bieten sich in ihren hohen Stabilität und Spezifität [256]. Weiterhin ist die Produktion mittels Kultivierung von Mikroorganismen weitreichend und effektiv etabliert, unterliegt aber fortlaufenden wissenschaftlichen Untersuchungen, um weiterführend spezifische Enzyme zu gewinnen [256]. Wegen der einfachen Anwendbarkeit und Einsatzmöglichkeit kamen spezifische industrielle Lipasen auch für die Applikation in einem Zwei-Kammer-System in Frage. Die Enzyme wurden hinsichtlich ihrer theoretischen Fähigkeit Luteinester hydrolytisch zu spalten geprüft. In den Untersuchungen wurden die rekombinante Lipase B *Candida Antarctica* (CAL-B), die Lipase FE01 vom *Aspergillus oryzae* (FE01), die Lipase L8906 vom *Mucor javanicus* (L8906) sowie die Lipase L9031 vom *Mucor miehei* (L9031) (Tabelle 13) verwendet. Das Enzym CAL-B ist als robust gegenüber pH-Wert und Temperatur bekannt [257]. Ebenso nutzt es ein weites Spektrum an lipophilen Substraten [257]. In den hier durchgeführten Untersuchungen wurden die verwendeten Präemulsionen (MO5, MO6), wie bereits bei ChE mit synthetischen Intestinalsaft behandelt, in welchem Pankreatin durch die CAL-B im gleichen Mengenverhältnis ersetzt wurde. Die Behandlung erfolgte für 24 h, um eine intensive Inkubation des Enzyms und Entfaltung der Aktivität zu initiieren. Anhand der analytischen Ergebnisse nach Inkubation konnte keine signifikante Veränderung der Menge an Luteinäquivalent nachgewiesen werden. Eine Veränderung der Luteinkonzentration wurde nicht beobachtet. Die CAL-B war unter den gewählten *in vitro*-Bedingungen nicht in der Lage freies Lutein aus Luteinestern freizusetzen. Möglicherweise war die eingesetzte Menge an CAL-B (36 U/mL Probe) trotz Erhöhung im

Vergleich zu vorangegangene Studien weiterhin zu niedrig. Zorn et al. (2003) konnten bei Einsatz einer Enzymaktivität von 12 U/mL Probe bereits keine Substratspezifität von CAL-B zu Luteinestern zeigen [172].

Unter Anwendung des vollständigen Modells *in vitro* Verdau *basic* wurden die Lipasen FE01, L8906 und L9031 ebenso auf hydrolytische Aktivität gegenüber Luteinestern in Präemulsionen geprüft. Gleichzeitig sollten Effekte auf das ebenso in diese Formulierungen eingebrachte Lutein untersucht werden. Die Lipasen ersetzen jeweils das Pankreatingemisch im AIF in gleicher Menge. Die Inkubationszeiten der einzelnen Verdauungssäfte wurden modifiziert (AHS 30 min, AGF 1 h, AIF 2 h). Nach Behandlung konnte für alle eingesetzten Lipasen ein Abbau der Luteinäquivalentmenge in den Präemulsionen (Ausnahme M6 Lipase L9031) detektiert werden, der jedoch in keinem Fall mit einem Anstieg an freiem Lutein einherging. Bei qualitativer Prüfung und Zuordnung der detektierten Peakflächen von Lutein und Luteinestern konnten stets gleiche Abbauraten festgestellt werden. Das bedeutet, dass die Minderung der Luteinäquivalentmenge beide Wirkstoffe im gleichen Maße betraf. Ein höheres Defizit an Luteinestern zu Gunsten von Lutein hätte ein möglicher Hinweis für einen Turnover durch Lipaseaktivitäten sein können, konnte aber hier nicht gezeigt werden. Ausnahme zu einer Wirkstoffabnahme bildete die mit der Lipase L9031 behandelte Präemulsion M6. Hier war ein drastischer Anstieg der Wirkstoffmenge von Lutein und Luteinestern zu verzeichnen. Ein plausibler Zusammenhang im Kontext mit der Untersuchung konnte nicht definiert werden. Die hohe Standardabweichung untermauert die vermutete Störung im Versuchsansatz oder bei Einsatz der Probenmenge. Aufgrund der Erkenntnisse der Untersuchungen über eine fehlende hydrolytische Aktivität der Lipasen in den hier angewendeten *in vitro*-Versuchen wurden die Untersuchungen eingestellt. Ein fehlender Turnover von Luteinestern zu freiem Lutein bei Verwendung der Lipase CAL-B, LE01 sowie L8609 konnten bereits Zorn et al. (2003) belegen. Sie untersuchten 26 kommerziell erwerbliche Lipasen hinsichtlich ihrer Fähigkeit Lutein- bzw. Capsanthinester (Xanthophyll aus der Paprika) in die entsprechende freie Form umzuwandeln [172]. Während Capsanthinester von einer Vielzahl dieser Enzyme hydrolytisch gespalten wurden, nutzten nur wenige Lipasen Luteinester als Substrat. Weiterhin war bei Umsetzung die Turnoverrate zum freien Lutein sehr viel geringer als bei dem Capsanthin. Wie auch in dem hier vorliegenden Versuchsansatz konnten Zorn et al. (2003) keine adäquate Entstehung von freiem Lutein bei Verwendung der Lipase vom *Aspergillus oryzae*, *Mucor javanicus*, *Mucor mihei* und CAL-B nachweisen [172]. Eine Umsetzung zu freiem Lutein zeigten alternative Lipasen vom

Candida antarctica oder auch vom *Candida cylindracea*. Maximal wurde hier nach Inkubation 44% freies Lutein detektiert.

Abschließend konnte kein adäquates Enzym für die Applikation der Rezepturen in einem Zweikammer-System identifiziert werden. Kosten und Nutzenabwägung weiterer Untersuchungen und die Anforderungen an eine spätere Produktion eines solchen NEMs führten dazu, dass diese Applikationsform für das zu konzipierenden Mundspray nicht in Frage kam.

Ergänzend wurden ausgewählte Miniemulsionen und Luteinester aus Oleoresin in einer chemisch induzierten Hydrolysereaktion (sogenannte Saponifizierung/ Verseifung) auf die Zugänglichkeit der eingebrachten Luteinester für eine Spaltung in freies Lutein geprüft. Diese Untersuchungen erfolgten an Miniemulsionen sowie Oleoresin 60 mg/mL. Aus allen Formulierungen war die Umsetzung von Luteinestern zu Lutein nachweisbar. Damit konnte belegt werden, dass unter gewählten synthetischen Bedingungen eine hydrolytische Spaltung des veresterten Luteins in den vorliegenden Miniemulsionen grundsätzlich möglich wäre.

5.4 CHARAKTERISIERUNG ZYTOTOXISCHER EFFEKTE UND DER WIRKSTOFFABSORPTION AUS LUTEIN- UND LUTEINESTERHALTIGEN FORMULIERUNGEN AM ZELLMODELL CACO-2 *IN VITRO*

5.4.1 Zytotoxische Einordnung von relevanten Inhaltsstoffe und der Wirkstoffe in den kolloidalen Formulierungen über deren Effekte auf die lysosomale Membranintegrität und Stoffwechselaktivität von Caco-2 *in vitro*

Die Supplementierung mit einem spezifischen Wirkstoff in einer kolloidalen Formulierung kann sich vielfältig auf den humanen Organismus auswirken. Die Aufklärung seiner Unbedenklichkeit insbesondere im Einsatz als Lebensmittel und als NEM ist unumgänglich. Im theoretischen Ansatz erfolgen dazu in erster Instanz Recherchen zu gesetzlichen Regelungen und vorliegender Literatur oder Patente. Dem schließen sich entsprechende praktische Untersuchungen von Laborstudien *in vitro* bis hin zu Humanstudien *in vivo* an. Zur weiteren Beschreibung möglicher toxischer Effekte von Substanzen werden in vielen wissenschaftlichen Studien Zellkulturmodelle verwendet. Sie bieten die Möglichkeit mit wenig Kosten- und Zeitaufwand frühzeitig Erkenntnisse über Verhalten, Wechselwirkungen und die Metabolisierung einer relevanten Substanz *in vitro* zu zeigen. Die Zelllinie Caco-2 hat sich dabei als gängiges Modell für die Abbildung des Dünndarmepithels einschließlich seiner Membranintegrität und Enzymausstat-

tung *in vitro* bewährt (Tabelle 14). Vorangegangene Untersuchungen und Ergebnisse dieser Arbeit ließen direkte zelluläre Aspekte, wie Zytotoxizität und Absorption offen. Diese Faktoren sollten im Weiteren genauer beleuchtet werden. Darauf aufbauend ließen die gewonnenen Daten ebenso die Beurteilung möglicher Absorptionslimitierungen durch die gewählten Rezepturen zu. Im ersten Schritt wurden Zusammenhänge zytotoxischer Effekte in Form von Einschränkungen der Stoffwechselaktivität (Resazurinassay) und der (lysosomalen) Membranintegrität (Neutralrotassay, NR) geprüft.

Lutein und Luteinester

Zu Beginn wurden die reinen Wirkstoffe Lutein bzw. Luteinester hinsichtlich zytotoxischer Effekte kontrolliert. Dazu kamen Lutein 5% und Oleoresin zur Anwendung. Weiterhin wurde das Präparat Biolut mit Luteinestern als alternativer Wirkstoffträger eingesetzt. Im Unterschied zu dem öligen Oleoresin liegen die Luteinester hier synthetisch verkapselt in einem Pulver vor. Limitierungen seiner Verwendung gehen einher mit der begrenzten Löslichkeit in einer Miniemulsion sowie fehlenden Informationen über die genaue Zusammensetzung. Die Untersuchungen der reinen Wirkstoffe zeigten, dass Lutein 5% ausschließlich in der höchsten eingesetzten Konzentration in beiden Viabilitätsassays einen zytotoxischen Effekt *in vitro* auslöste (Abbildung 16). Eine Einschränkung der Stoffwechselaktivität ausgehend von den Luteinestern aus Oleoresin und Biolut wurde nicht beobachtet. Im Resazurinassay wurde keine zytotoxische Wirkung dieser Substanzen gezeigt. Dagegen konnte eine leichte Abnahme der Zellviabilität für Oleoresin bei höchster angewandeter Konzentration im Neutralrotassay detektiert werden. Eine Zunahme der wachstumshemmenden Wirkung korrelierend mit steigender Konzentration konnte im NR für Luteinester aus Biolut festgestellt werden. Biolut scheint demnach einen stärkeren Einfluss auf die Membranintegrität von Caco-2 Zellen zu haben. Dies ist möglicherweise auf die synthetische Applikation der Luteinester in einer Verkapselung zurückzuführen. Dagegen liegen die Luteinester im Oleoresin in einer physiologisch günstigeren, pflanzlichen Matrix vor. Sie scheinen dabei weniger hinderlich auf die zelluläre Membranbeständigkeit zu wirken. Denkbar wäre auch, dass die vom Präparat Biolut ausgehende Hemmung des Zellwachstums nicht direkt von den darin enthaltenen Luteinestern verursacht wurde. Weitere unbekannte Bestandteile aus der Verkapselung oder in der Formulierung könnten die inhibitorischen Effekte auf das Wachstum der Zellen bewirkt haben. Das Produkt Biolut selbst wird als GRAS (*Generally Recognized As Safe*) kommerziell angeboten. Dabei handelt es sich um eine Zulassungsbezeichnung der US-amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA),

welche dem Präparat eine Unbedenklichkeit bescheinigt. Da Biolut für die Verwendung im NEM nicht vorgesehen war, wurde der Ursache für seine beobachtete Zytotoxizität nicht weiter untersucht.

Die wachstumshemmende Wirkung von Lutein bei der maximal eingesetzten Konzentration (0,2 μM LÄ) in beiden Assays war ungewöhnlich. Möglicherweise war auch hier ein Einfluss durch weitere unbekannte Zusatzstoffe aus der Applikation des Luteins 5% zu verzeichnen. Derzeit gibt es keine wissenschaftlichen Belege einer von Lutein oder Luteinester ausgehenden Toxizität. Tierversuche zeigten keine kurz- oder langfristigen Toxizitäten bei Supplementierung mit Lutein und Luteinestern [258, 259]. Beispielsweise konnten Hari-kumar et al. (2008) bei oraler Applikation von Lutein und Luteinestern bis zu 400 mg/kg KG/d in Ratten weder nach vier, noch nach 13 Wochen einen negativen Einfluss auf Sterblichkeit, Körpergewicht, Organe oder Lipidprofil der Tiere dokumentieren [259]. In einer kürzlich von der EFSA veröffentlichten Erklärung in Bezug zur Fütterung von Geflügel mit verschiedenen Luteinextrakten aus der Studentenblume wurden diese als unbedenklich eingestuft [260]. Die EFSA geht von einer geringen Exposition des humanen Organismus mit Lutein aus. Eine Relevanz der beobachteten Zytotoxizität bestand aber bei Einsatz von Miniemulsionen mit Lutein innerhalb der Experimente zur zellulären Wirkstoffaufnahme. Absorptionsbeschränkungen, die mit der durch zytotoxische Effekte ausgelösten, eingeschränkten Stoffwechselaktivität und mit Membranveränderungen der Zellen einhergingen, limitierten die ganzheitliche physiologische Darstellung der zellulären Aufnahme *in vitro*. Dies wurde bei der Charakterisierung der Absorption der Wirkstoffe aus den Formulierungen berücksichtigt.

Tween 80, Biozate 1, MCT-Öl

Die Untersuchungen hinsichtlich der Zytotoxizität der Emulgatoren und von MCT-Öl umfassten einen Konzentrationsbereich in Anlehnung an die zu applizierenden Mengen in den Versuchen zur Zytotoxizität der Präemulsionen (Tabelle 43).

Tabelle 43 Endkonzentrationen von Tween 80, Biozate 1 und MCT-Öl in den Inkubationsmedien der Zellviabilitätsassays *in vitro*.

Tween 80	[μM]	1,0	10,0	50,0	100,0	250,0
	[%]	0,0001	0,0013	0,0066	0,0131	0,0328
Biozate 1	[$\mu\text{g/mL}$]	1,0	10,	50,0	75,0	100,0
	[%]	0,0001	0,0010	0,0050	0,0075	0,0100
MCT-Öl	[$\mu\text{L/mL}$]	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
	[%]	0,00005	0,00010	0,00015	0,00020	0,00025

Der Emulgator Tween 80 führte bei den eingesetzten Konzentrationen in beiden Viabilitätsassays zu einer Wachstumshemmung der Caco-2 Zellen. Dabei erreichte die hemmende Wirkung im Resazurinassay ab einer Tween 80-Konzentration von 100 μM ein Plateau (Abbildung 17). Eine weitere Verstärkung der inhibitorischen Wirkung wurde bei einer Erhöhung der Menge an Tween 80 im Inkubationsmedium nicht festgestellt. Im Neutralrotassay korrelierte dagegen ein weiterer Anstieg der Konzentration von Tween 80 mit einer Abnahme der Zellviabilität. Die im Assay eingesetzte maximale Konzentration des Emulgators betrug 250 μM . Dies entsprach 0,033% (v/v) Tween 80 im Inkubationsmedium. Die toxische Wirkung von Tween 80 wird kontrovers diskutiert. In Untersuchungen zur Zytotoxizität von Tween 80 konnten vielfältig zelluläre Schädigungen durch den Emulgator gezeigt werden. Bereits Anderberg et al. (1992) dokumentierten eine zytotoxische Wirkung von Kulturmedien mit 0,3% Tween 80 bei Inkubation für 24 h [261]. Eine wachstumshemmende Wirkung durch hohe Konzentrationen von Tween 80 konnten Ujhelyi et al. (2012) bestätigen (ab 0,05% MTT-Assay, 0,005% Lactat-Dehydrogenase-Assay) [262]. In einer weiteren Studie zur Charakterisierung der zytotoxischen Wirkung von Mikroemulsionen mit β -Carotin auf Caco-2 Zellen wurden Emulsionen unter Verwendung des Emulgators Tween 80 generiert. Im Zellviabilitätsassay führten die Mikroemulsionen im Kulturmedium, unabhängig von der Anwesenheit des β -Carotins ab einer Konzentration von 0,0625% zu einem Anstieg der Zytotoxizität (0,0125% Tween 80). Der wachstumshemmende Effekt ging demnach nicht vom Wirkstoff aus. Es wurde vermutet, dass die zellulären Schädigungen durch den Anteil von Tween 80 in den eingesetzten Mikroemulsionen hervorgerufen wurden. Chassaing et al. (2016) zeigten in einer Studie mit Mäusen die Entstehung von leichten Entzündungen im Magen-Darm-Trakt der Tiere bei Gabe niedriger Mengen von Tween 80 (1%, v/v im Trinkwasser) [263]. Dies könnte im Kontext mit den Zellschädigungen *in vitro* stehen. Sie postulierten außerdem einen Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Polysorbaten, einer Interaktion mit der Mikrobiota im Darm und der Entstehung des metabolischen Syndroms [263]. Dagegen schätzte die EFSA bei der Bewertung ihr vorliegender Daten aus Tierversuchen und Humanstudien, die Aufnahme von Polysorbaten wie Tween 80 durch den menschlichen Organismus als sehr gering ein [138]. Die Metabolisierung erfolgt, wie die der Fettsäuren, aus der Nahrung. Polysorbate weisen keine akute Toxizität auf und sind weder als genotoxisch noch als karzinogen zu bewerten [138]. Demnach fand die in dieser Arbeit detektierte zytotoxische Wirkung von

Tween 80 auf Caco-2 Zellen *in vitro* keine vollständige Übereinstimmung mit *in vivo*-Ergebnissen. Die Daten werden aber in der Bewertung möglicher wachstumshemmender Effekte bei Inkubation der Zellen mit Miniemulsionen und Fertigrezepturen von Bedeutung sein.

Der Emulgator Biozate 1 zeigte nur bedingt eine zytotoxische Wirkung im Resazurinassay. Diese war am stärksten bei einer Konzentration von 50 µg/mL. Mit weiterer Steigerung der Emulgatormenge im Kulturmedium wurde die wachstumshemmende Wirkung geringer bzw. verschwand vollständig. Gegensätzlich konnte eine Zunahme der zytotoxischen Wirkung von Biozate 1 korrelierend mit Konzentrationsanstieg im Neutralrotassay gezeigt werden. Damit wurde im gleichen Verhältnis die Membranintegrität der Zellen beeinflusst, wie bei Zugabe von Tween 80. Konträr zum Polysorbat, war das Ausmaß der detektierten Zytotoxizität weniger hoch. Damit kann ein positiver Effekt des partiellen Austausches des Emulgators Tween 80 durch Biozate 1 verdeutlicht werden. Negative Effekte in der Interaktion zwischen Dünndarmepithelzellen und Emulgatoren könnten begrenzt und die Absorption der Wirkstoffe vorangetrieben werden. Die Verwendung von MCT-Öl löste in keiner der hier angewendeten Konzentrationen wachstumshemmende Effekte aus. MCT-Öl kann demnach als nicht zytotoxisch bei den gewählten *in vitro* Bedingungen bewertet werden.

Zytotoxische Einordnung der Präemulsionen

Zunächst wurden die Präemulsionen M5 und M6 (Lutein + Luteinester) sowie M11 und M22 (Lutein) auf ihre zytotoxische Wirkung in höheren Konzentrationen als den zu erwartenden physiologischen Mengen untersucht. Dabei zeigten die Miniemulsionen mit ausschließlich Tween 80 generell einen höheren wachstumshemmenden Einfluss auf die Zellen in den Viabilitätsassays, als die Formulierungen mit beiden Emulgatoren (Abbildung 18). Ein Anstieg der Konzentration der Miniemulsion ging einher mit der Zunahme der zytotoxischen Wirkung. Dabei war unabhängig vom zugegebenen Wirkstoff die Inhibition der Stoffwechselaktivität im Resazurinassay stärker als der Einfluss auf die Membranintegrität. Unterschiede in den zytotoxischen Effekten aufgrund der in die Formulierungen eingebrachten Wirkstoffe Lutein und Luteinester konnten nicht eindeutig belegt werden. Es war davon auszugehen, dass Tween 80 die hier detektierte Zytotoxizität hervorrief. Gleiches wurde bereits für die Aufnahme von luteinhaltigen Emulsionen mit Tween 40 beschrieben [51]. Eine Minderung zytotoxischer Effekte durch die antioxidativen Wirkstoffe Lutein und Luteinester konnte nicht festgestellt werden [264]. Die Miniemulsionen mit beiden Emulgatoren - Tween 80 und Biozate 1- zeigten einen geringeren Einfluss auf die Viabilität der Zellen *in vitro*. Sie sind demnach als weniger

zytotoxisch zu bewerten. Mit dem partiellen Austausch des Emulgators durch Biozate 1 wurde der Zytotoxizität ausgehend von Tween 80 eindeutig präventiv entgegengewirkt. Gesamtheitlich ist zu beachten, dass die eingesetzten Konzentrationen, die physiologisch erreichbaren Mengen um ein zehnfaches und mehr überstiegen. Grundsätzlich war bei Einsatz der Miniemulsionen in physiologischen Mengen keine zytotoxische Wirkung zu erwarten. Dies wurde durch entsprechende Versuche bestätigt (Tabelle 33). Mögliche Interaktionen von Biozate1 mit membranständigen Bestandteilen bzw. eine Störung der Membranintegrität der Zellen konnten dabei teilweise beobachtet werden (Tabelle 34). In Hinblick auf Versuche zur zellulären Aufnahme war dies insofern bedeutend, dass eine eingeschränkte Membranintegrität auch eine Veränderung des Absorptionverhaltens von Substanzen bewirken kann. Inwiefern dies transzelluläre Prozesse oder Efflux der Wirkstoffe beeinflusst blieb offen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Miniemulsionen, welche zuvor im *in vitro*-Verdau micellarisiert wurden, weniger zytotoxisch waren, als die direkt im Kulturmedium eingesetzte Miniemulsionen. Dies kann auch auf den Sachverhalt zurückgeführt werden, dass weitere Verdünnungsschritte innerhalb des *in vitro*-Verdau die Konzentration von Tween 80 noch weiter herabgesetzt haben. Zusammenfassend ist von den Miniemulsionen in physiologischen Konzentrationen keine Zytotoxizität zu erwarten. Ebenso wird durch die im *in vitro*-Verdau generierten micellarisierten Miniemulsionen kein inhibitorischer Einfluss auf die Zellviabilität ausgelöst. Die Zytotoxizität von Tween 80 spielt im physiologischen Zusammenhang eine weniger bedeutende Rolle, da hier Konzentrationen erreicht werden, die bei weitem nicht im toxischen Bereich des Emulgators liegen. Mögliche sensible Veränderungen werden durch das teilweise Ersetzen des Emulgators mit Biozate 1 vermindert. Auch hier kann dem Biozate 1 eine positive physiologische Wirkung zugeschrieben werden.

Zytotoxische Einordnung der Fertigrezepturen

Die Erweiterung der Prototypen bzw. Präemulsionen um mehrere Zusatzstoffe zu Fertigrezepturen, zeigte sich bereits in den Studien zur Resorptionsverfügbarkeit als ungünstig. Einschränkungen hinsichtlich der Aktivitäten von beteiligten Enzymen sowie Matrixveränderungen führten zu einer verminderten Micellarisierung der Wirkstoffe aus den Miniemulsionen. Im Weiteren wurde die Zytotoxizität der Fertigrezepturen 122 bis 125 untersucht. Dabei wurden die Miniemulsionen in den gleichen physiologischen Konzentrationen wie in den Absorptionsversuchen in das jeweilige Kulturmedium eingebracht (0,5-0,7 μM LÄ) und für 72 h inkubiert. Alle

Fertigrezepturen erwiesen sich im Resazurinassay als zytotoxisch. Die Anwesenheit von Biozate 1 in den Formulierungen (124, 125) führte nicht zu einer Reduzierung der zytotoxischen Wirkung. Gegenteilig waren die von diesen Formulierungen ausgehenden inhibitorischen Einflüsse auf die Stoffwechselaktivität bzw. die Zellviabilität höher, als die der Fertigrezepturen ohne Biozate 1 (122, 123). Im NR konnte keine Zytotoxizität der Fertigrezepturen 122 und 123 festgestellt werden. Dagegen wurde für die Formulierungen 124 und 125 eine geringfügige Senkung der zellulären Membranintegrität gezeigt. Die Formulierungen waren demnach als zytotoxisch einzustufen. Auch hier konnte keine schützende Wirkung der Zellen vor wachstumshemmenden Einflüssen durch Biozate 1 nachgewiesen werden. Eine Zytotoxizität ausgelöst durch Zugabe von MCT-Öl oder Rapsöl in der Rezeptur konnte ausgeschlossen werden. Im Resazurinassay wurde eine höhere Abnahme der Zellviabilität für die rapsöhlhaltigen Formulierungen detektiert. Hingegen war im Neutralrotassay eine höhere Abnahme durch die Formulierungen mit MCT-Öl zu verzeichnen. Demnach ist davon auszugehen, dass die Öle keinen entscheidenden Einfluss auf die Zellviabilität ausüben. Es ist zu beachten, dass die hohe Verdünnung der Fertigrezepturen in das Kulturmedium ebenso zum Herabsetzen der Konzentrationen der Zusatzstoffe wie z.B. den Emulgatoren in einen Bereich führten, bei denen diese in den durchgeführten Viabilitätsassay nicht zytotoxisch waren. Möglicherweise hat die Verlängerung der Inkubationszeit um das dreifache zu einer zytotoxischen Wirkung ausgehend von Tween 80 trotz geringer Konzentration geführt. Ein einsetzender zytotoxischer Effekt mit langfristiger Inkubation konnte bereits zuvor gezeigt werden [261]. Auch die Menge an Luteinestern in den Kulturmedien mit Fertigrezepturen entsprachen Konzentrationen an Luteinäquivalent ($\leq 0,7 \mu\text{M}$), von denen keine Zytotoxizität zu erwarten war. Auch in Hinblick auf die Zytotoxizitätscharakterisierung scheinen weitere Inhaltsstoffe in den Fertigrezepturen die Lebensfähigkeit der Zellen stark beeinflusst zu haben. Insbesondere die Stoffwechselaktivität wurde herabgesetzt, was die Schlußfolgerung zulässt, dass ein außerordentlicher Effekt auf Enzymaktivitäten bzw. Interaktionen mit Proteinen ausgelöst wurde. Scheinbar kann eine Micellarisierung durch Tween 80 dem stabilisierend entgegenwirken, während Biozate 1 in diesem Fall als modifiziertes Molkenprotein ebenso von den einschränkenden Effekten und Wechselwirkungen betroffen zu sein schien.

5.4.2 Zelluläre Aufnahme von Lutein und Luteinestern aus kolloidalen Formulierungen

Lutein und Luteinester

In einem Vorversuch wurden zunächst die reinen Wirkstoffe Lutein und Luteinester hinsichtlich einer Aufnahme durch Caco-2 Zellen untersucht. Die Wirkstoffe waren dazu ausschließlich in MCT-Öl gelöst worden. Eine Absorption sollte so grundsätzlich stattfinden. Es ist bekannt, dass die Anwesenheit von Fetten bzw. Ölen die Bioverfügbarkeit von Carotinoiden wie auch Lutein positiv beeinflusst [95]. Tatsächlich konnte *in vitro* gezeigt werden, dass freies Lutein mit einer geringen Absorptionsrate in die Caco-2 Zellen aufgenommen wurde. Die eingeschränkte Aufnahme von Lutein stand im engen Zusammenhang mit der eingesetzten Formulierung des Wirkstoffes in diesem Versuch. Die Wirkstoffe in MCT-Öl gelöst wurden zuvor nicht einem *in vitro*-Verdau unterzogen. Damit lagen diese zwar in einer hydrophoben Matrix, aber nicht ausreichend micellarisiert vor. Durch den fehlenden Einbau in Micellen wurde die Interaktion mit dem Enterocyten erschwert. Daher konnte Lutein nur im geringen Maße von den Zellen absorbiert werden (Wiederfindung 2,9%). Eine verbesserte Absorption hätte bereits durch die Zugabe von Tween 80 hervorgerufen werden können. Als nichtionisches Tensid hätte es eine verbesserte Löslichkeit von Lutein im zellulären Milieu vermittelt. Ein Ansteigen der zellulären Absorptionsrate konnte bereits für β -Carotin durch Zugabe von Tween 40 beschrieben werden [265]. Eine sehr viel stärkere Limitierung hinsichtlich der Absorption konnte für die zelluläre Aufnahme von Luteinestern aus Oleoresin belegt werden. So war hier eine Wiederfindung von lediglich 0,09% der eingesetzten Luteinäquivalentmenge detektiert worden. Außerdem konnte nach Inkubation freies Lutein nachgewiesen werden, welches mit mehr als 60% den höheren Anteil an der aufgenommenen Menge an LÄ ausmachte. Der Nachweis von freiem Lutein zeigte, dass eine hydrolytische Spaltung von Luteinestern stattgefunden hatte. Demnach waren membranständig im Bürstensaum der Enterocyten Enzyme mit hydrolytischer Aktivität vorhanden, die Luteinester aus dem Kulturmedium zu freiem Lutein spalten konnten. Die zelluläre Aufnahme des Wirkstoffes wurde dadurch erleichtert und Lutein konnte bevorzugt mittels einfacher Diffusion in die Zelle absorbiert werden [69, 70]. Ein möglicherweise weiteres Indiz für die uneingeschränkte Aktivität von membranständigen Enzymen konnte bei Inkubation der Zellen mit Lutein gezeigt werden. Hier waren zuvor keine Luteinester in der Probe nachweisbar. Nach Inkubation konnten in den Zellextrakten Luteinmonoester detektiert werden. Demnach hat hier scheinbar eine Veresterung von Lutein *in vitro* stattgefunden. Inwiefern diese auf enzymatische Aktivität zurückzuführen ist (Lipasen) oder spontan

stattgefunden hat, ist nicht eindeutig definierbar. Spontane Veresterung von Lutein zu Luteinestern konnten bereits ab Temperaturen von 30°C dokumentiert werden [207] und wären so in Zellkulturversuchen bei 37°C ebenso möglich. In dieser Versuchsanordnung wurde gezeigt, dass Luteinmonoester in die Zellen gelangen können. Wahrscheinlich konnten sie aufgrund ihrer Molekülgröße (≈ 807 Da) passiv diffundieren. Die einfache Diffusion von Molekülen durch Membranen ist in Abhängigkeit ihrer Struktur bis zu einer Größe von ≤ 1.000 Da möglich [266, 267]. Dagegen können geladene Moleküle wie z.B. Ionen oder auch hochmolekulare Substanzen auf diesem Wege nicht in die Zellen gelangen [268]. Die Aufnahme von freiem Zeaxanthin und Zeaxanthinmonoestern in den Enterocyten wurde bereits in der Literatur beschrieben [269]. Die zugrundeliegenden Transportmechanismen von Xanthophylestern bei zellulärer Aufnahme sind bisher nicht bekannt.

Lutein und Luteinester aus Präemulsionen

Mit den Untersuchungen zur zellulären Aufnahme der Wirkstoffe Lutein und Luteinester in MCT-Öl konnte zunächst gezeigt werden, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen die *in vitro*-Absorption von Lutein und teilweise Luteinmonoestern in Dünndarmepithelzellen möglich ist. In der Erweiterung sollte nun geprüft werden, inwiefern eine gleiche Aufnahmerate durch Inkubation der Zellen mit Lutein und Luteinestern aus einer Präemulsion (M6, M22) detektierbar war bzw. ob eine Steigerung dieser Rate durch Lösung des Wirkstoffes in einer Miniemulsion unter Anwesenheit von Emulgatoren erreicht werden kann. Im Weiteren konnte bei Verwendung der Formulierung M6 (Lutein und Luteinester) untersucht werden, inwiefern ein Anstieg der Konzentration an Luteinäquivalent im Kulturmedium mit einer Steigerung der Absorptionsrate einhergeht. Grundlegend konnte die Aufnahme von Lutein aus der Miniemulsion M22 gezeigt werden. Dabei wurde keine Steigerung der Absorptionsrate durch die Anwesenheit von Tween 80 und Biozate 1 erreicht. Gegensätzlich wurde eine geringere zelluläre Aufnahme als bei Inkubation mit Lutein in MCT-Öl detektiert. Die zelluläre Aufnahme des Wirkstoffes konnte hier durch die Zugabe der Emulgatoren nicht förderlich beeinflusst werden. Weiterhin wurde ein geringfügiger Anstieg von Luteinmono- und diestern in den Zellextrakten detektiert. Es stellte sich die Frage, ob bei der verwendeten Konzentration an Luteinäquivalent ($1,6 \mu\text{M}$) bereits Sättigungseffekte auftraten, welche eine weitere Aufnahme von Lutein verhinderten bzw. zum Efflux führten. Vielmehr könnte eine Schädigung der Zellen die veränderte Absorption hervorgerufen haben. Lutein verzeichnete in den Viabilitätsassays bereits bei $0,2 \mu\text{M}$ eine wachstumshemmende Wirkung. Veränderungen in der Membranintegrität

könnten so auch den ungerichteten Eintritt von größeren Molekülen, wie Luteindiestern ermöglichen bzw. eine Störung der Stoffwechsellage der Zellen bewirkt haben. Die Frage stellt sich hier, inwiefern die Versuchsbedingungen *in vitro* für M22 korrekt abgebildet wurden. Dagegen konnte für die Miniemulsion M6 die erwartete Korrelation zwischen Konzentrationsanstieg und Zunahme der zellulären Aufnahme der Wirkstoffe gezeigt werden. In den zugehörigen Zellextrakten waren Lutein und Luteinmonoester qualitativ erfasst worden. Geringe Mengen an Luteindiestern waren ebenso detektierbar, lagen jedoch außerhalb des LOQ. Möglicherweise waren dies Artefakte aus der Probenaufarbeitung. Grundsätzlich bestätigten die Ergebnisse einen gerichteten und präferierten Transport bzw. leichtere Diffusion von Lutein in die Zellen, während Luteinester nur als Monoester aufgenommen wurden. Es war dabei zu vermuten, dass eine hydrolytische Spaltung der Luteinester zur effektiven Aufnahme von Lutein in den Enterocyten beiträgt. Dabei scheinen Luteinester nur bedingt als Substrat von den spezifischen Enzymen genutzt zu werden. Eine Hydrolyse der Luteinester fand sehr langsam und möglicherweise nur partiell statt, was eine vermehrte Entstehung von Monoestern begründen würde. Eine sehr niedrige Umsetzungsrate von Luteinestern durch hydrolytische Enzyme konnte bereits belegt werden [67, 239]. Dabei wurde auch gezeigt, dass andere Carotinoide wie z.B. Retinylpalmitat bevorzugt und adäquat von Lipasen gespalten werden [67]. Unabhängig davon konnte in der vorliegenden Arbeit wiederholt gezeigt werden, dass eine Aufnahme von Luteinmonoestern in den Enterocyten ohne vorherigen Turnover zu Lutein möglich ist. Eine in anderen Studien nachgewiesene verbesserte Aufnahme von Luteinestern durch Lösung in MCT-Öl konnte hier nicht festgestellt werden [94]. Die detektierten Aufnahmeraten aus der luteinhaltigen Miniemulsion bestätigen Ergebnisse von Frede et al. (2014). Die Wissenschaftler konnten bei der Inkubation von HT-29 Zellen mit luteinhaltigen Emulsionen (0,5 μM) eine zelluläre Aufnahme von 1,3 $\text{pmol}/10^6$ Zellen zeigen [53]. Der verwendete Emulgator war in diesem Fall β -Lactoglobulin (0,00105%). Mit alleiniger bzw. zusätzlicher Verwendung von Biozate 1 konnte die Aufnahme von Lutein jeweils gesteigert werden [53]. Diese Aufnahmeraten konnten in der vorliegenden Arbeit nicht erreicht werden. Die in den Inkubationsmedien befindlichen Mengen an Biozate 1 ($\leq 0,0004\%$) waren sehr viel niedriger und haben somit möglicherweise keinen weiteren positiven Effekt für eine Steigerung der Absorption hervorgerufen. Eventuell setzte die Verwendung einer Wirkstoffkombination aus Lutein und Luteinestern die Aufnahmerate ebenso herab. Die hydrolytische Spaltung von Luteinestern oder auch konkurrierende Interaktionen mit der Membran oder Transportproteinen könnten die Absorption von Lutein

eingeschränkt bzw. verlangsamt haben. Dies wiederum ließ den Schluß zu, dass eine Wirkstoffkombination zwar auch freies Lutein zur Aufnahme bereitstellt, aber die Bioverfügbarkeit in Summe durch konkurrierende Stoffwechselaktivitäten herabsetzen könnte. Da bis dato keine Publikationen mit analogen *in vitro* Untersuchungen zu Luteinestern vorliegen, konnten die Daten nicht erweitert diskutiert werden. Für die Entwicklung einer Endrezeptur des NEMs konnte hinsichtlich des Kosten-Nutzen-Aufwands das Einbringen von nur einem Wirkstoffträger empfohlen werden.

Einfluss des Micellarisierungsgrades auf die zelluläre Aufnahme der Wirkstoffe aus Präemulsionen

Aufbauend aus den vorherigen Erkenntnissen zur zellulären Aufnahme stellte sich nun die Frage, inwiefern ein *in vitro*-Verdau mit einhergehender Micellarisierung der Wirkstoffe die Bioverfügbarkeit von Luteinestern, aber auch Lutein und Luteinestern in einer Wirkstoffkombination adäquat verbessert und *in vivo*-Bedingungen genauer simuliert. Dazu wurde das zuvor verwendete zelluläre Absorptionsmodell modifiziert und die Wirkstoffaufnahme über zwei verschiedene Wege untersucht (Abbildung 24). Die ausgewählten Miniemulsionen (MO4, MO6) wurden hierzu direkt in das Kulturmedium verdünnt bzw. zunächst einem *in vitro*-Verdau unterzogen und dann dem Kulturmedium hinzugegeben.

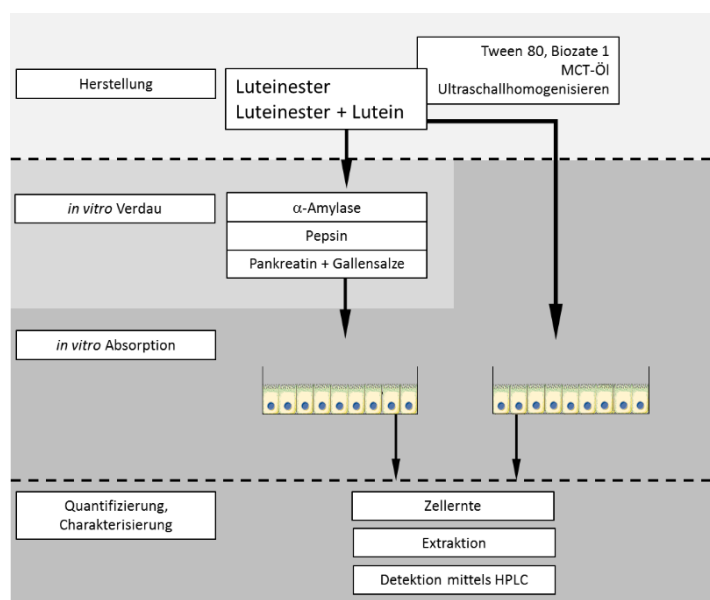


Abbildung 24 Schematischer Ablauf der Untersuchungen zum Einfluss des Micellarisierungsgrades auf die zelluläre Aufnahme der Wirkstoffe aus Präemulsionen *in vitro*.

Nach der Quantifizierung der aufgenommenen Menge an Luteinäquivalent aus den jeweiligen Formulierungen zeigte sich, dass Luteinester allein in sehr viel geringeren Mengen von den Zellen aufgenommen wurden, als aus einer Wirkstoffkombination mit Lutein. Die absolute Absorptionsrate aus der unverdauten Miniemulsion MO4 war jedoch vergleichbar mit den zuvor detektierten Raten von Luteinestern in MCT-Öl und Luteinestern aus einer Miniemulsion. Ein Turnover der Luteinester zu freiem Lutein konnte nur begrenzt beobachtet werden. Möglicherweise kann die sehr niedrige detektierte Menge auch auf die Akkumulation von Lutein aus dem Präparat zurückgeführt werden. Lutein wurde stets nur in geringen Mengen in Oleoresin bzw. den daraus präparierten Miniemulsionen dokumentiert. Bei einer favorisierten Aufnahme von Lutein in den Enterocyten könnten diese geringen Luteinmengen vermehrt in den Enterocyten aufgenommen worden sein. Dies würde aber auch bedeuten, dass die Hydrolyserate der Luteinester sehr gering war. Weiterhin ist zu beachten, dass hier die Inkubationszeit um 24 h verkürzt wurde. Dies könnte ebenso die verminderte Aufnahmerate und enzymatische Spaltung von Luteinestern zu freiem Lutein begründen. Zugleich konnte auch für die Miniemulsion mit der Wirkstoffkombination Lutein und Luteinester (MO6) eine geringere zelluläre Aufnahme an LÄ sowie ein niedriger Luteinanteil als in den vorangegangenen Versuchen mit M6 beobachtet werden. Dies unterstützte die These, dass eine Verkürzung der Inkubationszeit einen markanten Einfluss auf die Resorptions- und Absorptionsverfügbarkeit von Lutein und Luteinestern hatte. Im Vergleich zu luteinesterhaltigen Miniemulsionen konnte in diesem Fall ein höherer Anteil an Lutein in den Zellen detektiert werden, als bei der Aufnahme von Luteinestern allein. Dies zeigte, dass freies Lutein leichter diffundieren kann bzw. für den Transport in den Enterocyten direkt zur Verfügung stand und so schneller aufgenommen werden konnte. Möglicherweise zeigte sich hier auch ein Einfluss der zur Herstellung verwandten Emulgiertechnik. Für die Miniemulsionen MO4 und MO6 wurde bei Herstellung einzig die Ultraschallhomogenisierung eingesetzt. Grundsätzlich hatte dies keinen Einfluss auf die Partikelgrößenverteilung. Beide Emulsionen lagen als Miniemulsionen vor. Eventuell hatte ein minimaler Unterschied im Grad der Emulgierung Einfluss auf Wechselwirkungen innerhalb der wirkstoffhaltigen Partikel bzw. an ihren Oberflächen oder auch auf die Extrahierbarkeit der Wirkstoffe. Eine verminderte Zugänglichkeit führte zu einer veränderten Resorptionsverfügbarkeit der Wirkstoffe und könnte so zur verminderten zellulären Aufnahme beigetragen haben.

Eine deutliche Veränderung der Absorption der Wirkstoffe konnte nach Inkubation der zuvor verdauten analogen Miniemulsionen beobachtet werden. Für beide Formulierungen wurde die

zelluläre Aufnahme annähernd um das dreifache erhöht. Weiterhin stiegen die absoluten Absorptionsraten an. Dabei wurde für die luteinesterhaltige Formulierung eine höhere Absorptionsrate erreicht. Die Ergebnisse belegten, dass eine durch *in vitro*-Verdau initiierte Micellarisierung von Lutein und Luteinestern die Absorption vorantrieb. Weiterhin wurde hier gezeigt, dass diese Micellarisierung Voraussetzung für die Aufnahme von hydrophoben Substanzen in den Enterocyten ist. Eine Interaktion mit der sogenannten „*unstirred water layer*“ der Bürstensaummembran des Dünndarmepithels wurde ermöglicht. Dies wiederum begünstigte die transzelluläre Aufnahme der Wirkstoffe. Neben Lutein konnten in den extrahierten Zellpellets auch Luteinmono- und diester detektiert werden. Dabei blieb ungeklärt, ob die Luteindiester tatsächlich in die Caco-2 Zellen diffundiert bzw. transportiert wurden. Möglicherweise konnte dieser Nachweis auch durch das Anhaften bzw. durch membranständige Interaktionen der Luteindiester zustande gekommen sein. Mit einer Molekülgröße von über 1.000 Da (Luteindipalmitat 1.045,7 Da [270]) scheint eine passive Diffusion in die Zellen eher unwahrscheinlich. Bisher sind aus der Literatur keine Untersuchungen bekannt, die einen Nachweis der Aufnahmen von Luteindiestern in den Enterocyten belegen würden.

Luteinester aus Fertigrezepturen und Präemulsionen

Zur endgültigen Abschätzung und Bewertung der Resorptions- und Absorptionsverfügbarkeit von Fertigrezepturen mit Luteinestern in einem NEM wurden diese hinsichtlich der zellulären Wirkstoffaufnahme in Caco-2 Zellen untersucht. Die eingesetzten Konzentrationen der Inkubationsansätze wurden individuell an die technischen Anforderungen des Zellkulturversuchs und gleichzeitig aufgrund ihrer physiologischen Relevanz verwendet (Verdünnungen beim Durchlaufen der Magen-Darm-Passage). Damit sollten annähernd *in vivo*-Bedingungen geschaffen werden. Ergänzende Untersuchungen erfolgten gleichzeitig mit den Miniemulsionen M5 und M6. Diese wurden dabei mit einer um das zehnfache erhöhten Konzentration an Luteinäquivalent im Vergleich zu den Fertigrezepturen eingesetzt. Diese Konzentrationen entsprachen in keinem Fall den physiologischen Bedingungen, garantierten jedoch eine detektierbare Absorption der Wirkstoffe. Es sollte hier erneut eine Bewertung des Einsatzes einer Wirkstoffkombination im Vergleich zu den luteinesterhaltigen Fertigrezepturen ermöglicht werden. Die Versuche zeigten, dass Luteinester aus den Fertigrezepturen in einem sehr viel geringeren Maße von den Dünndarmepithelzellen aufgenommen wurden, als dies zuvor bei Oleoresin in MCT-Öl bzw. den luteinesterhaltigen Präemulsionen beobachtet wurde. Auch hier schienen Interaktionen der hinzugefügten Rezepturbestandteile einen Einfluss auf das Milieu und den

Stoffwechselumsatz hervorzurufen. Dies stand im Einklang mit den gezeigten wachstumshemmenden Effekten auf Caco-2 Zellen in den Viabilitätsassays ausgelöst durch die Inkubation mit Fertigrezepturen in gleicher Konzentration, wie in den Absorptionsstudien sowie zur geringeren Resorptionsverfügbarkeit der Luteinester nach *in vitro*-Verdau. Wie in den Absorptionsversuchen zuvor, konnte auch hier vermehrt Lutein in der zellulär aufgenommenen Menge Luteinäquivalent detektiert werden. In den eigentlichen Rezepturen lag Lutein nur in Mengen unterhalb des LOQ vor. Der Nachweis von höheren Mengen an Lutein statt Luteinestern in den Zellextrakten belegte nocheinmal den begünstigten Transport bzw. Diffusion von Lutein in den Enterocyten, zeigte aber auch die hydrolytische Aktivität anwesender Enzyme Luteinester zu Lutein zu spalten. Der vermehrte bzw. ausschließliche Nachweis von Luteinmonoestern in den Zellen belegt nochmals deren Fähigkeit die Membranen des Enterocyten zu passieren. Zuvor waren in den Fertigrezepturen mit einem sehr viel höheren Anteil fast ausschließlich Luteindiester detektiert worden. Eine partielle bzw. unvollständige Spaltung der Luteindiester könnte ebenso zur Entstehung von Monoestern geführt haben. Luteinmonoester waren dann aufgrund ihrer geringen Molekülgröße in der Lage in die Zelle zu diffundieren. Die Aufnahme von Zeaxanthin und Zeaxanthinmonoestern in Caco-2 Zellen konnten bereits gezeigt werden [269]. Lutein und Zeaxanthin sowie deren Ester weisen fast identische Molekülgrößen unter 1.000 Da auf. Ein Transport über die Membranen mittels passiver Diffusion ist grundsätzlich möglich [266, 267]. Die beobachtete Membrangängigkeit der Monoester wäre möglicherweise auch ein Beleg für den Nachweis von Luteinmonoestern im humanen Blut nach Supplementierung mit Luteinestern [233]. Offen ist bisher, ob im Serum detektierte Monoester intrazellulär direkt in die Chylomikronen verpackt wurden oder, ob es sich hierbei um freies Lutein handelte, welches im weiteren Stoffwechselgeschehen verestert wurde. Eine Steigerung der zellulären Aufnahme der Wirkstoffe durch die Zugabe eines oder mehrerer Emulgatoren in den Fertigrezepturen konnte mit dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Denkbar wäre, dass bereits durch die Verwendung von Tween 80 die Absorption begünstigt wurde. Ein entsprechender Beleg dafür konnte hier nicht gegeben werden. Die weitere Zugabe von Biozate 1 konnte die zelluläre Wirkstoffaufnahme nicht weiter vorantreiben. Die ausgewählten Öle zeigten keinen differenzierbaren, gravierenden Effekt auf die Absorptionsrate der Wirkstoffe. Die Inkubation der Caco-2 Zellen mit einer zehnfachen Menge an Luteinäquivalent aus den Miniemulsionen M5 und M6 führte wie erwartet zu einer höheren zellulären Aufnahme von Luteinäquivalent im Vergleich zu den Fertigrezepturen. Dabei lagen die Absorptionsraten im gleichen Messbereich, wie in den

vorhergehenden Versuchen mit analogen Miniemulsionen. Unterschiede zwischen den Miniemulsionen aufgrund ihrer verschiedenen Emulgatorzusammensetzung konnten nicht festgestellt werden. Wie auch in den Untersuchungen zuvor konnte in der zellulären aufgenommenen Luteinäquivalentmenge hauptsächlich Lutein nachgewiesen werden. Gleichmaßen waren Monoester detektiert worden, während Luteindiester nur bedingt auftraten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine geringfügige Aufnahme von vorrangig Lutein, aber auch Luteinmonoestern in den Enterocyten aus Miniemulsionen und Fertigrezepturen erfolgen kann. Dabei haben bei Einsatz von physiologischen Konzentrationen der Formulierungen weder Tween 80 noch Biozate 1 einen förderlichen Einfluss auf die Absorption. Die zelluläre Aufnahme der Wirkstoffe ist ebenso unabhängig vom verwendeten Öl. Die Micellarisierung der Wirkstoffe durch *in vitro*-Verdau steigert die zelluläre Aufnahme von Wirkstoffen aus Formulierungen mit Lutein und Luteinestern. Demnach wird eine Verbesserung der Resorptionsverfügbarkeit der Luteinester durch pankreatische Enzyme und Gallensalze hervorgerufen. Bei Aufnahme in die Zellen wird Lutein präferiert und gelangt zügig in den Enterocyten. Ebenso können Monoester in die Zellen gelangen, wobei der genaue Transportmechanismus nicht bekannt ist. Wahrscheinlich erfolgt eine Aufnahme, wie auch für Lutein über passive Diffusion, wobei auch der aktive Transport denkbar wäre. Publikationen hinsichtlich der Absorption von Luteinestern liegen bis heute nicht vor. Luteindiester können aufgrund ihrer Molekülgröße nicht über den Weg der einfachen Diffusion in die Enterocyten gelangen. Ihre Aufnahme in die Dünndarmepithelzellen bedarf einer vorherigen hydrolytischen Spaltung mindestens zu Luteinmonoestern bzw. zu freiem Lutein. Aufgrund einer geringeren Substratspezifität entsprechender Enzyme (pankreatische Lipase, - Cholesterolesterase) zu Luteinestern läuft dabei der Turnover zu freiem Lutein nicht adäquat bzw. nur begrenzt ab. Dies begrenzt wiederum die Bioverfügbarkeit von Luteinestern aus kolloidalen Formulierungen.

6 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

In dieser Arbeit wurde die Entwicklung eines Nahrungsergänzungsmittels mit dem sekundären Pflanzenstoff Lutein in Form von Luteinestern in der Darreichungsform eines Sprühstiftes wissenschaftlich begleitet. Als Basis der Rezeptur wurde die Formulierung in einer O/W Miniemulsion gewählt. Es wurden grundlegend Wirkstoffträger (Lutein, Luteinester), Trägerphase (Öl) sowie die Zugabe von Emulgatoren (Tween 80, Biozate 1) und Peptisatoren geprüft. Anhand der Partikelgrößenverteilungen der wirkstofffreien Musteremulsionen bei Herstellung und über einen spezifischen Lagerzeitraum wurden die optimalen Kandidaten ausgewählt und Präemulsionen ohne weitere Zusatzstoffe definiert. Die Verwendung der jeweiligen Kandidaten in der Basiszusammensetzung der Präemulsionen konnte die Ausbildung von den gewünschten Miniemulsionen mit Partikelgrößen $<1 \mu\text{m}$ gewährleisten. Dabei wurden als Wirkstoffträger Oleoresin mit Luteinestern und vergleichend das Präparat Lutein 5% angewendet. Die Lösung der Wirkstoffe erfolgte in der Ölphase in MCT-Öl, welches als optimale Trägerphase bewertet wurde. Aufgrund seiner vorteilhaften Bioverfügbarkeit im humanen Organismus [191] sollte dies zusätzlich die Aufnahme der Wirkstoffe begünstigen. Als alternative Trägerphase stand Rapsöl bereit, welches ebenso die Anforderungen für die Bereitstellung einer O/W Miniemulsion erfüllte. Im Weiteren erwies sich die Anwendung des nichtionischen Emulgators Tween 80 als ideal für die Miniemulsionen. Dieser konnte teilweise durch das Molkenproteinhydrolysat Biozate 1 ersetzt werden. Neben seiner emulgierenden Wirkung und stabilisierenden Eigenschaften gegenüber Lutein [53] stellt Biozate 1 ein leicht resorbierbares Peptidgemisch sowie eine Quelle für essentielle Aminosäuren dar. Durch den partiellen Ersatz des synthetischen Tween 80 konnte so ein physiologisch natürlicher Bestandteil die Rezeptur des NEMs bereichern. Die alleinige Verwendung von Biozate 1 als Emulgator war in den Versuchen als unzureichend gezeigt worden. Die definierten Präemulsionen dienten den Untersuchungen zur Charakterisierung der physikochemischen Stabilität, Resorptions- und Absorptionsverfügbarkeit der jeweiligen Wirkstoffe aus den Miniemulsionen *in vitro*. Nach Abschluss der physikalischen und physikochemischen Untersuchungen der Musterformulierungen und Präemulsionen wurden sechs verschiedene Fertigrezepturen mit Luteinestern konzipiert. Die Formulierungen, welche hier nur Biozate 1 als Emulgator enthielten, erwiesen sich wiederholt als ungeeignet und wurden aus der weiteren Produktentwicklung ausgeschlossen. Die physikalischen Untersuchungen der weiteren vier Fertigrezepturen definierten diese eindeutig als Miniemulsionen. Die

Anordnung der Basisrezeptur mit dem Wirkstoff Luteinester und das angewendete Emulgierverfahren lieferten die gewünschten Grundlagen für das zu konzipierende NEM. Anhand der durchgeführten Resorptionsstudien *in vitro* mit den Fertigrezepturen konnte die Resorptionsverfügbarkeit der Luteinester als gering eingeschätzt werden. Die Zugabe von Biozate 1 zeigte dabei keinen förderlichen Effekt. Nach *in vitro*-Verdau wurde eine Abnahme der Wirkstoffmenge an Luteinestern mit geringfügiger Entstehung von freiem Lutein festgestellt werden. Es erfolgte jedoch nur minimal eine hydrolytische Spaltung der Luteinester durch Lipasen aus den synthetischen Verdauungssäften. Eine niedrige Umsetzungsrate von Luteinestern zu freiem Lutein durch Lipasen war durchaus bekannt [67, 239]. Hinterfragt werden musste jedoch, inwiefern das gewählte *in vitro* Verdaumodell die Magen-Darm-Passage *in vivo* erschöpfend abbildete. Die stärkere Abnahme der Luteinester aus den Fertigrezepturen im Gegensatz zu den analogen Versuchen mit den luteinesterhaltigen Präemulsionen ließ schlußfolgern, dass eine Zugabe weiterer Inhaltstoffe in die Rezeptur das Verdauungsmilieu bzw. das Stoffwechselgeschehen hier negativ beeinflusst hatte. So wurden möglicherweise störende Wechselwirkungen zwischen Rezepturbestandteilen oder weitere Aktivitätseinschränkungen von Enzymen hervorgerufen. In den sich anschließenden Absorptionsstudien sollte geprüft werden, welche Bedeutung die limitierte Resorptionsverfügbarkeit der Luteinester für die Aufnahme der Wirkstoffe in den Enterocyten hatte. Dazu wurden zunächst relevante Inhaltsstoffen, Präemulsionen und Fertigrezepturen hinsichtlich ihrer zytotoxischen Wirkung auf humane Epithelzellen des Dünndarms *in vitro* untersucht und bewertet. Lutein, Tween 80 und teilweise Biozate 1 zeigten eine wachstumhemmende Wirkung bzw. Zytotoxizität bei den gewählten Bedingungen. Die verwendeten Konzentrationen waren jedoch sehr viel höher als physiologisch relevant. Erwähnenswert war ein geringerer hemmender Einfluss von Biozate 1 im Vergleich zu Tween 80 auf die Zellviabilität. Der partielle Austausch des Emulgators durch Biozate 1 bot hier einen Vorteil mit Blick auf die Verträglichkeit der Rezeptur. Der Ersatz des synthetischen Emulgators durch das Molkenproteinhydrolysat könnte möglicherweise die durch Zugabe von Tween 80 bekannte ausgelöste Irritation der Schleimhäute des Dünndarms minimieren [263]. Die Zellviabilitätsprüfungen der Präemulsionen ließen den Schluss zu, dass bei Einsatz der Formulierungen in physiologischen Mengen keine zytotoxische Wirkung zu erwarten war. Konträr verhielten sich die Fertigrezepturen bei Einsatz in physiologischen Konzentrationen in den Zellviabilitätsassays. Hier konnten im Resazurinassay alle Formulierungen als zytotoxisch bewertet werden. Dabei war kein schützender Effekt durch die Zugabe von Biozate 1 auf die Stoffwechselaktivi-

tät zu beobachten. Im Neutralrotassay konnte nur für die Formulierungen mit beiden Emulgatoren verminderte Zellviabilitäten detektiert werden. Da von den Wirkstoffen, Emulgatoren und Ölen in den vorliegenden Konzentrationen keine zytotoxische Wirkung ausging, musste hier vermutet werden, dass weitere Zusatzstoffe in den Fertigrezepturen die Lebensfähigkeit der Zellen stark beeinflusst hatten. Da hauptsächlich die zelluläre Stoffwechselaktivität herabgesetzt wurde, kann vermutet werden, dass teilweise Einschränkungen von Enzymaktivitäten bzw. Interaktionen mit Proteinen ausgelöst wurden. Eine Empfehlung für die Entwicklung des NEMs lag hier in der Anwendung einer einfachen Rezeptur mit limitierter Zugabe von weiteren Inhaltsstoffen. So könnten Interaktionen mit den Basisbestandteilen selbst aber auch im Milieu des Verdauungstraktes vermieden und Barrieren für die zelluläre Aufnahme bzw. Interaktion der Luteinester begrenzt werden. Von den Wirkstoffen Lutein und Luteinester wie auch von der Grundzusammensetzung der Präemulsionen sind in physiologischen Konzentrationsbereichen keine einschränkende Effekte auf das Zellwachstum zu erwarten. Zum Abschluss der Bewertungen wurde die zelluläre Aufnahme der Wirkstoffe aus kolloidalen Formulierungen *in vitro* untersucht. Relevanz hatten dabei die Präemulsionen (direkt und verdaut) sowie die Fertigrezepturen. Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass eine geringfügige Aufnahme von vorrangig Lutein, aber auch Luteinmonoestern in den Enterocyten aus Miniemulsionen und Fertigrezepturen erfolgen konnte. Dabei hatten bei Einsatz von physiologischen Konzentrationen der Formulierungen weder Tween 80 noch Biozate 1 einen förderlichen Einfluss auf die Absorptionsrate von Lutein oder Luteinestern. Anhand der Untersuchungen wurde die Bioverfügbarkeit von Luteinestern aus kolloidalen Formulierungen im Vergleich zu freiem Lutein als gering bewertet.

Zusammenfassend konnten Luteinester als geeignete Wirkstoffe im Rahmen einer Basisrezeptur für eine physikalisch stabile Miniemulsion bewertet werden. Sie sind demnach als Wirkstoffform für eine kolloidale Formulierung in einem Sprühstift nutzbar. Dabei ist die Stabilität der Luteinester gegenüber Lagerungsprozessen und physikochemischen Einflüssen als sehr gut zu beurteilen und übertrifft die von freiem Lutein. Im Rahmen der jeweiligen *in vitro*-Studien zur Bioverfügbarkeit konnte für Luteinester aus kolloidalen Formulierungen eine geringe Resorptionsverfügbarkeit und eine limitierte Absorptionsrate festgestellt werden. Freies Lutein dagegen scheint bevorzugt micellarisiert zu werden, was seine Resorptionsverfügbarkeit erhöht. Die Aufnahme in den Enterocyten findet auch für freies Lutein nur begrenzt statt, was eine ebenso geringe Bioverfügbarkeit von Lutein belegt. Die zelluläre Aufnahme der Luteines-

ter beschränkt sich auf die Aufnahme der Monoester, während die Diester zunächst einer enzymatischen Spaltung bedürfen. Dies hat wiederum einen limitierenden Einfluss auf deren Bioverfügbarkeit.

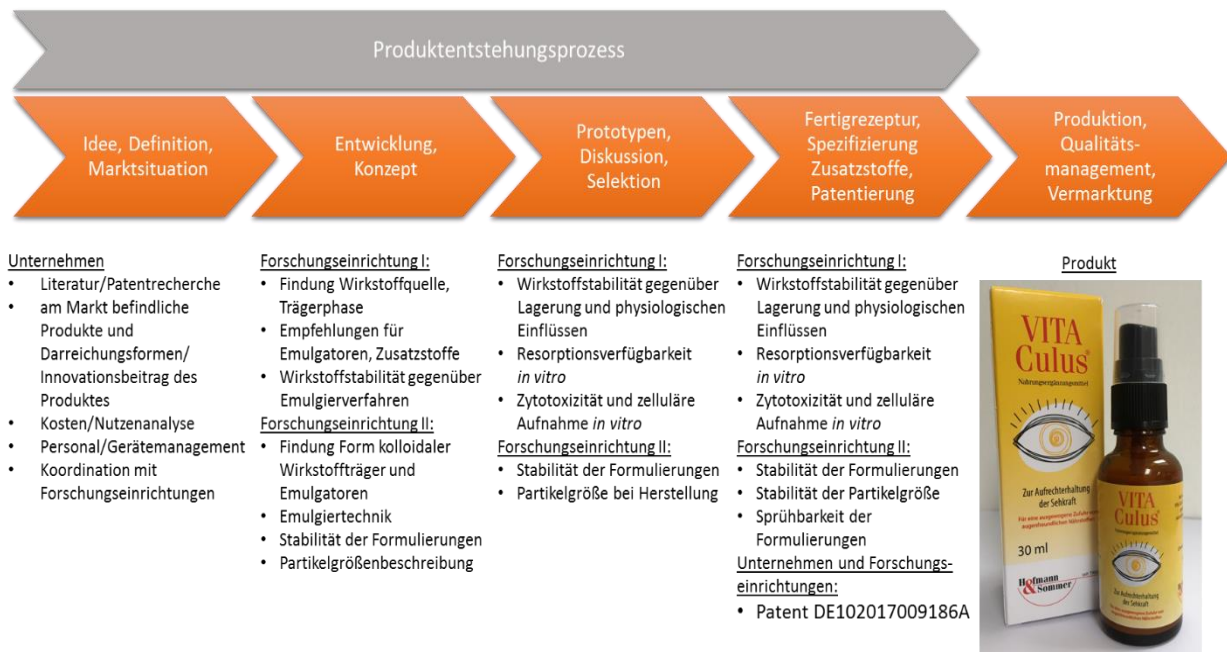


Abbildung 25 Der Produktentstehungsprozess des kolloidalen Nahrungsergänzungsmittels „VITA Culus®“. Forschungseinrichtung I = Universität Potsdam, Forschungseinrichtung II = Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung.

Abschließend wurde unter Berücksichtigung der wissenschaftlichen Erkenntnisse aus den hier dargestellten Untersuchungen im Rahmen des zugehörigen Projektes das Nahrungsergänzungsmittel „VITA Culus®“ mit dem Wirkstoff Luteinester entwickelt und von dem Projektpartner auf den Markt gebracht (Abbildung 25). Ein entsprechendes Patent wurde angemeldet, welches dem Deutschen Patent- und Markenamt unter der Nummer DE102017009186A1 zu entnehmen ist [271]. Das Produkt stellt ein kosteneffizientes, wirkstoffstabiles NEM dar. Die Verwendung der Wirkstoffform Luteinester gewährleistet u.a. eine längere Haltbarkeit gegenüber luteinhaltenen Produkten. Die begrenzte Bioverfügbarkeit von Lutein aus der Esterform sollte berücksichtigt werden. Neben einer ausgewogenen Ernährung, welche ebenso luteinreiche Lebensmittel enthält, ist eine Nahrungsergänzung mit Luteinestern trotzdem sinnvoll, um eine optimale Versorgung mit Lutein für den Erhalt der Sehkraft auch im Alter zu ermöglichen. Die tatsächliche Aufnahme von Lutein und dessen begünstigenden Effekte für die Augengesundheit durch das NEM wurde *in vivo* nicht belegt. Aus der Literatur ist ein Anstieg der Luteinkonzentration

im Blut und teilweise eine Zunahme der Makulapigmentdichte nach Aufnahme von luteinesterhaltigen Supplementen belegt [101, 177, 233, 247]. Um die Bioverfügbarkeit der Luteinester aus dem NEM genauer darstellen zu können, sollten Humanstudien mit dem Produkt als Ergänzung zu den bisherigen Erkenntnissen in Ausblick gestellt werden. Nach kurz- und langfristiger Supplementierung mit dem Präparat könnten die Bestimmung des Anstiegs von Lutein im Blutserum, aber auch Messungen der Makulapigmentdichte durch Augenärzte als Wirkstoffresponse dienen. Weiterhin wäre eine Untersuchung des Verbleibs von in den Enterocyten aufgenommenen Luteinmonoestern interessant, da Transportmechanismen und Verteilung dieser bisher nicht untersucht bzw. publiziert wurden. Allgemein besteht auch weiter Forschungsbedarf hinsichtlich der Bioverfügbarkeit von Luteinestern im humanen Organismus. Im Rahmen des Projektes zur vorliegenden Arbeit waren weiterführende Studien in diesem Umfang zeitlich und kostentechnisch nicht realisierbar.

7 REFERENZEN

1. Bechtold, S., et al., *Bevölkerung im Wandel: Ergebnisse der 14. koordinierten Bevölkerungsvorausberechnung*. 2019, Statistische Bundesamt: Pressekonferenz Statistische Bundesamt, Berlin.
2. Kirkland, J.L., *Translating advances from the basic biology of aging into clinical application*. *Experimental Gerontology*, 2013. **48**(1): p. 1-5.
3. Jura, M. and L.P. Kozak, *Obesity and related consequences to ageing*. *Age (Dordr)*, 2016. **38**(1): p. 23.
4. Bungau, S., et al., *Health Benefits of Polyphenols and Carotenoids in Age-Related Eye Diseases*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. **2019**: p. 9783429.
5. Pauleikhoff, D., et al., *Neovaskuläre altersabhängige Makuladegeneration in Deutschland*. *Der Ophthalmologe*, 2008. **106**(3): p. 242.
6. Wong, W.L., et al., *Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis*. *The Lancet Global Health*, 2014. **2**(2): p. e106-e116.
7. Age-Related Eye Disease Study 2 Research, G., *Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial*. *JAMA*, 2013. **309**(19): p. 2005-15.
8. Dawczynski, J., et al., *Long term effects of lutein, zeaxanthin and omega-3-LCPUFAs supplementation on optical density of macular pigment in AMD patients: the LUTEGA study*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2013. **251**(12): p. 2711-23.
9. Rea, I.M., et al., *Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 586.
10. Ter Horst, R., et al., *Host and Environmental Factors Influencing Individual Human Cytokine Responses*. *Cell*, 2016. **167**(4): p. 1111-1124 e13.
11. Govindaraju, D., G. Atzmon, and N. Barzilai, *Genetics, lifestyle and longevity: Lessons from centenarians*. *Appl Transl Genom*, 2015. **4**: p. 23-32.
12. Rea, J.N., et al., *Genes and life-style factors in BELFAST nonagenarians: Nature, Nurture and Narrative*. *Biogerontology*, 2015. **16**(5): p. 587-97.
13. Barzilai, N., et al., *The critical role of metabolic pathways in aging*. *Diabetes*, 2012. **61**(6): p. 1315-22.
14. Mc Auley, M.T., et al., *Modelling the molecular mechanisms of aging*. *Biosci Rep*, 2017. **37**(1).
15. Binic, I., et al., *Skin ageing: natural weapons and strategies*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013: p. 827248.
16. Velarde, M.C., et al., *Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin*. *Aging (Albany NY)*, 2012. **4**(1): p. 3-12.
17. Atlantis, E., et al., *Lifestyle factors associated with age-related differences in body composition: the Florey Adelaide Male Aging Study*. *Am J Clin Nutr*, 2008. **88**(1): p. 95-104.
18. St-Onge, M.P. and D. Gallagher, *Body composition changes with aging: the cause or the result of alterations in metabolic rate and macronutrient oxidation?* *Nutrition*, 2010. **26**(2): p. 152-5.

19. The Angiogenesis Foundation - One Broadway, t.f., Cambridge, MA 02142, (617) 401-2779 *Age-related maculadegeneration*. abgerufen 2019.
20. Finger, R.P., et al., *Prevalence and causes of registered blindness in the largest federal state of Germany*. Br J Ophthalmol, 2011. **95**(8): p. 1061-7.
21. Klein, R., et al., *Harmonizing the Classification of Age-related Macular Degeneration in the Three-Continent AMD Consortium*. Ophthalmic Epidemiology, 2014. **21**(1): p. 14-23.
22. Vingerling, J.R., et al., *The prevalence of age-related maculopathy in the Rotterdam Study*. Ophthalmology, 1995. **102**(2): p. 205-10.
23. Korb, C.A., et al., *Prevalence of age-related macular degeneration in a large European cohort: results from the population-based Gutenberg Health Study*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2014. **252**(9): p. 1403-11.
24. Klein, R., et al., *Lipids, Lipid Genes, and Incident Age-Related Macular Degeneration: The Three Continent Age-Related Macular Degeneration Consortium*. American Journal of Ophthalmology, 2014. **158**(3): p. 513-524.
25. Moore, D.J. and G.M. Clover, *The effect of age on the macromolecular permeability of human Bruch's membrane*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2001. **42**(12): p. 2970-2975.
26. Klein, R., et al., *The relationship of age-related maculopathy, cataract, and glaucoma to visual acuity*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995. **36**(1): p. 182-91.
27. Stefansson, E., A. Geirsdottir, and H. Sigurdsson, *Metabolic physiology in age related macular degeneration*. Progress in Retinal and Eye Research, 2011. **30**(1): p. 72-80.
28. Lim, L.S., et al., *Age-related macular degeneration*. Lancet, 2012. **379**(9827): p. 1728-38.
29. BVO and DOG, *Leitlinie Nr. 21 Altersabhängige Makuladegeneration AMD*. Leitlinie, 2015.
30. *Argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy. Three-year results from randomized clinical trials*. Macular Photocoagulation Study Group. Arch Ophthalmol, 1986. **104**(5): p. 694-701.
31. *Argon laser photocoagulation for senile macular degeneration. Results of a randomized clinical trial*. Arch Ophthalmol, 1982. **100**(6): p. 912-8.
32. Pauleikhoff, D. and G. Spital, *Photodynamische Therapie bei der altersabhängigen Makuladegeneration*, in *Deutsches Ärzteblatt*. 2005. p. 102: A 3186–3190 [Heft 46].
33. Klaver, C.C., et al., *Age-specific prevalence and causes of blindness and visual impairment in an older population: the Rotterdam Study*. Arch Ophthalmol, 1998. **116**(5): p. 653-8.
34. Tielsch, J.M., et al., *Diabetes, intraocular pressure, and primary open-angle glaucoma in the Baltimore Eye Survey*. Ophthalmology, 1995. **102**(1): p. 48-53.
35. Evans, J.R., et al., *Prevalence of visual impairment in people aged 75 years and older in Britain: results from the MRC trial of assessment and management of older people in the community*. Br J Ophthalmol, 2002. **86**(7): p. 795-800.
36. Reynolds, R., B. Rosner, and J.M. Seddon, *Serum lipid biomarkers and hepatic lipase gene associations with age-related macular degeneration*. Ophthalmology, 2010. **117**(10): p. 1989-95.
37. Snow, K.K. and J.M. Seddon, *Do age-related macular degeneration and cardiovascular disease share common antecedents?* Ophthalmic Epidemiol, 1999. **6**(2): p. 125-43.

38. Chakravarthy, U., et al., *Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis*. BMC Ophthalmol, 2010. **10**: p. 31.
39. Seddon, J.M., et al., *Progression of age-related macular degeneration: association with body mass index, waist circumference, and waist-hip ratio*. Arch Ophthalmol, 2003. **121**(6): p. 785-92.
40. Darzins, P., P. Mitchell, and R.F. Heller, *Sun exposure and age-related macular degeneration. An Australian case-control study*. Ophthalmology, 1997. **104**(5): p. 770-6.
41. Deutschen Ophthalmologische Gesellschaft, B.d.A.D., *Leitlinie Nr. 21 Altersabhängige Makuladegeneration AMD*. 2015.
42. Deutschen Ophthalmologische Gesellschaft, R.G., Berufsverband der Augenärzte Deutschlands, *Stellungnahme von DOG, Retinologische Gesellschaft und BVA zu Nahrungsergänzungsmitteln bei AMD*. 2014.
43. Ferris, F.L., 3rd, et al., *Clinical classification of age-related macular degeneration*. Ophthalmology, 2013. **120**(4): p. 844-51.
44. Biesalski, H., Grimm P, *Taschenatlas der Ernährung*. 2007. **4**.
45. Yabuzaki, J., *Carotenoids Database*.
46. Yabuzaki, J., *Carotenoids Database: structures, chemical fingerprints and distribution among organisms*. Database (Oxford), 2017.
47. Karrer, P., Helfenstein, A., Wehrli, H., Wettstein, A., *Pflanzenfarbstoffe. XXV. Über die Konstitution des Lycopins und Carotins*. Acta 1930. **14**: p. 154-162.
48. Britton, G., *Structure and properties of carotenoids in relation to function*. FASEB J, 1995. **9**(15): p. 1551-8.
49. *Nomenclature of carotenoids (rules approved 1974)*. 1975. **41**(3): p. 405.
50. Kim, J. and D. DellaPenna, *Defining the primary route for lutein synthesis in plants: the role of Arabidopsis carotenoid beta-ring hydroxylase CYP97A3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(9): p. 3474-9.
51. Frede, K., et al., *Carotenoid biosynthesis of pak choi (Brassica rapa ssp. chinensis) sprouts grown under different light-emitting diodes during the diurnal course*. Photochem Photobiol Sci, 2018. **17**(10): p. 1289-1300.
52. Eichenberger, W. and E.C. Grob, *Beitrage Zur Chemie Der Pflanzlichen Plastiden .3. Uber Das Vorkommen Von Lutein-3-Linolenat in Gelben Herbstblättern Von Acer Platanoides (L.)*. Helvetica Chimica Acta, 1963. **46**(6): p. 2411-&.
53. Frede, K., et al., *Stability and cellular uptake of lutein-loaded emulsions*. Journal of Functional Foods, 2014. **8**: p. 118-127.
54. Putzbach, K., et al., *Structure determination of partially deuterated carotenoids from intrinsically labeled vegetables by HPLC-MS and 1H NMR*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(3): p. 671-7.
55. Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle P., *Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 6. Auflage*. Springer, 2008.
56. Ebermann, R., Elmadfa, I., *Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung, 2. Auflage*. Springer, 2011.
57. Sommerburg, O., et al., *Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes*. Br J Ophthalmol, 1998. **82**(8): p. 907-10.

58. Eisenbrand, G.S., P., *Römpp Lexikon, Lebensmittelchemie*. Georg Thieme Verlag KG, 2. Auflage. 2006.
59. Bhattacharyya, S., et al., *Lutein content and in vitro antioxidant activity of different cultivars of Indian marigold flower (Tagetes patula L.) extracts*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(14): p. 8259-64.
60. Peter, G.F. and J.P. Thornber, *Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins*. J Biol Chem, 1991. **266**(25): p. 16745-54.
61. van den Berg, H. and T. van Vliet, *Effect of simultaneous, single oral doses of beta-carotene with lutein or lycopene on the beta-carotene and retinyl ester responses in the triacylglycerol-rich lipoprotein fraction of men*. Am J Clin Nutr, 1998. **68**(1): p. 82-9.
62. Faulks, R.M. and S. Southon, *Challenges to understanding and measuring carotenoid bioavailability*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1740**(2): p. 95-100.
63. Baumüller, S., *Die Altersabhängige Makuladegeneration: Ein Leitfaden für Betroffene*. . BOD Books on Demand, 2016.
64. Chung, R.W.S., et al., *Liberation of lutein from spinach: Effects of heating time, microwavereheating and liquefaction*. Food Chemistry, 2019. **277**: p. 573-578.
65. Pape, H.-C., A. Kurtz, and S. Silbernagel, *Physiologie, 8. Auflage*. Georg Thieme Verlag KG, 2018.
66. Khachik, F., et al., *Separation and identification of carotenoids and their oxidation products in the extracts of human plasma*. Anal Chem, 1992. **64**(18): p. 2111-22.
67. Breithaupt, D.E., A. Bamedi, and U. Wirt, *Carotenol fatty acid esters: easy substrates for digestive enzymes?* Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2002. **132**(4): p. 721-8.
68. Chen, J.C.H., et al., *Structure of bovine pancreatic cholesterol esterase at 1.6 angstrom: Novel structural features involved in lipase activation*. Biochemistry, 1998. **37**(15): p. 5107-5117.
69. Reboul, E., et al., *Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI)*. Biochem J, 2005. **387**(Pt 2): p. 455-61.
70. Kiefer, C., et al., *A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(16): p. 10581-6.
71. Cai, L., et al., *Scavenger receptor class B type I reduces cholesterol absorption in cultured enterocyte CaCo-2 cells*. J Lipid Res, 2004. **45**(2): p. 253-62.
72. Cai, S.F., et al., *Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine*. J Lipid Res, 2001. **42**(6): p. 902-9.
73. Werder, M., et al., *Role of scavenger receptors SR-BI and CD36 in selective sterol uptake in the small intestine*. Biochemistry, 2001. **40**(38): p. 11643-50.
74. Sato, Y., et al., *Involvement of Cholesterol Membrane Transporter Niemann-Pick C1-Like 1 in the Intestinal Absorption of Lutein*. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2012. **15**(2): p. 256-264.
75. Altmann, S.W., et al., *Niemann-Pick C1 like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption*. Science, 2004. **303**(5661): p. 1201-1204.
76. Raldua, D. and P.J. Babin, *BLT-1, a specific inhibitor of the HDL receptor SR-BI, induces a copper-dependent phenotype during zebrafish development*. Toxicol Lett, 2007. **175**(1-3): p. 1-7.

-
77. Furr, H.C. and R.M. Clark, *Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids*. Journal of Nutritional Biochemistry, 1997. **8**(7): p. 364-377.
 78. Yeum, K.J. and R.M. Russell, *Carotenoid bioavailability and bioconversion*. Annu Rev Nutr, 2002. **22**: p. 483-504.
 79. Sato, Y., et al., *Intracellular uptake mechanism of lutein in retinal pigment epithelial cells*. J Pharm Pharm Sci, 2013. **16**(3): p. 494-501.
 80. During, A., S. Doraiswamy, and E.H. Harrison, *Xanthophylls are preferentially taken up compared with beta-carotene by retinal cells via a SRBI-dependent mechanism*. J Lipid Res, 2008. **49**(8): p. 1715-24.
 81. Bernstein, P.S., et al., *Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease*. Prog Retin Eye Res, 2016. **50**: p. 34-66.
 82. Reboul, E., *Mechanisms of Carotenoid Intestinal Absorption: Where Do We Stand?* Nutrients, 2019. **11**(4).
 83. Werner, S. and V. Bohm, *Bioaccessibility of Carotenoids and Vitamin E from Pasta: Evaluation of an in Vitro Digestion Model*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(4): p. 1163-1170.
 84. Rodriguez-Amaya, D.B., *Status of carotenoid analytical methods and in vitro assays for the assessment of food quality and health effects*. Current Opinion in Food Science, 2015. **1**: p. 56-63.
 85. Donhowe, E.G. and F.B. Kong, *Beta-carotene: Digestion, Microencapsulation, and In Vitro Bioavailability*. Food and Bioprocess Technology, 2014. **7**(2): p. 338-354.
 86. Saini, R.K., S.H. Nile, and S.W. Park, *Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities*. Food Res Int, 2015. **76**(Pt 3): p. 735-750.
 87. Castenmiller, J.J. and C.E. West, *Bioavailability and bioconversion of carotenoids*. Annu Rev Nutr, 1998. **18**: p. 19-38.
 88. Khachik, F., et al., *Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health*. Exp Biol Med (Maywood), 2002. **227**(10): p. 845-51.
 89. Palafox-Carlos, H., J.F. Ayala-Zavala, and G.A. Gonzalez-Aguilar, *The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants*. J Food Sci, 2011. **76**(1): p. R6-R15.
 90. Castenmiller, J.J., et al., *The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of beta-carotene and to a lesser extent of lutein in humans*. J Nutr, 1999. **129**(2): p. 349-55.
 91. Rock, C.L. and M.E. Swendseid, *Plasma beta-carotene response in humans after meals supplemented with dietary pectin*. Am J Clin Nutr, 1992. **55**(1): p. 96-9.
 92. Erdman, J.W., Jr., G.C. Fahey, Jr., and C.B. White, *Effects of purified dietary fiber sources on beta-carotene utilization by the chick*. J Nutr, 1986. **116**(12): p. 2415-23.
 93. Mamatha, B.S. and V. Baskaran, *Effect of micellar lipids, dietary fiber and beta-carotene on lutein bioavailability in aged rats with lutein deficiency*. Nutrition, 2011. **27**(9): p. 960-6.
 94. Yao, K., et al., *Improvement of carotenoid bioaccessibility from spinach by co-ingesting with excipient nanoemulsions: impact of the oil phase composition*. Food Funct, 2019.
 95. van Het Hof, K.H., et al., *Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids*. J Nutr, 2000. **130**(3): p. 503-6.
-

96. Borel, P., et al., *Chylomicron beta-carotene and retinyl palmitate responses are dramatically diminished when men ingest beta-carotene with medium-chain rather than long-chain triglycerides*. J Nutr, 1998. **128**(8): p. 1361-7.
97. Kostic, D., W.S. White, and J.A. Olson, *Intestinal absorption, serum clearance, and interactions between lutein and beta-carotene when administered to human adults in separate or combined oral doses*. Am J Clin Nutr, 1995. **62**(3): p. 604-10.
98. Micozzi, M.S., et al., *Plasma carotenoid response to chronic intake of selected foods and beta-carotene supplements in men*. Am J Clin Nutr, 1992. **55**(6): p. 1120-5.
99. van het Hof, K.H., et al., *Influence of feeding different vegetables on plasma levels of carotenoids, folate and vitamin C. Effect of disruption of the vegetable matrix*. Br J Nutr, 1999. **82**(3): p. 203-12.
100. Bowen, P.E., et al., *Esterification does not impair lutein bioavailability in humans*. J Nutr, 2002. **132**(12): p. 3668-73.
101. Yoshizako, H., et al., *Comparison of macular pigment and serum lutein concentration changes between free lutein and lutein esters supplements in Japanese subjects*. Acta Ophthalmol, 2016. **94**(6): p. e411-6.
102. Kijlstra, A., et al., *Lutein: More than just a filter for blue light*. Progress in Retinal and Eye Research, 2012. **31**(4): p. 303-315.
103. Huang, Y.M., et al., *Effect of supplemental lutein and zeaxanthin on serum, macular pigmentation, and visual performance in patients with early age-related macular degeneration*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 564738.
104. Hartmann, D., et al., *Plasma kinetics of zeaxanthin and 3'-dehydro-lutein after multiple oral doses of synthetic zeaxanthin*. Am J Clin Nutr, 2004. **79**(3): p. 410-7.
105. Peng, Y.M., et al., *Micronutrient concentrations in paired skin and plasma of patients with actinic keratoses: effect of prolonged retinol supplementation*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1993. **2**(2): p. 145-50.
106. Johnson, E.J., et al., *Relation among serum and tissue concentrations of lutein and zeaxanthin and macular pigment density*. Am J Clin Nutr, 2000. **71**(6): p. 1555-62.
107. Landrum, J.T., et al., *Analysis of zeaxanthin distribution within individual human retinas*. Methods Enzymol, 1999. **299**: p. 457-67.
108. Rapp, L.M., S.S. Maple, and J.H. Choi, *Lutein and zeaxanthin concentrations in rod outer segment membranes from perifoveal and peripheral human retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(5): p. 1200-9.
109. Schmitz, H.H., et al., *Concentrations of selected carotenoids and vitamin A in human liver, kidney and lung tissue*. J Nutr, 1991. **121**(10): p. 1613-21.
110. Bone, R.A., et al., *Macular pigment response to a supplement containing meso-zeaxanthin, lutein and zeaxanthin*. Nutr Metab (Lond), 2007. **4**: p. 12.
111. Bone, R.A., et al., *Distribution of lutein and zeaxanthin stereoisomers in the human retina*. Exp Eye Res, 1997. **64**(2): p. 211-8.
112. Bone, R.A., et al., *Stereochemistry of the human macular carotenoids*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993. **34**(6): p. 2033-40.
113. Shyam, R., et al., *RPE65 has an additional function as the lutein to meso-zeaxanthin isomerase in the vertebrate eye*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017. **114**(41): p. 10882-10887.
114. Redmond, T.M., *RPE65 takes on another role in the vertebrate retina*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(41): p. 10818-10820.

-
115. Bone, R.A., et al., *Analysis of the macular pigment by HPLC: retinal distribution and age study*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1988. **29**(6): p. 843-9.
 116. Handelman, G.J., et al., *Carotenoids in the human macula and whole retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1988. **29**(6): p. 850-5.
 117. Semba, R.D. and G. Dagnelie, *Are lutein and zeaxanthin conditionally essential nutrients for eye health?* Med Hypotheses, 2003. **61**(4): p. 465-72.
 118. Eperjesi, F. and S. Beatty, *Nutrition and the Eye-A Practical Approach*. Elsevier. 2005. 91-98.
 119. Hughes, D.A., et al., *Effects of lycopene and lutein supplementation on the expression of functionally associated surface molecules on blood monocytes from healthy male nonsmokers*. J Infect Dis, 2000. **182 Suppl 1**: p. S11-5.
 120. Kim, H.W., et al., *Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by dietary lutein in cats*. Vet Immunol Immunopathol, 2000. **73**(3-4): p. 331-41.
 121. Gonzalez de Mejia, E., M. Ramos-Gomez, and G. Loarca-Pina, *Antimutagenic activity of natural xanthophylls against aflatoxin B1 in Salmonella typhimurium*. Environ Mol Mutagen, 1997. **30**(3): p. 346-53.
 122. Park, J.S., B.P. Chew, and T.S. Wong, *Dietary lutein from marigold extract inhibits mammary tumor development in BALB/c mice*. J Nutr, 1998. **128**(10): p. 1650-6.
 123. Park, J.S., et al., *Dietary lutein but not astaxanthin or beta-carotene increases pim-1 gene expression in murine lymphocytes*. Nutr Cancer, 1999. **33**(2): p. 206-12.
 124. Tsubono, Y., S. Tsugane, and K.F. Gey, *Plasma antioxidant vitamins and carotenoids in five Japanese populations with varied mortality from gastric cancer*. Nutr Cancer, 1999. **34**(1): p. 56-61.
 125. Slattery, M.L., et al., *Carotenoids and colon cancer*. Am J Clin Nutr, 2000. **71**(2): p. 575-82.
 126. Panasenko, O.M., et al., *Interaction of peroxynitrite with carotenoids in human low density lipoproteins*. Arch Biochem Biophys, 2000. **373**(1): p. 302-5.
 127. Beckmann, J.S., et al., *Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1994. **375**(2): p. 81-8.
 128. Alpha-Tocopherol, B.C.C.P.S.G., *The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers*. N Engl J Med, 1994. **330**(15): p. 1029-35.
 129. Goodman, G.E., et al., *The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial: incidence of lung cancer and cardiovascular disease mortality during 6-year follow-up after stopping beta-carotene and retinol supplements*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(23): p. 1743-50.
 130. Wang, H., et al., *Vitamin D and Chronic Diseases*. Aging Dis, 2017. **8**(3): p. 346-353.
 131. Dorfler, H.D., *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme, Physik und Chemie*. 2002: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
 132. Köhler, K. and H.P. Schuchmann, *Emulgiertechnik: Grundlagen, Verfahren und Anwendungen, 3. Auflage 2012*: Behr's GmbH, Hamburg.
 133. Schubert, H. and H. Armbruster, *Prinzipien der Herstellung und Stabilität von Emulsionen*. Chemie Ingenieur Technik, 1989. **61**(9): p. 701-711.
 134. Griffin, W.C., *Classification of Surface-Active Agents by "HLB"*. The Journal of the Society of Cosmetic Chemists, 1949. **1**: p. 311-326.
 135. Meisel, H., *Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins*. Curr Med Chem, 2005. **12**(16): p. 1905-19.
-

136. Ricci, I., R. Artacho, and M. Olalla, *Milk protein peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory (ACEI) activity*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2010. **50**(5): p. 390-402.
137. Commission, E., *COMMISSION REGULATION (EU) No 231/2012 of 9 March 2012 laying down specifications for food additives listed in Annexes II and III to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council*. 2012, THE EUROPEAN COMMISSION: Official Journal of the European Union.
138. Food), E.A.P.E.P.o.F.A.a.N.S.A.t., *Scientific Opinion on the re-evaluation of polyoxyethylene sorbitan monolaurate (E 432), polyoxyethylene sorbitan monooleate (E 433), polyoxyethylene sorbitan monopalmitate (E 434), polyoxyethylene sorbitan monostearate (E 435) and polyoxyethylene sorbitan tristearate (E 436) as food additives*. EFSA Journal 2015. **13**(7): p. 74.
139. Ribeiro, H.S., et al., *Cellular uptake of carotenoid-loaded oil-in-water emulsions in colon carcinoma cells in vitro*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(25): p. 9366-9.
140. Khalil, M., et al., *Stability and bioavailability of lutein ester supplements from Tagetes flower prepared under food processing conditions*. Journal of Functional Foods, 2012. **4**(3): p. 602-610.
141. Wang, Y., et al., *Study on the spray-drying encapsulation of lutein in the porous starch and gelatin mixture*. European Food Research and Technology, 2012. **234**(1): p. 157-163.
142. Davidov-Pardo, G., C.E. Gumus, and D.J. McClements, *Lutein-enriched emulsion-based delivery systems: Influence of pH and temperature on physical and chemical stability*. Food Chemistry, 2016. **196**: p. 821-827.
143. Teo, A., et al., *Kinetic stability and cellular uptake of lutein in WPI-stabilised nanoemulsions and emulsions prepared by emulsification and solvent evaporation method*. Food Chemistry, 2017. **221**: p. 1269-1276.
144. Surh, J., E.A. Decker, and D.J. McClements, *Utilisation of spontaneous emulsification to fabricate lutein-loaded nanoemulsion-based delivery systems: factors influencing particle size and colour*. International Journal of Food Science & Technology, 2017. **52**(6): p. 1408-1416.
145. Weigel, F., et al., *Lutein-enriched emulsion-based delivery systems: Influence of emulsifiers and antioxidants on physical and chemical stability*. Food Chemistry, 2018. **242**: p. 395-403.
146. Zhao, C., X. Shen, and M. Guo, *Stability of lutein encapsulated whey protein nano-emulsion during storage*. PLOS ONE, 2018. **13**(2): p. e0192511.
147. Piccaglia, R., M. Marotti, and S. Grandi, *Lutein and lutein ester content in different types of Tagetes patula and T. erecta*. Industrial Crops and Products, 1998. **8**: p. 54-51.
148. Britton, G., S. Liaaen-Jensen, and H. Pfander, *Carotenoids Handbook*. 2004: Birkhäuser Basel.
149. Keck, C.M. and R.H. Müller, *Moderne Arzneiformen & Pharmazeutische Technologie*. 2012.
150. Müller, R.H. and R. Schuhmann, *Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis. Band 38, ed. A. Paperback*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. Stuttgart, 1996.
151. Stuessi, M., *Mechanische Verfahrenstechnik – Partikeltechnologie 1, 3. Auflage*. 2009.
152. Böckenhoff, K. and W. Fischer, *Determination of electrokinetic charge with a particle-charge detector, and its relationship to the total charge*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 2001. **371**(5): p. 670-674.

-
153. Knodt, R., T. Hölzel, and M. Kröger, *Einsatz der Partikelladungsmessung bei der Steuerung bestehender Flockungssysteme zur Senkung von Wasser- und Chemikalienverbräuchen verschiedener Branchen der Keramikherstellung*. 2009, Forschungsinstitut für Anorganische Werkstoffe - Glas/Keramik - GmbH: Höhr-Grenzhausen.
 154. Miller, D.D., et al., *An in vitro method for estimation of iron availability from meals*. Am J Clin Nutr, 1981. **34**(10): p. 2248-56.
 155. Garrett, D.A., M.L. Failla, and R.J. Sarama, *Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals*. J Agric Food Chem, 1999. **47**(10): p. 4301-9.
 156. Reboul, E., et al., *Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(23): p. 8749-55.
 157. Granado-Lorencio, F., et al., *Comparative in vitro bioaccessibility of carotenoids from relevant contributors to carotenoid intake*. J Agric Food Chem, 2007. **55**(15): p. 6387-94.
 158. Sarkar, C.R., et al., *An efficient condition of Saponification of Lutein ester from marigold flower*. Annals of Biological Research, 2012. **3**(3): p. 1461-1466.
 159. Baldermann, S., *Carotenoid Oxygenases from Camellia sinensis, Osmanthus fragrans, and Prunus persica nucipersica*. Vol. 1. 2007, Göttingen: Cuvillier Verlag. 176.
 160. Fogh, J. and G. Trempe, *New Human Tumor Cell Lines*, in *Human Tumor Cells in Vitro.*, J. Fogh, Editor. 1975, Springer, Boston, MA: Boston, MA.
 161. Lea, T., *Caco-2 Cell Line*, in *The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health*, K.V.e. al., Editor. 2015, Springer International Publishing AG Switzerland.
 162. Strober, W., *Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability*. Current Protocols in Immunology, 1997. **21**(1): p. A.3B.1-A.3B.2.
 163. Rampersad, S.N., *Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays*. Sensors (Basel), 2012. **12**: p. 12347-12360.
 164. Riss, T.L., et al., *Cell Viability Assays*, in *Assay Guidance Manual*, G.S. Sittampalam, et al., Editors. 2004, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda (MD).
 165. Silbernagl, S., *Taschenatlas der Physiologie*. 2007: Thieme.
 166. Repetto, G., A. del Peso, and J.L. Zurita, *Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity*. Nat Protoc, 2008. **3**(7): p. 1125-31.
 167. Organization, W.H., *Evaluation of Certain Food Additives: Eighty-sixth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Vol. 965. 2019: World Health Organization.
 168. *DIN 32645: Chemische Analytik; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung*, A.d. NMP, Editor. 2008, Beuth Verlag GmbH.
 169. Zensi, A., et al., *Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones*. J Control Release, 2009. **137**(1): p. 78-86.
 170. Hofmann, A.F. and B. Borgstrom, *Physico-chemical state of lipids in intestinal content during their digestion and absorption*. Fed Proc, 1962. **21**: p. 43-50.
-

171. Breithaupt, D.E., *Enzymatic hydrolysis of carotenoid fatty acid esters of red pepper (Capsicum annuum L.) by a lipase from Candida rugosa*. Z Naturforsch C J Biosci, 2000. **55**(11-12): p. 971-5.
172. Zorn, H., et al., *Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (Tagetes erecta L.) and red paprika (Capsicum annuum L.) by commercial lipases and Pleurotus sapidus extracellular lipase*. Enzyme and Microbial Technology, 2003. **32**(5): p. 623-628.
173. Reboul, E., *Absorption of vitamin A and carotenoids by the enterocyte: focus on transport proteins*. Nutrients, 2013. **5**(9): p. 3563-81.
174. Bone, R.A., et al., *Lutein and zeaxanthin dietary supplements raise macular pigment density and serum concentrations of these carotenoids in humans*. J Nutr, 2003. **133**(4): p. 992-8.
175. Olmedilla, B., et al., *Lutein, but not alpha-tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: a 2-y double-blind, placebo-controlled pilot study*. Nutrition, 2003. **19**(1): p. 21-4.
176. BVO and DOG, *Aktuelle Stellungnahme zu Nahrungsergänzungsmitteln bei altersabhängiger Makuladegeneration (AMD)*. 2014.
177. Arnold, C., et al., *Age-related macular degeneration: Effects of a short-term intervention with an oleaginous kale extract--a pilot study*. Nutrition, 2013. **29**(11-12): p. 1412-7.
178. Huo, T., et al., *Impact of fatty acyl composition and quantity of triglycerides on bioaccessibility of dietary carotenoids*. J Agric Food Chem, 2007. **55**(22): p. 8950-7.
179. Goltz, S.R., et al., *Meal triacylglycerol profile modulates postprandial absorption of carotenoids in humans*. Mol Nutr Food Res, 2012. **56**(6): p. 866-77.
180. Nagao, A., E. Kotake-Nara, and M. Hase, *Effects of fats and oils on the bioaccessibility of carotenoids and vitamin E in vegetables*. Biosci Biotechnol Biochem, 2013. **77**(5): p. 1055-60.
181. Raman, M., et al., *Parenteral Nutrition and Lipids*. Nutrients, 2017. **9**(4).
182. Fell, G.L., et al., *Intravenous Lipid Emulsions in Parenteral Nutrition*. Adv Nutr, 2015. **6**(5): p. 600-10.
183. Sastry, P.S., *Lipids of nervous tissue: composition and metabolism*. Prog Lipid Res, 1985. **24**(2): p. 69-176.
184. Chen, S. and R. Chen, *Docosahexaenoic acid-containing phospholipids and triglycerides based nutritional supplements*. Recent Pat Food Nutr Agric, 2010. **2**(3): p. 213-20.
185. Proudman, S.M., et al., *Fish oil in recent onset rheumatoid arthritis: a randomised, double-blind controlled trial within algorithm-based drug use*. Ann Rheum Dis, 2015. **74**(1): p. 89-95.
186. Ramsden, C.E., et al., *Targeted alteration of dietary n-3 and n-6 fatty acids for the treatment of chronic headaches: a randomized trial*. Pain, 2013. **154**(11): p. 2441-51.
187. Giudetti, A.M. and R. Cagnazzo, *Beneficial effects of n-3 PUFA on chronic airway inflammatory diseases*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2012. **99**(3-4): p. 57-67.
188. Solfrizzi, V., et al., *Diet and Alzheimer's disease risk factors or prevention: the current evidence*. Expert Rev Neurother, 2011. **11**(5): p. 677-708.
189. Calder, P.C., *n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1505s-1519s.

-
190. Writing Group for the, A.R.G., et al., *Effect of long-chain omega-3 fatty acids and lutein + zeaxanthin supplements on cardiovascular outcomes: results of the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial*. JAMA Intern Med, 2014. **174**(5): p. 763-71.
 191. Marten, B., M. Pfeuffer, and J. Schrezenmeir, *Medium-chain triglycerides*. International Dairy Journal, 2006. **16**(11): p. 1374-1382.
 192. Ball, M.J., *Parenteral nutrition in the critically ill: use of a medium chain triglyceride emulsion*. Intensive Care Med, 1993. **19**(2): p. 89-95.
 193. Lin, M.T., et al., *Effects of medium-chain triglyceride in parenteral nutrition on rats undergoing gastrectomy*. Clinical Nutrition, 2002. **21**(1): p. 39-43.
 194. Yeh, S., et al., *Effects of parenteral infusion with medium-chain triglycerides and safflower oil emulsions on hepatic lipids, plasma amino acids and inflammatory mediators in septic rats*. Clin Nutr, 2000. **19**(2): p. 115-20.
 195. Taha, A., et al., *Effect of different oils and ultrasound emulsification conditions on the physicochemical properties of emulsions stabilized by soy protein isolate*. Ultrason Sonochem, 2018. **49**: p. 283-293.
 196. Yuan, X., et al., *Enhancement of phytochemical bioaccessibility from plant-based foods using excipient emulsions: impact of lipid type on carotenoid solubilization from spinach*. Food Funct, 2018. **9**(8): p. 4352-4365.
 197. Jeewanthi, R.K., N.K. Lee, and H.D. Paik, *Improved Functional Characteristics of Whey Protein Hydrolysates in Food Industry*. Korean J Food Sci Anim Resour, 2015. **35**(3): p. 350-9.
 198. Embiriekah, S., et al., *Antioxidant activity, functional properties and bioaccessibility of whey protein hydrolysates*. International Journal of Dairy Technology, 2018. **71**(1): p. 243-252.
 199. IUPAC, *IUPA-Division of physical chemistry, Manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units-Appendix II, Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry, Part I*. Pure Appl Chem, 1971. **31**: p. 577-638.
 200. Hofmann, T., *Kolloide: Die Welt der vernachlässigten Dimensionen*. Chemie in unserer Zeit, 2004. **38**(1): p. 24-35.
 201. McClements, D.J. and J. Rao, *Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2011. **51**(4): p. 285-330.
 202. Gupta, A., et al., *Nanoemulsions: formation, properties and applications*. Soft Matter, 2016. **12**(11): p. 2826-41.
 203. Hielscher, T., *Ultrasonic production of nano-size dispersions and emulsions*. arXiv preprint arXiv:0708.1831, 2007.
 204. Kuhn, K.R. and R.L. Cunha, *Flaxseed oil – Whey protein isolate emulsions: Effect of high pressure homogenization*. Journal of Food Engineering, 2012. **111**(2): p. 449-457.
 205. Subagio, A., H. Wakaki, and N. Morita, *Stability of Lutein and Its Myristate Esters*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1999. **63**(10): p. 1784-1786.
 206. Aman, R., A. Schieber, and R. Carle, *Effects of heating and illumination on trans-cis isomerization and degradation of beta-carotene and lutein in isolated spinach chloroplasts*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(24): p. 9512-8.
 207. Ahmad, F.T., et al., *Effect of temperature on lutein esterification and lutein stability in wheat grain*. Journal of Cereal Science, 2013. **58**(3): p. 408-413.
-

208. Sánchez-Moreno, C., et al., *Vitamin C, Provitamin A Carotenoids, and Other Carotenoids in High-Pressurized Orange Juice during Refrigerated Storage*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(3): p. 647-653.
209. Butz, P., et al., *Ultra-High Pressure Processing of Onions: Chemical and Sensory Changes*. LWT - Food Science and Technology, 1994. **27**(5): p. 463-467.
210. Khachik, F., P.S. Bernstein, and D.L. Garland, *Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997. **38**(9): p. 1802-11.
211. Aparicio-Ruiz, R., M.I. Mínguez-Mosquera, and B. Gandul-Rojas, *Thermal degradation kinetics of lutein, β -carotene and β -cryptoxanthin in virgin olive oils*. Journal of Food Composition and Analysis, 2011. **24**(6): p. 811-820.
212. Tufail Ahmad, F., *Stability and esterification of lutein in bread wheat during postharvest storage in comparison with banana*, in Department of Plant and Food Science. 2013, University of Adelaide.
213. Kaneko, S., T. Nagamine, and T. Yamada, *Esterification of Endosperm Lutein with Fatty Acids during the Storage of Wheat Seeds*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1995. **59**(1): p. 1-4.
214. Elias, R.J., D.J. McClements, and E.A. Decker, *Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase beta-lactoglobulin in oil-in-water emulsions*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(26): p. 10248-53.
215. Tong, L.M., et al., *Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey*. J Agric Food Chem, 2000. **48**(5): p. 1473-8.
216. Jeffrey, B.G., et al., *The role of docosahexaenoic acid in retinal function*. Lipids, 2001. **36**(9): p. 859-871.
217. Bazan, N.G., *Cell survival matters: docosahexaenoic acid signaling, neuroprotection and photoreceptors*. Trends in Neurosciences, 2006. **29**(5): p. 263-271.
218. Lin, L., et al., *Evidence of health benefits of canola oil*. Nutrition Reviews, 2013. **71**(6): p. 370-385.
219. Kruse, M., et al., *Dietary rapeseed/canola-oil supplementation reduces serum lipids and liver enzymes and alters postprandial inflammatory responses in adipose tissue compared to olive-oil supplementation in obese men*. Molecular Nutrition & Food Research, 2015. **59**(3): p. 507-519.
220. Sofos, J.N. and F.F. Busta, *Antimicrobial Activity of Sorbate*. J Food Prot, 1981. **44**(8): p. 614-622.
221. Additives, E.P.o.F. and N.S.a.t. Food, *Scientific Opinion on the re-evaluation of sorbic acid (E 200), potassium sorbate (E 202) and calcium sorbate (E 203) as food additives*. EFSA Journal, 2015. **13**(6): p. 4144.
222. Additives, E.Panel o.F., et al., *Opinion on the follow-up of the re-evaluation of sorbic acid (E200) and potassium sorbate (E202) as food additives*. EFSA Journal, 2019. **17**(3): p. e05625.
223. additives, E.P.o.F. and N.S.a.t. Food, *Scientific Opinion on the re-evaluation of ascorbic acid (E 300), sodium ascorbate (E 301) and calcium ascorbate (E 302) as food additives*. EFSA Journal, 2015. **13**(5): p. 4087.
224. Georgieff, M., et al., *Xylitol, an energy source for intravenous nutrition after trauma*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1985. **9**(2): p. 199-209.

-
225. Goto, Y., et al., *Clinical effects of xylitol on carbohydrate and lipid metabolism in diabetes*. Lancet, 1965. **2**(7419): p. 918-21.
226. Natah, S.S., et al., *Metabolic response to lactitol and xylitol in healthy men*. Am J Clin Nutr, 1997. **65**(4): p. 947-50.
227. Söderling, E.M., *Xylitol, mutans streptococci, and dental plaque*. Adv Dent Res, 2009. **21**(1): p. 74-8.
228. Maguire, A. and A.J. Rugg-Gunn, *Xylitol and caries prevention--is it a magic bullet?* Br Dent J, 2003. **194**(8): p. 429-36.
229. Ly, K.A., P. Milgrom, and M. Rothen, *Xylitol, sweeteners, and dental caries*. Pediatr Dent, 2006. **28**(2): p. 154-63; discussion 192-8.
230. Oku, T. and S. Nakamura, *Threshold for transitory diarrhea induced by ingestion of xylitol and lactitol in young male and female adults*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2007. **53**(1): p. 13-20.
231. EFSA Panel on Dietetic Products, N. and Allergies, *Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to the sugar replacers xylitol, sorbitol, mannitol, maltitol, lactitol, isomalt, erythritol, D-tagatose, isomaltulose, sucralose and polydextrose and maintenance of tooth mineralisation by decreasing tooth demineralisation (ID 463, 464, 563, 618, 647, 1182, 1591, 2907, 2921, 4300), and reduction of post-prandial glycaemic responses (ID 617, 619, 669, 1590, 1762, 2903, 2908, 2920) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006*. EFSA Journal, 2011. **9**(4): p. 2076.
232. Thürmann, P.A., et al., *Plasma kinetics of lutein, zeaxanthin, and 3-dehydro-lutein after multiple oral doses of a lutein supplement*. The American journal of clinical nutrition, 2005. **82**(1): p. 88-97.
233. Granado, F., et al., *Lutein ester in serum after lutein supplementation in human subjects*. British Journal of Nutrition, 1998. **80**(5): p. 445-449.
234. Chandrika, U.G., et al., *Carotenoid content and in vitro bioaccessibility of lutein in some leafy vegetables popular in Sri Lanka*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2010. **56**(3): p. 203-7.
235. Chung, H.Y., H.M. Rasmussen, and E.J. Johnson, *Lutein bioavailability is higher from lutein-enriched eggs than from supplements and spinach in men*. J Nutr, 2004. **134**(8): p. 1887-93.
236. Fernández-García, E., I. Carvajal-Lérida, and A. Pérez-Gálvez, *In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency*. Nutrition Research, 2009. **29**(11): p. 751-760.
237. Hur, S.J., et al., *In vitro human digestion models for food applications*. Food Chemistry, 2011. **125**(1): p. 1-12.
238. Hamosh, M. and R.O. Scow, *Lingual Lipase and Its Role in the Digestion of Dietary Lipid*. The Journal of Clinical Investigation, 1973. **52**(1): p. 88-95.
239. Breithaupt, D.E., A. Alpmann, and F. Carrière, *Xanthophyll esters are hydrolysed in the presence of recombinant human pancreatic lipase*. Food Chemistry, 2007. **103**(2): p. 651-656.
240. Dhuique-Mayer, C., et al., *β -Cryptoxanthin from Citrus juices: assessment of bioaccessibility using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model*. British Journal of Nutrition, 2007. **97**(5): p. 883-890.
-

-
241. Borel, P., et al., *Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets*. J Lipid Res, 1996. **37**(2): p. 250-61.
 242. O'Sullivan, S.M., J.A. Woods, and N.M. O'Brien, *Use of Tween 40 and Tween 80 to deliver a mixture of phytochemicals to human colonic adenocarcinoma cell (CaCo-2) monolayers*. British Journal of Nutrition, 2004. **91**(5): p. 757-764.
 243. Sayers, E.W., et al., *Database resources of the National Center for Biotechnology Information*. Nucleic Acids Res, 2020. **48**(D1): p. D9-d16.
 244. PubChem, *Lutein*, CID=5281243. 2020, National Center for Biotechnology Information.
 245. PubChem, *Cholesteryl palmitate*, CID=246520. 2020, National Center for Biotechnology Information.
 246. PubChem, *Lutein 3'-O-palmitate*, CID=87439880. 2020, National Center for Biotechnology Information.
 247. Granado-Lorencio, F., et al., *Lutein bioavailability from lutein ester-fortified fermented milk: in vivo and in vitro study*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2010. **21**(2): p. 133-139.
 248. Esimbekova, E.N., et al., *Inhibition effect of food preservatives on endoproteinases*. Food Chem, 2017. **235**: p. 294-297.
 249. Wedzicha, B.L., S. Ahmed, and A. Zeb, *Effect of surfactants and dispersed components on the activity and reactivity of sorbic acid*. Food Additives & Contaminants, 1990. **7**(5): p. 695-709.
 250. Rahman, M.A. and M.S. Islam, *Xylitol Improves Pancreatic Islets Morphology to Ameliorate Type 2 Diabetes in Rats: A Dose Response Study*. Journal of Food Science, 2014. **79**(7): p. H1436-H1442.
 251. Amo, K., et al., *Effects of xylitol on metabolic parameters and visceral fat accumulation*. J Clin Biochem Nutr, 2011. **49**(1): p. 1-7.
 252. Uebanso, T., et al., *Effects of Consuming Xylitol on Gut Microbiota and Lipid Metabolism in Mice*. Nutrients, 2017. **9**(7).
 253. Chen, J.C.H., et al., *Structure of Bovine Pancreatic Cholesterol Esterase at 1.6 Å: Novel Structural Features Involved in Lipase Activation*. Biochemistry, 1998. **37**(15): p. 5107-5117.
 254. Kimura, H., et al., *Activation of human pancreatic lipase activity by calcium and bile salts*. J Biochem, 1982. **92**(1): p. 243-51.
 255. Guerrand, D., *Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries*. OCL, 2017. **24**(4): p. D403.
 256. Treichel, H., et al., *A Review on Microbial Lipases Production*. Food and Bioprocess Technology, 2010. **3**(2): p. 182-196.
 257. Anderson, E.M., K.M. Larsson, and O. Kirk, *One Biocatalyst—Many Applications: The Use of Candida Antarctica B-Lipase in Organic Synthesis*. Biocatalysis and Biotransformation, 1998. **16**(3): p. 181-204.
 258. Kruger, C.L., et al., *An innovative approach to the determination of safety for a dietary ingredient derived from a new source: case study using a crystalline lutein product*. Food Chem Toxicol, 2002. **40**(11): p. 1535-49.
 259. Harikumar, K.B., et al., *Toxicity Profile of Lutein and Lutein Ester Isolated From Marigold Flowers (Tagetes erecta)*. International Journal of Toxicology, 2008. **27**(1): p. 1-9.

-
260. Additives, E. Panel o., et al., *Safety and efficacy of lutein and lutein/zeaxanthin extracts from Tagetes erecta for poultry for fattening and laying (except turkeys)*. EFSA Journal, 2019. **17**(5): p. e05698.
261. Anderberg, E.K., C. Nyström, and P. Artursson, *Epithelial transport of drugs in cell culture. VII: Effects of pharmaceutical surfactant excipients and bile acids on transepithelial permeability in monolayers of human intestinal epithelial (Caco-2) cells*. Journal of pharmaceutical sciences, 1992. **81**(9): p. 879-887.
262. Ujhelyi, Z., et al., *Evaluation of cytotoxicity of surfactants used in self-micro emulsifying drug delivery systems and their effects on paracellular transport in Caco-2 cell monolayer*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012. **47**(3): p. 564-573.
263. Chassaing, B., et al., *Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome*. Nature, 2015. **519**(7541): p. 92-6.
264. Palozza, P., et al., *Solubilization and stabilization of β -carotene in niosomes: delivery to cultured cells*. Chemistry and Physics of Lipids, 2006. **139**(1): p. 32-42.
265. During, A., G. Albaugh, and J.C. Smith, Jr., *Characterization of beta-carotene 15,15'-dioxygenase activity in TC7 clone of human intestinal cell line Caco-2*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **249**(2): p. 467-74.
266. Matsson, P. and J. Kihlberg, *How Big Is Too Big for Cell Permeability?* Journal of Medicinal Chemistry, 2017. **60**(5): p. 1662-1664.
267. Pye, C.R., et al., *Nonclassical Size Dependence of Permeation Defines Bounds for Passive Adsorption of Large Drug Molecules*. Journal of Medicinal Chemistry, 2017. **60**(5): p. 1665-1672.
268. Yang, N.J. and M.J. Hinner, *Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins*. Methods Mol Biol, 2015. **1266**: p. 29-53.
269. Chitchumroonchokchai, C. and M.L. Failla, *Hydrolysis of Zeaxanthin Esters by Carboxyl Ester Lipase during Digestion Facilitates Micellarization and Uptake of the Xanthophyll by Caco-2 Human Intestinal Cells*. The Journal of Nutrition, 2006. **136**(3): p. 588-594.
270. PubChem, *Luteindipalmitat*, CID=6373854. 2020, National Center for Biotechnology Information.
271. Welzel, H.P., et al., *Lutein and derivatives containing composition and process for the preparation*, in *Deutsches Patent- und Markenamt*. 2018: Germany.

Lebenslauf

Die Seiten 209 - 210 (Lebenslauf) enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Veröffentlichungen

Publikationen

2018

Leng, M.S., Tobit, P., Demasse, A.M., **Wolf, K.**, Gouado, I., Ndjouenkeu, R., Rawel, H.M., Schweigert, F.J.: Physicochemical composition and antioxidant activity of Maize (*Zea mays*) based complementary food formulation using mixture design. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 2018; 9(8). DOI: 10.1016/j.sciaf.2019.e00132

Wolf, K., Schweigert, F.J.: *Mycotoxin Analysis: A Focus on Rapid Methods. Partnership for Aflatoxin Control in Africa*, African Union Commission, Addis Ababab, Ethiopia. ISBN 978-99944-72-06-2

2017

Götz, K.-P., Chmielewski, F.M., Gödeke, K., **Wolf, K.**, Jander, E., Sievers, S., Homann, T., Huschek, G., Rawel, H.M. : Assessment of amino acids during winter rest and ontogenetic development in sweet cherry buds (*Prunus avium*. L.). *Scientia Horticulturae*, 2017; 222:102-110. DOI: 10.1016/j.scienta.2017.05.001

Posterpräsentationen

2011

Weckmüller, A., **Wolf, K.**, Meyer, A., Kruse, H.P. und Rawel, H.M.: Optimierung der Extraktion und Analytik von organischen Säuren und Flavonoiden in Zitronendirektsaft. 48. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung, e.V., Potsdam

2009

Wolf, K., Wiese, S., Esatbeyoglu, T., Winterhalter, P., Steinberg, P., Kulling, S.E.: Einfluss verschiedener Catechine auf das Wachstum humaner Darmepithelzellen. 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Berlin

Danksagung

Die Seiten 213 - 214 (Danksagung) enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Produktentwicklung eines luteinhaltigen, kolloidalen Nahrungsergänzungsmittels: Physikochemische und ernährungsphysiologische Aspekte“

in der Arbeitsgruppe „Instrumentelle Analytik in der Ernährungswissenschaft“ der Universität Potsdam, unter der Leitung von Herrn apl. Prof. Dr. Harshadrai M. Rawel, selbstständig und ausschließlich unter Benutzung der angegebenen Quellen angefertigt wurde. Ebenfalls bestätige ich, dass diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bisher an einer anderen Hochschule eingereicht wurde.

Kristine Wolf

Brandenburg an der Havel, 28.07.2020

8 ANHANG

8.1 MATERIAL

8.1.1 Chemikalien

8.1.1.1 Emulsionen

Wirkstoffträger

Biolut™ Marigold Extract	Blue California, USA
90 % LuteinEsters	
Lutein 5 %	BulkSupplements.com, USA
Oleoresin, Marigold food grade	NATECO2, Deutschland

Trägerphasen

Mandelöl	Caesar & Lorentz GmbH, Deutschland
MCT-Öl (<i>medium chain triglycerids</i>)	Endima GmbH, Deutschland
Rapsöl	Caesar & Lorentz GmbH, Deutschland
Sonnenblumenöl	Caesar & Lorentz GmbH, Deutschland
Olivenöl	Caesar & Lorentz GmbH, Deutschland

Emulgatoren

Biozate® 1	Davisco Foods International Inc., USA
Tween® 80	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland

8.1.1.2 Chemikalien, Biochemikalien, Reagenzien

Acetonitril	Sigma-Aldrich Co St. Louis, USA
α -Amylase, Typ VI-B (<i>from Porcine Pancreas</i>)	Sigma-Aldrich Co St. Louis, USA
D- α -Tocopherol Konzentrat	Cognis GmbH, Deutschland
Aquacare Wasserbadschutz	Carl Roth GmbH & Co., Deutschland
Cholesterolesterase vom Schwein (Aktivität: ≥ 300 U/mg Trockengewicht)	Abnova, Taiwan
Dikaliumhydrogenphosphat	Fluka Chemika-BioChemika Feinchemikalien GmbH, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka Chemika-BioChemika Feinchemikalien GmbH, Deutschland
Dimethylsulfoxid, ≥ 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Eisessig	Carl Roth GmbH & Co., Deutschland
Ethanol, ≥ 99 % (Rotisol)	Carl Roth GmbH & Co., Deutschland
Ethanol, $\geq 99,7$ %	VWR International GmbH, Deutschland
Ethanol ≥ 96 %, vergällt	Carl Roth GmbH & Co., Deutschland
Ethylacetat	VWR International GmbH, Deutschland
Gallensalze vom Schwein	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Icheck™ – Extraktionsgemisch	BioAnalyt GmbH, Deutschland
Isopropanol	VWR International BVBA, Belgien
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Deutschland

Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka Chemika-BioChemika GmbH, Deutschland	Feinchemikalien
Kaliumhydroxid	Fluka Chemika-BioChemika GmbH, Deutschland	Feinchemikalien
Lipase B <i>Candida antarctica</i> immobilized on Immobead 150, recombinat from <i>Aspergillus oryzae</i> (Aktivität ≥ 1.800 U/g Trockengewicht)	Merck KGaA, Deutschland	
Lipase FE01 vom <i>Aspergillus oryzae</i> (Aktivität: > 13.000 U/mL in Olivenöl)	ASA Spezialenzyme GmbH, Deutschland	
Lipase L8906 vom <i>Mucor javanicus</i> (Aktivität ≥ 300 U/mg in Olivenöl)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland	
Lipase L9031 vom <i>Mucor miehei</i> (Aktivität ≥ 4.000 U/mg in Olivenöl)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland	
Lutein (Standard)	Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau e.V., Deutschland	
Methanol	VWR International GmbH, Deutschland	
Microbac, 100%	Carl Roth GmbH & Co., Deutschland	
Natriumacetat-Trihydrat	Merck KGaA, Deutschland	
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH & Co., Deutschland	
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Deutschland	
Natriumcitrat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland	
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co., Deutschland	
Neutralrot	AppliChem GmbH, Deutschland	
New Focus™ Spray	Good Health Naturally, United Kingdom	
Pankreatin (from <i>Porcine Pancreas</i>)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland	
Pepsin (from <i>Porcine Gastric Mucosa</i>)	Merck KGaA, Deutschland	
PBS (phosphatgepufferte Salzlösung), ultrarein	VWR International GmbH, Deutschland	
Resazurin Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland	
Salzsäure (37 %)	Carl Roth GmbH & Co., Deutschland	
Trypanblau	Carl Roth GmbH & Co., Deutschland	
Trypsin (10x)	Biochrom GmbH, Deutschland	
Wasserstoffperoxid, 35%	Carl Roth GmbH und Co. KG, Deutschland	

8.1.1.3 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur

Fötales Kälberserum	Biochrom GmbH, Deutschland
Minimal Essential Medium (mit Earle's Salzen, 2,2 g/L Natriumhydrogencarbonat, Glutamin, Phenolrot) (MEM)	Biochrom GmbH, Deutschland
Nicht essentielle Aminosäuren (1x)(NEA)	Biochrom GmbH, Deutschland
Penicillium/Streptomycin (100x) (Pen/Strep)	Biochrom GmbH, Deutschland

8.1.1.4 Zertifikat Biozate® 1

DAVISCO
FOODS INTERNATIONAL, INC.®

■
BioZate® 1

Nutrient Information

Expressed per 100 grams product, as is.

Calories	370
Calories from fat	5
Total Fat	0.5 g
Saturated Fat	0.2 g
Trans Fat	0.0 g
Cholesterol	10.0 mg
Sodium	950.0 mg
Potassium	875.0 mg
Total Carbohydrates	0.0 g
Dietary Fiber	0.0 g
Sugars	0.0 g
Protein (N x 6.38)	90.0 g
Vitamin A	<100 IU
Vitamin C	<2 mg
Vitamin D	<8 IU
Iron	3.0 mg
Calcium	325.0 mg
Phosphorus	75.0 mg
Magnesium	75.0 mg
Moisture	5.0 g
Ash	4.5 g

Amino Acid Profile

Expressed per grams on a protein basis

Alanine	5.1 g
Arginine	2.6 g
Aspartic Acid	10.7 g
Cysteine	3.1 g
Glutamic Acid	16.7 g
Glycine	1.7 g
Histidine*	1.8 g
Isoleucine*‡	5.0 g
Leucine*‡	12.9 g
Lysine*	10.1 g
Methionine*	2.4 g
Phenylalanine*	3.4 g
Proline	4.9 g
Serine	3.7 g
Threonine*	4.8 g
Tryptophan*	2.6 g
Tyrosine	3.7 g
Valine*‡	5.0 g

* Essential Amino Acid

‡ Branched Chain Amino Acid

Nutrition and amino acid profiles are provided for informational purposes only. These results are generated using limited sample quantity and Davisco Foods International makes no guaranty that these results will accurately reflect the values of individual lots. Customers should request samples of specific lots for their own analysis if lot specific results are needed.

Version 07F-0604

11000 West 78th Street, Suite 210 Eden Prairie, Minnesota 55344
Phone: 952-914-0400 Fax: 952-914-0887
www.DaviscoFoods.com

8.1.2 Geräte

8.1.2.1 *Allgemein*

Destillierwasseranlage Mini Ro 10-15-EP	Veolia Water Technologies Deutschland GmbH, Deutschland
IKA Schüttler MTS 2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Deutschland
Magnetrührer Variomag Elektronikrührer Poly 15	H & P Labortechnik GmbH, Deutschland
Mehrkanalpipette Discovery Comfort (200µL)	Kinesis GmbH, Deutschland
Mikroplattenphotometer FLUOStar Optima	BMG Labtech, Deutschland
pH-Meter Mettler Delta 320 Seven Easy	Mettler-Toledo AG, Deutschland
Pipette (5,0 mL)	VWR International GmbH, Deutschland
Pipetten Transferpette®S (10 µL; 100 µL; 1.000 µL)	Brand, Deutschland
Präzisionswaage Sartorius Basic (BA 210 S)	Sartorius, Deutschland
Probenkonzentrator Techne Dri-Block heater DB3	Cole Parmer Lmt., Großbritannien
Rotator RM -2M	neoLab Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Deutsch- land
Rotationsmischer RM Multi 1	Starlab International GmbH, Deutschland
Spectrophotometer Novaspec II	Pharmacia Biotech, Schweden
Thermoinkubator Thermoschüttler PRO	Cell Media GmbH, Deutschland
Thermoinkubator Uni Max 1.010 mit Wämeinheit 1.000	Heidolph Instruments GmbH & Co, Deutschland
Tischzentrifuge Galaxy Mini Zentrifuge	VWR, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex RK 100	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Deutsch- land
vario EL cube	Elementar Analysensysteme GmbH, Deutschland
Vortex neolab® D-6012	neoLab Migge GmbH, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 16 R	Heraeus Holding GmbH, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 2 R	Heraeus Holding GmbH, Deutschland
Zentrifuge 3K20	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Deutschland

8.1.2.2 *Emulsionsherstellung*

Homogenisator APV Gaulin AP 40	SPX Flow Inc., USA
Ultraschallhomogenisator	Fisherbrand, Deutschland
Ultraschallhomogenisator Dispergierer	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Deutschland
Ultraschallhomogenisator Sonopuls® mit HD 2070 mit Titansonotrode	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Deutsch- land

8.1.2.3 HPLC-Analytik Lutein

Autoinjektor SIL-10AC	Shimadzu Corporation, Japan
Communication Bus Module CBM-20A	Shimadzu Corporation, Japan
Degasser ERC 3315 α	ERC Inc., Japan
Diode Array Detector SPD-M10Avp	Shimadzu Europa GmbH, Deutschland
Liquid Chromatograph LC-10ADVp (2x)	Shimadzu Europa GmbH, Deutschland
Säulenofen CTO 10AC	Shimadzu Corp., Japan

8.1.2.4 Partikelgrößenbestimmung

Mastersizer X	Malvern Panalytical B.V., Niederlande
Nanosizer Zetasizer Nanoseries mit Titrator	Malvern Panalytical B.V., Niederlande
Partikelladungsdetektor Müttek TM PCD-03	BTG Instruments GmbH, Deutschland

8.1.2.5 Zellkultur

Autoklaviergerät 500 EP-Z	Thermo Fisher Scientific Corp., USA
Brutschrank Modell: BB 16 CU	Heraeus Holding GmbH, Deutschland
Gefrierbehälter Mr. Frosty	Nalge Nunc International, USA
Invertmikroskop	Helmut Hund GmbH, Deutschland
Mikroliterpipette Eppendorf Research 10 μ L; 20 μ L; 200 μ L; 1.000 μ L	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Deutschland
Neubauer Improved Zählkammer, Tiefe: 0,1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Deutschland
Pipettierhilfe pipetus Junior	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Deutschland
Sterilwerkbank Modell: H512	Heraeus Holding GmbH, Deutschland
Vakuumpumpe	KNF Neuberger GmbH, Deutschland
Vortexmischer Modell: Lab dancer	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Deutschland
Wasserbad Modell: 1086	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Deutschland

8.1.3 Verbrauchsmaterial

Deckgläschen	Carl Roth GmbH und Co. KG, Deutschland
Halbmikroküvetten, PMMA	Carl Roth GmbH und Co. KG, Deutschland
Halbmikroküvetten	VWR International GmbH, Deutschland
Mikro-Einwegspatel, antistatisch	VWR International GmbH, Deutschland
Multiwell-Zellkulturplatten (24-Well, flacher Boden, TC-behandelt)	VWR International GmbH, Deutschland
Pasteurpipette	Carl Roth GmbH und Co. KG, Deutschland
Pipettenspitzen (1.000 μ L)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Deutschland
Pipettenspitzen (100 μ L, 10 μ L)	VWR International GmbH, Deutschland
Reaktionsgefäß (1,5 mL, 2 mL)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Deutschland
Reaktionsgefäß (5 mL, 15 mL, 50 mL)	VWR International GmbH, Deutschland

Schraubkappen ND8	neoLab Migge GmbH, Deutschland
Serologische Pipette (5 mL, 10 mL, 25 mL)	VWR International GmbH, Deutschland
Serologische Pipette (10 mL)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Deutschland
Septen	VWR International GmbH, Deutschland
Spritze (1 mL, 20 mL)	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Spritzenfilter (0,20 µm, PTFE)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Deutschland
Spritzenfilter (0,20 µm, PTFE)	VWR International GmbH, Deutschland
Vials 1,5 mL	VWR International GmbH, Deutschland
Vials 1,1 mL, konisch	neoLab Migge GmbH, Deutschland
Zellkulturflasche (75 cm ²)	TPP Techno Plastic Products AG, Schweiz
Zellkulturschale (6 cm)	VWR International GmbH, Deutschland
Zellkulturschale (10 cm)	VWR International GmbH, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	VWR International GmbH, Deutschland

8.2 METHODENTEIL

8.2.1 Zusammensetzung der lutein- bzw. luteinesterhaltigen Formulierungen

8.2.1.1 Musteremulsionen

Tabelle A 1 Codierung der Miniemulsionen zur Bestimmung der mittleren Partikelgrößen in wirkstofffreien Miniemulsionen mit verschiedenen Ölen über einen Zeitraum von 6 Monaten.

Grundzusammensetzung: 20 mL Reinstwasser, 10 mL Öl, 1,0 g Tween 80, 0,2 g Natriumcitrat.

Öl	Codierung der wirkstofffreien Miniemulsionen
MCT-Öl	55
Rapsöl	56
Mandelöl	54
Sonnenblumenöl	52
Olivenöl	53

Tabelle A 2 Codierung der Miniemulsionen zur Bestimmung der mittleren Partikelgrößen bei Zusatz von Biozate 1 im Überschuss über einen Zeitraum von 30 Tagen.

Grundzusammensetzung: 20 mL Reinstwasser, 10 mL Öl, 0,3 g Tween 80, 0,7 g Biozate 1, 0,2 g Natriumcitrat.

Öl	Codierung der wirkstofffreien Miniemulsionen
MCT-Öl	50
Rapsöl	41
Mandelöl	49
Sonnenblumenöl	47
Olivenöl	48

Tabelle A 3 Codierung der Miniemulsionen zur Bestimmung der mittleren Partikelgrößen mit Zugabe gleichen Teilen an Tween 80 und Biozate 1 (1:1) über einen Zeitraum von 30 Tagen.

Grundzusammensetzung: 20 mL Reinstwasser, 10 mL Öl, 0,5 g Tween 80, 0,5 g Biozate 1, 0,2 g Natriumcitrat.

Öl	Codierung der wirkstofffreien Miniemulsionen
MCT-Öl	45
Rapsöl	40
Mandelöl	44
Sonnenblumenöl	42
Olivenöl	43

Tabelle A 4 Codierung der Miniemulsionen zur Bestimmung der mittleren Partikelgrößen und Strömungspotentiale in Miniemulsionen in Abhängigkeit der Zugabe eines Peptisators.

Grundzusammensetzung: 20 mL Wasser, 10 mL Öl, 1,0 g Tween 80.

	Codierung der wirkstofffreien Miniemulsionen
Leitungswasser, Rapsöl	37
0,2 g Natriumcitrat, Reinstwasser, Rapsöl	38
0,2 g Natriumphosphat, Reinstwasser, Rapsöl	39
Leitungswasser, MCT-Öl	115
0,2 g Natriumcitrat, Reinstwasser, MCT-Öl	120

8.2.1.2 Wirkstoffhaltige Miniemulsionen mit verschiedenen Ölen

Tabelle A 5 Codierung der Miniemulsionen zur Bestimmung der mittleren Partikelgrößen in Abhängigkeit der verwendeten Emulgiertechnik.

Grundzusammensetzung: 20 mL Leitungswasser, 10 mL Ölphase mit Oleoresin 30 mg/mL, 1,0 g Tween 80, Emulgiertechnik: Ultraschall (Ultraschall 200 Watt, 5 min auf Eis).

Öl	Codierung der Miniemulsionen
MCT-Öl	85
Rapsöl	86
Mandelöl	84
Sonnenblumenöl	82
Olivenöl	83

Tabelle A 6 Codierung der Miniemulsionen zur Bestimmung der mittleren Partikelgrößen in Abhängigkeit der verwendeten Emulgiertechnik.

Grundzusammensetzung: 30 ml Leitungswasser, 15 ml Ölphase mit Oleoresin 30 mg/mL, 1,5g Tween 80, Emulgiertechnik: Ultraschall und Hochdruckhomogenisierung (Ultraschall 200 Watt, 5 min auf Eis, 6x Hochdruckhomogenisierung mit 710 bar).

Öl	Codierung der Miniemulsionen
MCT-Öl	95
Rapsöl	96
Mandelöl	94
Sonnenblumenöl	92
Olivenöl	93

8.2.1.3 Prototypen (Präemulsionen)

Tabelle A 7 Grundzusammensetzung der Miniemulsionen M1 bis M6.

Präemulsionen mit 15 mL Ölphase und 25 mL Wasserphase (1:2,67). Emulgiertechnik: Ultraschall und Hochdruck-homogenisierung (Ultraschall 200 Watt, 5 min auf Eis, 6x Hochdruckhomogenisierung mit 710 bar).

Probenbezeichnung	Wirkstoff	Ölphase	Wasserphase
M1	Lutein	8 g Lutein 5% 15 ml MCT-Öl	1,25 g Tween 80 25 ml Leitungswasser
M2	Lutein	8 g Lutein 5% 15 ml MCT-Öl	0,8 g Tween 80 0,45 g Biozate 1 25 ml Leitungswasser
M3	Luteinester	2,4 g Oleoresin 15 ml MCT-Öl	1,25 g Tween 80 25 ml Leitungswasser
M4	Luteinester	2,4 g Oleoresin 15 ml MCT-Öl	0,8 g Tween 80 0,45 g Biozate 1 25 ml Leitungswasser
M5	Lutein und Luteinester	2,4 g Oleoresin 8 g Lutein 5% 15 ml MCT-Öl	1,25 g Tween 80 25 ml Leitungswasser
M6	Lutein und Luteinester	2,4 g Oleoresin 8 g Lutein 5% 15 ml MCT-Öl	0,8 g Tween 80 0,45 g Biozate 1 25 ml Leitungswasser

Tabelle A 8 Grundzusammensetzung der Miniemulsionen MO3 bis MO6.

Präemulsionen mit 15 mL Ölphase und 25 mL Wasserphase (1:2,67). Emulgiertechnik: Ultraschall (Ultraschall 70 Watt, 10 min auf Eis).

Probenbezeichnung	Wirkstoff	Ölphase	Wasserphase
MO3	Luteinester	2,4 g Oleoresin 15 ml MCT-Öl	1,25 g Tween 80 25 ml Leitungswasser
MO4	Luteinester	2,4 g Oleoresin 15 ml MCT-Öl	0,8 g Tween 80 0,45 g Biozate 1 25 ml Leitungswasser
MO5	Lutein und Luteinester	2,4 g Oleoresin 8 g Lutein 5% 15 ml MCT-Öl	1,25 g Tween 80 25 ml Leitungswasser
MO6	Lutein und Luteinester	2,4 g Oleoresin 8 g Lutein 5% 15 ml MCT-Öl	0,8 g Tween 80 0,45 g Biozate 1 25 ml Leitungswasser

8.2.1.4 Fertigrezepturen

Tabelle A 9 Grundzusammensetzung der Fertigrezepturen 122 bis 127.

Fertigrezepturen mit dem Wirkstoff Luteinester in 15 mL Ölphase und einer Wasserphase mit dem Volumen 25 mL (1:2,67). Emulgiertechnik: Ultraschall und Hochdruckhomogenisierung (Ultraschall 200 Watt, 5 min auf Eis, 6x Hochdruckhomogenisierung mit 710 bar).

Probenbezeichnung	Ölphase	Wasserphase
122	30 mg/ml Oleoresin alpha-Tocopherol 15 ml MCT-Öl	0,133 g Kaliumsorbat 0,4 g Vitamin C 0,5g Orangen-Aroma 1,25 g Tween 80 2 g Xylitol 0,25 g Natriumcitrat
123	30 mg/ml Oleoresin alpha-Tocopherol 15 ml Rapsöl	0,133 g Kaliumsorbat 0,4 g Vitamin C 0,5g Orangen-Aroma 1,25 g Tween 80 2 g Xylitol 0,25 g Natriumcitrat
124	30 mg/ml Oleoresin alpha-Tocopherol 15 ml MCT-Öl	0,133 g Kaliumsorbat 0,4 g Vitamin C 0,5g Orangen-Aroma 0,8 g Tween 80 0,45 g Biozate 1 2 g Xylitol 0,25 g Natriumcitrat
125	30 mg/ml Oleoresin alpha-Tocopherol 15 ml Rapsöl	0,133 g Kaliumsorbat 0,4 g Vitamin C 0,5g Orangen-Aroma 0,8 g Tween 80 0,45 g Biozate 1 2 g Xylitol 0,25 g Natriumcitrat
126	30 mg/ml Oleoresin alpha-Tocopherol 15 ml MCT-Öl	0,133 g Kaliumsorbat 0,4 g Vitamin C 0,5g Orangen-Aroma 1,25 g Biozate 1 2 g Xylitol 0,25 g Natriumcitrat
127	30 mg/ml Oleoresin alpha-Tocopherol 15 ml Rapsöl	0,133 g Kaliumsorbat 0,4 g Vitamin C 0,5g Orangen-Aroma 1,25 g Biozate 1 2 g Xylitol 0,25 g Natriumcitrat

8.2.2 Lösungen für die physikochemische Charakterisierung wirkstoffhaltiger Miniemulsionen

Tabelle A 10 Lösungen für die physikochemische Charakterisierung gegenüber verschiedenen pH-Bedingungen.

Lösung	Zusammensetzung
1 M Natronlauge	4 g NaOH in 100 mL destilliertes Wasser
1 mM Natronlauge	0,1% 1 M NaOH in destilliertem Wasser (v/v)
0,1 mM Natronlauge	10% 1 mM NaOH in destilliertem Wasser (v/v)
100 mM Salzsäure	0,83% 12 M HCl in destilliertem Wasser (v/v)

8.2.3 Synthetische Verdauflüssigkeiten und Lösungen für die *in vitro* Verdau-Versuche

Tabelle A 11 Synthetische Verdauflüssigkeiten und Lösungen für die Charakterisierung der Resorptionsverfügbarkeit *in vitro*.

Verdauflüssigkeit/ Lösung	Zusammensetzung
synthetischer Speichel	2,4 mg/mL Dinatriumhydrogenphosphat 0,2 mg/mL Kaliumdihydrogenphosphat 2 mg/mL α -Amylase aus dem Schweinepankreas pH 6,75
synthetischer Magensaft	2 mg/mL Natriumchlorid 3,2 mg/mL Pepsin aus der Magenschleimhaut vom Schwein in 7 μ L konzentrierte Salzsäure lösen pH 1,2
synthetischer Intestinalsaft	6,8 mg/mL Kaliumdihydrogenphosphat 0,2 N Natronlauge 2 mg/mL Pankreatin 12,1 mg/mL Gallensäureextrakt pH 6,8 \pm 0,1
ethanolische Kaliumlauge	5 M Kaliumhydroxid 66,6% Ethanol

8.2.4 Medien und Lösungen für die Zellkulturversuche

Tabelle A 12 Medien zur Kultivierung von Caco-2 Zellen.

MEM = *Minimum Essential Medium*, FKS = fötales Kälberserum, Pen/Strep = Penicillin/Streptomycin, DMSO = Dimethylsulfoxid.

Medium	Zusammensetzung
Kulturmedium	MEM, 10% FKS, 1% Pen/Strep, 1% NEA
Konservierungsmedium	MEM, 20% FKS, 1% Pen/Strep, 10% DMSO

Tabelle A 13 Lösungen für die zellbiologische Methoden.

PBS = phosphatgepufferte Salzlösung, PTFE = Polytetrafluorethylen, Teflon.

Lösung	Zusammensetzung
ethanolische Essigsäure	0,5% Eisessig in Ethanol
Trypsin	10% Trypsin (10x) in PBS
Neutralrot-Stammlösung	1 mg/mL Neutralrot in destilliertem Wasser, sterilfiltriert (PTFE-Filter, 0,20 µm)
Neutralrot-Gebrauchslösung	5% Neutralrot-Stammlösung im Kulturmedium
Resazurin-Stammlösung	1 mg/mL Resazurin in PBS, sterilfiltriert (PTFE-Filter, 0,20 µm)
Resazurin-Gebrauchslösung	5% Resazurin-Stammlösung im Kulturmedium

8.3 ERGEBNISTEIL

8.3.1 Qualitative und quantitative Analytik von Lutein und Luteinester mittels RP-HPLC

8.3.1.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Methode

Tabelle A 14 Unabhängige Standardkonzentrationsreihen von Lutein zur Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Variationskoeffizienten (V_K) der sechs unabhängigen Standardkonzentrationsreihen von Lutein sowie die jeweiligen konzentrationsbezogenen Peakflächen zur Berechnung der Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ). Die Analyse des externen Standards Lutein erfolgte nach 3.2.2 und 3.2.3.

Kalibrierreihe	Konzentrationsbereich [$\mu\text{g/mL}$]					
19	0,345	1,726	3,452	5,179	6,905	<i>n.a.</i>
25	0,379	1,897	3,795	5,692	7,589	9,486
26	0,298	1,488	2,975	4,463	5,950	7,438
27	0,336	1,680	3,360	5,040	6,720	8,400
32	0,334	1,670	3,340	5,010	6,680	8,350
36	0,403	2,014	4,027	6,041	8,055	10,069
Mittelwert	$0,35 \pm 0,03$	$1,75 \pm 0,17$	$3,49 \pm 0,34$	$5,24 \pm 0,51$	$6,98 \pm 0,68$	$8,75 \pm 0,93$
V_K [%]	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	10,6
Kalibrierreihe	Peakfläche (AUC)					
19	70.462	216.039	453.843	710.249	972.595	<i>n.a.</i>
27	56.717	282.965	564.240	837.701	1.113.099	1.424.999
32	45.463	216.656	471.792	696.282	974.156	1.184.247
25	77.858	432.017	777.126	1.139.919	1.507.270	1.771.091
26	55.848	306.598	586.453	966.092	1.223.621	1.658.915
36	49.178	241.559	497.736	817.857	1.137.973	1.395.883
Mittelwert	59.254 ± 11.413	282.639 ± 74.571	558.532 ± 108.609	861.350 ± 153.352	$1.154.786 \pm 181.119$	$1.487.027 \pm 206.915$
V_K [%]	19,3	26,4	19,4	17,8	15,7	13,9

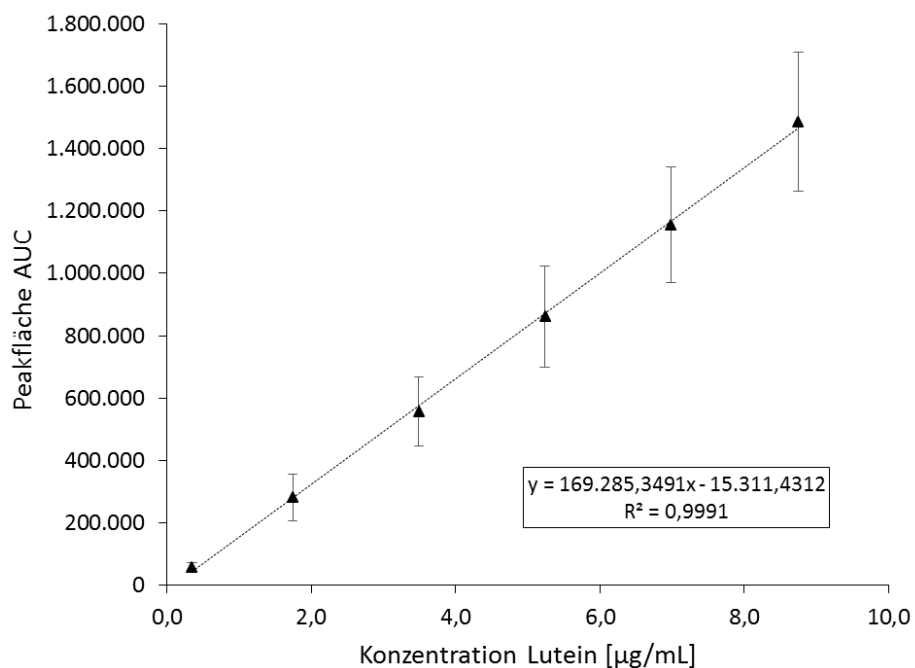


Abbildung A 1 Streudiagramm der unabhängigen Standardkonzentrationsreihen von Lutein zur Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der Konzentrationen und der Peakflächen des externen Standards Lutein aus sechs unabhängigen Standardkonzentrationsreihen. Unter Verwendung des Anstiegs m aus der Geradengleichung der linearen Regression und der Standardabweichung für die Peakflächen der kleinsten Luteinkonzentration wurden die Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ). Die Analyse des externen Standards Lutein erfolgte nach 3.2.2 und 3.2.3.

8.3.2 Konzeption des NEMs in Form einer Miniemulsion mit dem Wirkstoffträger Lutein bzw. Luteinester

8.3.2.1 Physikalische Stabilität der Musteremulsionen

Tabelle A 15 Partikeldurchmesser in wirkstofffreien Miniemulsionen mit verschiedenen Ölen über einen Zeitraum von 6 Monaten.

Die Tabelle zeigt die Partikeldurchmesser in μM im Bereich des volumetrischen Durchmessers D10, D50 und D90 zu den verschiedenen Messzeitpunkten während des Entwicklungsprozesses. Die Messung erfolgte am Mastersizer X (Malvern Panalytical B.V., Niederlande). D90 = volumetrischer Durchmesser von 90% der Partikel in der Miniemulsion ist kleiner als der angegebene Partikeldurchmesser, analog D10 = 10%, D50 = 50%. Zusammensetzung analog zur Codierung siehe Tabelle A 1.

Codierung	Zeitpunkt	Partikeldurchmesser D (volumetrisch) [μm]		
		D10	D50	D90
55	1. Tag	0,18	0,38	0,88
	29. Tag	0,20	0,46	1,18
	64. Tag	0,27	0,67	1,48
	187. Tag	0,17	0,33	0,67
56	1. Tag	0,19	0,41	0,93
	29. Tag	0,19	0,41	0,92
	64. Tag	0,25	0,60	0,17
	187. Tag	0,18	0,36	0,80
54	1. Tag	0,19	0,43	1,01
	29. Tag	0,20	0,43	0,97
	64. Tag	0,25	0,61	1,16
	187. Tag	0,20	0,44	0,99
52	1. Tag	0,19	0,42	0,96
	29. Tag	0,19	0,43	0,97
	64. Tag	0,29	0,67	1,22
	187. Tag	0,19	0,40	0,96
53	1. Tag	0,20	0,46	1,05
	29. Tag	0,20	0,45	1,02
	64. Tag	0,28	0,65	1,23
	187. Tag	0,20	0,48	1,11

Tabelle A 16 Partikeldurchmesser in wirkstofffreien Miniemulsionen mit Überschuss an Biozate 1 über einen Zeitraum von 30 Tagen.

Die Tabelle zeigt die Partikeldurchmesser in μM im Bereich des volumetrischen Durchmessers D10, D50 und D90 zu den verschiedenen Messzeitpunkten während des Entwicklungsprozesses. Die Messung erfolgte am Master-sizer X (Malvern Panalytical B.V., Niederlande). D90 = volumetrischer Durchmesser von 90% der Partikel in der Miniemulsion ist kleiner als der angegebene Partikeldurchmesser, analog D10 = 10%, D50 = 50%, # = Phasentrennung. Zusammensetzung analog zur Codierung siehe Tabelle A 2.

Codierung	Zeitpunkt	Partikeldurchmesser D (volumetrisch) [μm]		
		D10	D50	D90
50	1. Tag	0,22	0,53	1,21
	29. Tag	0,20	0,48	1,37
41	2. Tag	0,23	0,59	1,30
	30. Tag	0,23	0,58	1,37
49	1. Tag	0,27	0,70	1,51
	30. Tag [#]	0,00	0,00	0,00
47	1. Tag	0,24	0,60	1,35
	30. Tag [#]	0,00	0,00	0,00
48	1. Tag	0,27	0,71	1,57
	30. Tag [#]	0,00	0,00	0,00

Tabelle A 17 Partikeldurchmesser in wirkstofffreien Miniemulsionen mit Tween 80 und Biozate 1 (1:1) über einen Zeitraum von 30 Tagen.

Die Tabelle zeigt die Partikeldurchmesser in μM im Bereich des volumetrischen Durchmessers D10, D50 und D90 zu den verschiedenen Messzeitpunkten während des Entwicklungsprozesses. Die Messung erfolgte am Master-sizer X (Malvern Panalytical B.V., Niederlande). D90 = volumetrischer Durchmesser von 90% der Partikel in der Miniemulsion ist kleiner als der angegebene Partikeldurchmesser, analog D10 = 10%, D50 = 50%, # = Phasentrennung. Zusammensetzung analog zur Codierung siehe Tabelle A 3.

Codierung	Zeitpunkt	Partikeldurchmesser D (volumetrisch) [μm]		
		D10	D50	D90
45	3. Tag	0,28	0,70	1,49
	29. Tag	0,19	0,40	0,93
40	2. Tag	0,20	0,47	1,11
	30. Tag	0,20	0,49	2,72
44	3. Tag	0,24	0,60	1,30
	29. Tag [#]	0,00	0,00	0,00
42	3. Tag	0,22	0,55	1,27
	29. Tag	0,25	0,62	1,32
43	3. Tag	0,23	0,58	1,32
	29. Tag [#]	0,00	0,00	0,00

Tabelle A 18 Partikeldurchmesser in Miniemulsionen in Abhängigkeit der Zugabe eines Peptisators.

Die Tabelle zeigt die Partikeldurchmesser in μM im Bereich des volumetrischen Durchmessers D10, D50 und D90 zu den verschiedenen Messzeitpunkten während des Entwicklungsprozesses. Die Messung erfolgte am Mastersizer X (Malvern Panalytical B.V., Niederlande). D90 = volumetrischer Durchmesser von 90% der Partikel in der Miniemulsion ist kleiner als der angegebene Partikeldurchmesser, analog D10 = 10%, D50 = 50%. Zusammensetzung analog zur Codierung siehe Tabelle A 4.

Codierung	Zeitpunkt	Partikeldurchmesser D (volumetrisch) [μm]		
		D10	D50	D90
37	2.Tag	0,20	0,46	1,03
	30.Tag	0,21	0,48	1,08
	59.Tag	0,20	0,45	1,00
	93.Tag	0,23	0,59	1,51
	217.Tag	0,18	0,36	0,82
38	2.Tag	0,26	0,64	1,29
	59.Tag	0,20	0,44	1,00
	93.Tag	0,41	0,80	1,46
	217.Tag	0,18	0,35	0,79
39	2.Tag	0,20	0,44	0,99
	59.Tag	0,19	0,43	0,92
	93.Tag	0,37	0,82	1,55
	217.Tag	0,19	0,39	0,94
115	5.Tag	0,21	0,51	1,23
	34.Tag	0,22	0,57	1,57
	155.Tag	0,22	0,56	1,36
120	4.Tag	0,2	0,44	1,05
	33.Tag	0,25	0,77	2,06
	153.Tag	0,19	0,43	1,21

8.3.2.2 Physikalische Stabilität wirkstoffhaltiger Miniemulsionen mit verschiedenen Ölen

Tabelle A 19 Partikeldurchmesser in Miniemulsionen mit Leitungswasser, wirkstoffbeladenen Ölen und 0,03 g Tween 80/mL in Abhängigkeit der verwendeten Emulgiertechnik.

Die Tabelle zeigt die Partikeldurchmesser in μM im Bereich des volumetrischen Durchmessers D10, D50 und D90 zu den verschiedenen Messzeitpunkten während des Entwicklungsprozesses. Die Messung erfolgte am Mastersizer X (Malvern Panalytical B.V., Niederlande). D90 = volumetrischer Durchmesser von 90% der Partikel in der Miniemulsion ist kleiner als der angegebene Partikeldurchmesser, analog D10 = 10%, D50 = 50%. Zusammensetzung analog zur Codierung siehe Tabelle A 5/ Tabelle A 6.

Codierung	Zeitpunkt	Partikeldurchmesser D (volumetrisch) [μm]		
		D10	D50	D90
85	4. Tag	0,18	0,38	0,93
	25. Tag	0,18	0,37	0,86
	48. Tag	0,19	0,44	1,32
	167. Tag	0,18	0,38	0,98

Codierung	Zeitpunkt	Partikeldurchmesser D (volumetrisch) [μm]		
		D10	D50	D90
86	4. Tag	0,19	0,42	0,94
	25. Tag	0,19	0,42	0,93
	48. Tag	0,22	0,54	1,20
	167. Tag	0,19	0,43	0,98
84	4. Tag	0,20	0,45	1,01
	25. Tag	0,20	0,44	0,98
	48. Tag	0,25	0,65	1,47
	167. Tag	0,21	0,50	1,14
82	4. Tag	0,20	0,46	1,04
	25. Tag	0,20	0,47	1,04
	48. Tag	0,20	0,47	1,04
	167. Tag	0,20	0,44	0,99
83	4. Tag	0,21	0,49	1,10
	25. Tag	0,21	0,52	1,28
	48. Tag	0,23	0,59	1,39
	167. Tag	0,21	0,50	1,13
95	3. Tag	0,17	0,31	0,62
	21. Tag	0,17	0,31	0,59
	44. Tag	0,17	0,31	0,60
	163. Tag	0,16	0,29	0,55
96	3. Tag	0,17	0,31	0,59
	21. Tag	0,17	0,31	0,58
	44. Tag	0,17	0,32	0,75
	163. Tag	0,17	0,30	0,61
94	3. Tag	0,17	0,32	0,65
	21. Tag	0,17	0,30	0,64
	44. Tag	0,18	0,35	1,29
92	3. Tag	0,17	0,31	0,60
	21. Tag	0,17	0,31	0,60
	163. Tag	0,17	0,30	0,56
93	3. Tag	0,17	0,30	0,62
	21. Tag	0,17	0,31	0,60
	163. Tag	0,17	0,30	0,58

8.3.2.3 Physikalische Stabilität der Fertigrezepturen 122 bis 127

Tabelle A 20 Partikeldurchmesser in den Fertigrezepturen 122 bis 127 über den gesamten Versuchszeitraum.

Die Tabelle zeigt die Partikeldurchmesser in μM im Bereich des volumetrischen Durchmessers D10, D50 und D90 an verschiedenen Messzeitpunkten während des Entwicklungsprozesses. Die Messung erfolgte am Mastersizer X (Malvern Panalytical B.V., Niederlande). D90 = volumetrischer Durchmesser von 90% der Partikel in der Miiemulsion ist kleiner als der angegebene Partikeldurchmesser, analog D10 = 10%, D50 = 50%. Mittelwert = mittlere Partikeldurchmesser über den gesamten Messzeitraum, n.b. = nicht bestimmt. Zusammensetzung analog zur Codierung siehe Tabelle A 9.

Codierung	Zeitpunkt	Partikeldurchmesser D (volumetrisch) [μm]		
		D10	D50	D90
122	2.Tag	0,17	0,30	0,59
	14.Tag	0,17	0,31	0,71
	69. Tag	0,16	0,29	0,56
	108. Tag	0,16	0,28	0,53
	328.Tag	0,17	0,32	0,64
	502. Tag	0,17	0,29	0,50
	Mittelwert	$0,17 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$	$0,59 \pm 0,08$
123	2.Tag	0,16	0,28	0,53
	14.Tag	0,17	0,34	1,12
	69. Tag	0,17	0,29	0,53
	108. Tag	0,16	0,28	0,52
	328.Tag	0,17	0,32	0,64
	502. Tag	0,17	0,28	0,50
	Mittelwert	$0,17 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,03$	$0,64 \pm 0,24$
124	2.Tag	0,17	0,31	0,63
	14.Tag	0,17	0,32	0,78
	69. Tag	0,17	0,31	0,60
	108. Tag	0,17	0,30	0,59
	328.Tag	0,17	0,34	0,71
	502. Tag	0,17	0,30	0,55
	Mittelwert	$0,17 \pm 0,00$	$0,31 \pm 0,02$	$0,64 \pm 0,09$
125	2.Tag	0,17	0,31	0,58
	14.Tag	0,17	0,31	0,61
	69. Tag	0,17	0,31	0,59
	108. Tag	0,17	0,31	0,58
	328.Tag	0,17	0,33	0,67
	502. Tag	0,16	0,29	0,53
	Mittelwert	$0,17 \pm 0,00$	$0,31 \pm 0,01$	$0,59 \pm 0,05$
126		n.b.	n.b.	n.b.
127		n.b.	n.b.	n.b.

8.3.2.4 *Wirkstoffstabilität gegenüber dem Emulgierverfahren***Tabelle A 21 Wirkstoffgehalte in den Ölphasen und Miniemulsionen zur Bestimmung des Einflusses des Emulgierverfahrens auf die Wiederfindung des Wirkstoffes in Miniemulsionen.**

Zur Herstellung der Präemulsionen wurde die jeweilige Ölphase mit der Wasserphase in einem Verhältnis 1:2,67 vereint. Der Wirkstoffgehalt wurde als Luteinäquivalent in mg/mL angegeben. c (LÄ) = Konzentration Luteinäquivalent, SD = Standardabweichung.

Wirkstoffgehalt in Ölphasen für	c (LÄ) mg/mL	SD [%]
M1, M2	11,84 ± 0,85	7,19
M3, M4	30,45 ± 0,82	2,68
M5, M6	45,72 ± 5,00	10,93

Wirkstoffgehalt nach Herstellung in Präemulsionen	c (LÄ) mg/mL	SD [%]
M1	6,60 ± 0,23	3,44
M2	7,43 ± 0,26	3,55
M3	12,35 ± 0,18	1,49
M4	10,69 ± 0,47	4,36
M5	14,75 ± 3,50	23,75
M6	16,31 ± 1,53	9,39

8.3.3 Physikochemische Charakteristik von Lutein und Luteinestern in Ölen, Miniemulsionen und Fertigrezepturen

8.3.3.1 *Stabilität von Luteinestern in Fertigrezepturen*

Tabelle A 22 Lagerstabilität der Wirkstoffe in den Fertigrezepturen und dem kommerziellen Produkt New Focus™.

a = Konzentration Luteinäquivalent in mg/mL, b = pH-Wert, n.a. = nicht analysiert. 122 Tween 80/MCT-Öl, 123 Tween 80/Rapsöl, 124 Tween 80/Biozate 1/MCT-Öl, 125 Tween 80/Biozate 1/Rapsöl, NFS New Focus™-Spray Wirkstoff: Lutein.

Probe	0 min		2 Monate		5 Monate		6 Monate		7 Monate		8 Monate		10 Monate		12 Monate	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
122	4,38 ± 0,23	4,8	4,95 ± 0,19	4,7	4,06 ± 0,22	4,9	4,80 ± 0,44	4,7	5,03 ± 0,52	4,8	5,33 ± 0,26	4,6	6,60 ± 0,59	4,6	4,35 ± 0,47	4,6
123	5,48 ± 0,20	5,1	6,11 ± 0,05	5,0	5,33 ± 0,20	5,2	5,89 ± 0,19	5,1	5,93 ± 0,40	5,2	5,96 ± 0,16	5,1	4,96 ± 0,02	5,1	4,86 ± 0,22	5,0
124	7,76 ± 0,55	4,9	8,33 ± 0,15	4,8	6,34 ± 0,33	5,0	7,30 ± 0,41	4,9	7,39 ± 0,84	4,9	8,05 ± 1,11	4,9	7,21 ± 0,42	4,8	5,79 ± 0,70	4,8
125	6,86 ± 0,04	4,9	7,23 ± 0,30	4,7	5,97 ± 0,81	5,0	7,44 ± 0,22	4,7	6,92 ± 1,15	4,8	8,73 ± 0,67	4,8	6,90 ± 0,11	4,7	6,09 ± 0,87	4,7
126	7,60 ± 0,74	5,1	n.a.	5,1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
127	7,17 ± 1,04	5,1	n.a.	5,1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Probe	0 min		3 Monate		5 Monate		6 Monate		8 Monate		10 Monate	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
NFS	0,53 ± 0,08	3,74	0,16 ± 0,01	3,80	0,25 ± 0,02	3,78	0,23 ± 0,02	3,76	0,17 ± 0,02	3,72	0,24 ± 0,04	3,78

8.3.4 Charakterisierung zytotoxischer Effekte und Wirkstoffabsorption durch Caco-2 Zellen aus lutein- und luteinesterhaltigen Formulierungen *in vitro*

8.3.4.1 Zytotoxische Einordnung der Wirkstoffe und Substanzen in den kolloidalen Formulierungen

Tabelle A 23 Herstellungsmethoden der Formulierungen in den Inkubationsmedien zur Bestimmung der Viabilität von Caco-2 Zellen *in vitro*.

Die Herstellung der Inkubationsmedien erfolgte in Abhängigkeit der zu untersuchenden Substanz und Formulierung nach zwei verschiedenen Methoden. Methode 1 (antimikrob): Vorverdünnung der zu untersuchenden Proben in DMSO oder Ethanol außerhalb der Sterilbank, Weiterverdünnung steril mit einem Faktor von 1.000 und sterilen Kulturmedium. Methode 2 (direkt): unmittelbare Verdünnung der Substanzen unter der Sterilbank in das Kulturmedium.

Substanz	Herstellungsmethode wirkstoffhaltiges Medium	Lösungsmittel	
		DMSO	Ethanol
Lutein 5% Oleoresin 60 mg/mL Biolut™	antimikrob	-	✓
	antimikrob	✓	-
	antimikrob	-	✓
Tween 80 Biozate 1 MCT-Öl	antimikrob	-	✓
	antimikrob	-	✓
	antimikrob	-	✓
M5	direkt	-	-
M6	direkt	-	-
M11	direkt	-	-
M22	direkt	-	-
M6	antimikrob	-	✓
M22	antimikrob	-	✓
MO4 _{direkt}	antimikrob	-	✓
MO4 _{verdaut}	antimikrob	-	✓
MO6 _{direkt}	antimikrob	-	✓
MO6 _{verdaut}	antimikrob	-	✓
122	antimikrob	✓	-
123	antimikrob	✓	-
124	antimikrob	✓	-
125	antimikrob	✓	-

Tabelle A 24 Konzentrationen der Emulgatoren und von MCT-Öl in den Inkubationsmedien zur Bestimmung der Viabilität von Caco-2 Zellen bei Behandlung mit Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen (hochdruckhomogenisiert) *in vitro*.

Die Tabelle zeigt die theoretisch berechneten Konzentrationen der jeweiligen Emulgatoren und von MCT-Öl in den verwendeten Inkubationsmedien zur Messung der Viabilität von Caco-2 Zellen bei Behandlung mit Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen (hochdruckhomogenisiert) *in vitro*. Die Berechnung erfolgte anhand der Zugabe der Substanzen bei Herstellung unter Einbezug der jeweils verwendeten Verdünnungsfaktoren. M5 Lutein/Luteinester/Tween 80, M6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1, M11 Lutein/Tween 80; M22 Lutein/Tween 80/Biozate 1, c (LÄ) = Konzentration Luteinäquivalent, c = Konzentration.

	c (LÄ) [μM]	c_{Lutein} [μM]	Tween 80 [μM]	Tween 80 [$\mu\text{g/mL}$]	Biozate 1 [$\mu\text{g/mL}$]	Emulgator [$\mu\text{g/mL}$]	MCT-ÖL [$\mu\text{L/mL}$]
M5	6,2	0,8	8	10	0	10	0,12
	12,5	1,6	16	21	0	21	0,25
	125,0	16,2	159	208	0	208	2,50
	375,2	48,7	477	625	0	625	7,50
M6	6,3	0,9	4	5	3	7	0,09
	12,5	1,8	7	10	5	15	0,18
	166,9	23,7	97	128	72	199	2,39
	501,1	71,3	292	383	216	599	7,18
M11	1,2	0,9	8	10	0	10	0,12
	2,4	1,8	15	20	0	20	0,24
	18,0	13,3	114	150	0	150	1,80
	54,0	40,0	343	450	0	450	5,40
M22	1,1	1,1	3	4	2	7	0,08
	2,3	2,2	7	9	5	13	0,16
	23,0	22,1	65	85	48	133	1,60
	69,0	66,3	195	256	144	400	4,80

Tabelle A 25 Konzentrationen der Emulgatoren und von MCT-Öl in den Inkubationsmedien zur Bestimmung der Viabilität von Caco-2 Zellen bei Behandlung mit Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen (hochdruckhomogenisiert) *in vitro*.

Die Tabelle zeigt die theoretisch berechneten Konzentrationen der jeweiligen Emulgatoren und von MCT-Öl in den verwendeten Inkubationsmedien zur Messung der Viabilität von Caco-2 Zellen bei Behandlung mit Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen M6 und M22 (hochdruckhomogenisiert) *in vitro*. Die Berechnung erfolgte anhand der Zugabe der Substanzen bei Herstellung unter Einbezug der jeweils verwendeten Verdünnungsfaktoren. M6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1, M22 Lutein/Tween 80/Biozate 1, c (LÄ) = Konzentration Luteinäquivalent, c = Konzentration.

	c (LÄ) [μM]	c_{Lutein} [μM]	Tween 80 [μM]	Tween 80 [$\mu\text{g/mL}$]	Biozate 1 [$\mu\text{g/mL}$]	Emulgator [$\mu\text{g/mL}$]	MCT-ÖL [$\mu\text{L/mL}$]
M6	0,6	0,1	1	2	1	3	0,03
M22	0,5	0,5	5	6	4	10	0,12

Tabelle A 26 Konzentrationen der Emulgatoren und von MCT-Öl in den Inkubationsmedien zur Bestimmung der Viabilität von Caco-2 Zellen bei Behandlung mit Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen (ultraschall-behandelt) *in vitro*.

Die Tabelle zeigt die theoretisch berechneten Konzentrationen der jeweiligen Emulgatoren und von MCT-Öl in den verwendeten Inkubationsmedien zur Messung der Viabilität von Caco-2 Zellen bei Behandlung mit Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen MO4 bzw. MO6 (direkt bzw. verdaut) *in vitro*. Die Berechnung erfolgte anhand der Zugabe der Substanzen bei Herstellung unter Einbezug der jeweils verwendeten Verdünnungsfaktoren. MO4 Luteinester/Tween 80/Biozate 1, MO6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1, c (LÄ) = Konzentration Luteinäquivalent, c = Konzentration, n.d. = nicht detektierbar.

	c (LÄ) [μ M]	c _{Lutein} [μ M]	Tween 80 [μ M]	Tween 80 [μ g/mL]	Biozate 1 [μ g/mL]	Emulgator [μ g/mL]	MCT-ÖL [μ L/mL]
MO4 _{direkt}	0,4	n.d.	0,70	0,91	0,51	1,43	0,02
MO4 _{verdaut}	0,5	n.d.	0,56	0,73	0,41	1,14	0,01
MO6 _{direkt}	0,4	0,1	1,28	1,67	0,94	2,61	0,03
MO6 _{verdaut}	0,2	0,2	1,02	1,34	0,75	2,09	0,03

Tabelle A 27 Konzentrationen der Emulgatoren und Öle in den Inkubationsmedien zur Bestimmung der Viabilität von Caco-2 Zellen bei Behandlung mit Luteinestern aus Fertigrezepturen *in vitro*.

Die Tabelle zeigt die theoretisch berechneten Konzentrationen der jeweiligen Emulgatoren und der Öle in den verwendeten Inkubationsmedien zur Messung der Viabilität von Caco-2 Zellen bei Behandlung mit Luteinestern aus Fertigrezepturen *in vitro*. Die Berechnung erfolgte anhand der Zugabe der Substanzen bei Herstellung unter Einbezug der jeweils verwendeten Verdünnungsfaktoren bei Viabilitätsmessung. 122 Luteinester/Tween 80/MCT-Öl, 123 Luteinester/Tween 80/Rapsöl, 124 Luteinester/Tween 80/Biozate 1/MCT-Öl, 125 Luteinester/Tween 80/Biozate 1/Rapsöl, c (LÄ) = Konzentration Luteinäquivalent, c = Konzentration, n.d. = nicht detektierbar

	c (LÄ) [μ M]	c _{Lutein} [μ M]	Tween 80 [μ M]	Tween 80 [μ g/mL]	Biozate 1 [μ g/mL]	Emulgator [μ g/mL]	Öl [μ L/mL]
122	0,5	n.d.	1,67	2,19	0,00	2,19	0,03
123	0,6	n.d.	1,67	2,19	0,00	2,19	0,03
124	0,7	n.d.	1,07	1,40	0,79	2,19	0,03
125	0,6	n.d.	1,07	1,40	0,79	2,19	0,03

Tabelle A 28 Viabilität von Caco-2 Zellen nach Behandlung mit den Wirkstoffen Lutein und Luteinestern *in vitro*.

Die Tabelle zeigt die mittels Resazurin- und Neutralrotassay ermittelten prozentualen Viabilitäten von Caco-2 Zellen relativ zur unbehandelten Zellpopulation (Kontrolle) nach 24-stündiger Behandlung mit dem jeweiligen Wirkstoff Lutein 5%, Biolut™ und Oleoresin. c (LÄ) = Konzentration Luteinäquivalent, SD = Standardabweichung. Statistik: t-Test; zweiseitig, heteroskedatisch, *signifikant $p < 0,05$ zur Kontrolle.

Resazurinassay	c (LÄ) [μ M]	Viabilität [%]	SD [%]	<i>p</i>
Lutein 5%	0,05	106,7	2,5	*
	0,10	116,5	3,1	
	0,15	104,3	18,2	
	0,20	91,9	9,2	
Biolut™	0,01	102,6	0,9	*
	0,10	99,7	3,8	
	0,30	101,5	2,5	
	0,90	102,0	2,9	
Oleoresin	0,6	98,1	3,3	
	1,3	98,5	0,4	
	5,8	102,7	2,2	
	12,8	99,7	1,4	
	19,3	103,5	1,3	
Neutralrot	c (LÄ) [μ M]	Viabilität [%]	SD [%]	<i>p</i>
Lutein 5%	0,05	109,4	7,3	
	0,10	106,7	8,0	
	0,15	84,8	8,8	
	0,20	79,3	7,0	
Biolut™	0,01	98,7	0,3	*
	0,10	97,7	1,5	
	0,30	89,8	0,5	
	0,90	87,5	5,0	
Oleoresin	0,64	98,6	16,3	
	1,29	107,9	9,5	
	5,82	102,1	9,4	
	12,78	95,6	5,7	
	19,32	105,0	32,8	

Tabelle A 29 Viabilität von Caco-2 Zellen nach Behandlung mit Tween 80, Biozate 1 und MCT-Öl in vitro.

Die Tabelle zeigt die mittels Resazurin- und Neutralrotassay ermittelten prozentualen Viabilitäten von Caco-2 Zellen relativ zur unbehandelten Zellpopulation (Kontrolle) nach 24-stündiger Behandlung mit Ethanol, Tween 80, Biozate 1 bzw. MCT-Öl. SD = Standardabweichung. Statistik: t-Test; zweiseitig, heteroskedatisch, *signifikant $p < 0,05$, **hoch signifikant $p < 0,01$ zur Kontrolle.

Resazurinassay	c [μ M]	Viabilität [%]	SD [%]	<i>p</i>
Ethanol (96%)	40,0	100,3	3,1	
Tween 80	1,0	103,0	4,2	
	10,0	104,1	12,6	
	50,0	85,9	11,2	
	100,0	83,1	11,5	
	250,0	82,4	11,9	
	c [μ g/ mL]	Viabilität [%]	SD [%]	<i>p</i>
Biozate 1	1,0	98,9	3,1	
	10,0	99,8	5,2	
	50,0	91,5	4,1	
	75,0	94,0	3,9	
	100,0	100,4	2,8	
	c [μ L/ mL]	Viabilität [%]	SD [%]	<i>p</i>
MCT-Öl	0,5	93,9	4,0	
	1,0	105,5	5,1	
	1,5	94,8	6,3	
	2,0	95,3	14,0	
	2,5	99,3	8,7	
Neutralrot	c [μ M]	Viabilität [%]	SD [%]	<i>p</i>
Ethanol (96%)	40,0	99,8	1,2	
Tween 80	1,0	95,6	2,0	
	10,0	86,7	6,5	
	50,0	80,6	1,9	*
	100,0	71,4	1,3	*
	250,0	54,0	0,6	**
	c [μ g/ mL]	Viabilität [%]	SD [%]	<i>p</i>
Biozate 1	1,0	98,5	2,6	
	10,0	95,7	17,7	
	50,0	81,3	6,9	*
	75,0	74,7	6,8	*
	100,0	71,3	7,7	*
	c [μ L/ mL]	Viabilität [%]	SD [%]	<i>p</i>
MCT-Öl	0,5	99,0	6,8	
	1,0	112,3	14,6	
	1,5	101,7	19,3	
	2,0	93,3	16,7	
	2,5	91,7	0,9	**

Tabelle A 30 Viabilität von Caco-2 Zellen nach Behandlung mit Lutein und Luteinestern aus Miniemulsionen (hochdruckhomogenisiert) in vitro.

Die Tabelle zeigt die mittels Resazurin- und Neutralrotassay ermittelten prozentualen Viabilitäten von Caco-2 Zellen relativ zur unbehandelten Zellpopulation (Kontrolle) nach 24-stündiger Behandlung mit den Miniemulsionen M5, M6, M11 und M22. M5 Lutein/Luteinester/Tween 80, M6 Lutein/Luteinester/Tween 80/Biozate 1, M11 Lutein/Tween 80, M22 Lutein/Tween 80/Biozate 1, c (LÄ) = Konzentration Luteinäquivalent, SD = Standardabweichung. Statistik: t-Test; zweiseitig, heteroskedatisch, *signifikant $p < 0,05$, **hoch signifikant $p < 0,01$ zur Kontrolle.

Resazurinassay	c (LÄ) [μ M]	Viabilität [%]	SD [%]	p
M5	6,2	94,7	3,2	
	12,5	88,1	4,8	*
	125,0	61,3	8,7	*
	375,2	13,9	4,5	**
M6	6,3	95,7	5,0	
	12,5	87,3	3,4	**
	166,9	94,6	8,3	
	501,1	70,9	10,1	*
M11	1,2	92,9	3,7	**
	2,4	93,9	6,6	
	18,0	74,6	6,8	*
	54,0	34,6	0,5	**
M22	1,1	95,2	2,8	
	2,3	97,9	7,9	
	23,0	95,1	2,1	
	69,0	87,1	3,8	*
Neutralrot	c (LÄ) [μ M]	Viabilität [%]	SD [%]	p
M5	6,2	94,8	5,4	
	12,5	91,6	9,2	
	125,0	55,3	11,9	*
	375,2	42,9	11,0	*
M6	6,3	88,6	1,6	**
	12,5	71,3	1,8	**
	166,9	68,4	11,4	*
	501,1	49,1	17,4	*
M11	1,2	94,2	3,2	*
	2,4	76,9	8,1	*
	18,0	66,1	15,4	
	54,0	48,0	8,3	**
M22	1,1	86,5	1,5	**
	2,3	82,5	10,3	*
	23,0	85,8	5,1	*
	69,0	65,7	8,0	*